

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN PRO DIAGNOSTICKÉ ÚČELY S
VYUŽITÍM
POLYMERNÍCH NOSIČŮ**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

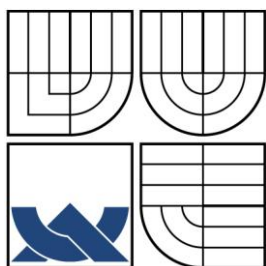
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE:

AUTHOR

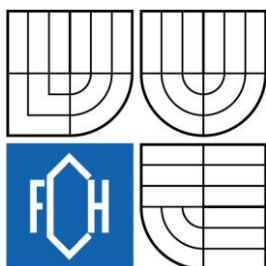
Mgr. IVONA SYSLOVÁ

BRNO 2009



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN PRO DIAGNOSTICKÉ ÚČELY S VYUŽITÍM POLYMERNÍCH NOSIČŮ

NUCLEIC ACIDS ISOLATION FOR DIAGNOSTIC PURPOSES USING POLYMERIC CARRIERS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

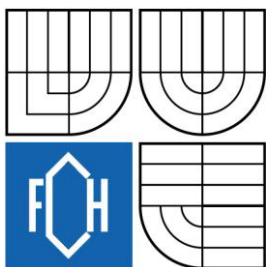
Mgr. IVONA SYSLOVÁ

VEDOUcí PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. BOHUSLAV RITTICH, CSc.

BRNO 2009



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0252/2008** Akademický rok: **2008/2009**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Mgr. Ivona Syslová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (N2901)
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)
Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.**
Konzultanti diplomové práce:

Název diplomové práce:

Izolace nukleových kyselin pro diagnostické účely s využitím polymerních nosičů

Zadání diplomové práce:

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

Termín odevzdání diplomové práce: 22. 5. 2009

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

Mgr. Ivona Syslová
Student(ka)

doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jirina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

Abstrakt

V diplomové práci byla studována izolace kyseliny deoxyribonukleové (DNA) pomocí tří různých metod: fenolovou extrakcí, vysolováním chloridem sodným a magnetickou separací využívající reverzibilní adsorpce nukleových kyselin na různé magnetické nosiče. K izolaci DNA bylo využito 5 různých vhodně funkcionalizovaných nosičů: magnetického silikagelu, P(HEMA-co-GMA) ox. I, P(HEMA-co-GMA) ox. II, Dynal DNA Direct a Perovskit 439. K reverzibilní imobilizaci DNA na nosič docházelo v prostředí vysoké koncentrace NaCl a poly(ethylenglykolu) (PEG). Pro návázání DNA na magnetické mikročástice byla navozena kondenzace DNA pomocí 2 M NaCl a PEG o molekulové hmotnosti 6000, kdy výsledná koncentrace PEG v separační směsi byla 8 a 16 %. Cílem bylo získat DNA v kvalitě vhodné pro polymerasovou řetězovou reakci (PCR).

DNA byla izolována z bakteriálních kultur tří sbírkových probiotických kmenů, *L. amylovorus* CCM 4380^T, *L. zaeae* CCM 7069^T, *L. plantarum* CCM 7039^T, které byly kultivovány na médiu MRS. DNA byla rovněž izolována z fermentovaných mléčných výrobků: Jihočeský zákys s ovocem jahoda (kysaný mléčný výrobek s probiotickou kulturou *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* a *Streptococcus thermophilus*), Revital active (bílý jogurt s inulinem a probiotickou kulturou *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium* sp.) a Actimel višň (mléčný výrobek s obsahem probiotické kultury *Lactobacillus casei*). Po provedení PCR s izolovanou DNA byly PCR produkty detekovány pomocí agarosové gelové elektroforézy.

Metodou PCR byla ověřena úspěšnost izolace DNA probiotických bakterií pomocí fenolové extrakce, vysolováním chloridem sodným i magnetickou separací s využitím různých magnetických nosičů. Metoda magnetické separace s využitím magnetických mikročástic byla také ověřena pro izolaci DNA v kvalitě vhodné pro PCR u probiotických kysaných mléčných výrobků.

Abstract

The isolation of deoxyribonucleic acid (DNA) was studied in the diploma thesis by using three different methods: phenol extraction, salting with sodium chloride and magnetic separation with reversible adsorption of nucleic acids on different magnetic carriers. There were used five different properly functionalized carriers for the isolation of DNA: magnetic silicagel, P(HEMA-co-GMA) ox. I, P(HEMA-co-GMA) ox. II, Dynal DNA Direct and Perovskit 439. The reversible immobilization of DNA on the magnetic carrier was proceeded under the conditions of high concentration of NaCl and poly(ethyleneglycol) (PEG). There was induced the condensation of DNA by 2 M NaCl and PEG with molecular mass 6000 for binding of the DNA to the magnetic carriers and the final concentration of PEG in the separation mixture was 8 and 16 %. The aim was to gain the DNA of quality suitable for polymerase chain reaction (PCR).

The DNA was isolated from the bacterial cultures of three probiotic strains, *L. amylovorus* CCM 4380^T, *L. zaeae* CCM 7069^T, *L. plantarum* CCM 7039^T, which were cultivated in MRS medium. The DNA was also isolated from the fermented dairy products: Jihočeský zákys s ovocem jahoda (the fermented dairy product with the probiotic culture of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* and *Streptococcus thermophilus*), Revital active (the yogurt with inulin and the probiotic culture of *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* sp.) and Actimel višň (the dairy product with

the probiotic culture of *Lactobacillus casei*). When the PCR with the isolated DNA was passed off, the PCR products were detected by the gel electrophoresis with agarose.

The success of the DNA isolation of the probiotic bacteria by phenol extraction, salting with NaCl and by magnetic separation, was verified by the PCR method. The method of magnetic separation using magnetic carriers was also verified for the isolation of DNA of quality suitable for PCR from the probiotic fermented dairy products.

Klíčová slova

DNA, fenolová extrakce, vysolování, magnetická separace, PCR, poly(ethylenglykol).

Keywords

DNA, phenol extraction, salting, magnetic separation, PCR, poly(ethyleneglycol).

SYSLOVÁ, I. *Izolace nukleových kyselin pro diagnostické účely s využitím polymerních nosičů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 91 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, 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

Touto formou bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce panu doc. Ing. Bohuslavu Rittichovi, CSc. a paní doc. RNDr. Aleně Španové, CSc. za odborné vedení, trpělivost a čas, který mi věnovali. Dále děkuji Ing. Štěpánce Trachtové za pomoc a rady v praktické části a rodině za podporu během mého studia.

Obsah:

ABSTRAKT	5
ABSTRACT	5
KLÍČOVÁ SLOVA	6
KEYWORDS	6
PROHLÁŠENÍ	7
I. ÚVOD	13
II. TEORETICKÁ ČÁST	14
2.1 Probiotika.....	14
2.2 Rod <i>Lactobacillus</i>	14
2.2.1 Vybrané probiotické druhy rodu <i>Lactobacillus</i>	16
2.2.1.1 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	16
2.2.1.2 <i>Lactobacillus fermentum</i>	16
2.2.1.3 <i>Lactobacillus casei</i>	16
2.2.1.4 <i>Lactobacillus johnsonii</i>	17
2.2.1.5 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	17
2.2.1.6 <i>Lactobacillus reuteri</i>	17
2.2.1.7 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> a <i>lactis</i>	17
2.2.1.8 <i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	18
2.2.2 Druhy rodu <i>Lactobacillus</i> použité v diplomové práci.....	18
2.2.2.1 <i>Lactobacillus plantarum</i>	18
2.2.2.2 <i>Lactobacillus amylovorus</i>	18
2.2.2.3 <i>Lactobacillus zae</i>	19
2.3 Kyselina deoxyribonukleová (DNA) a její replikace.....	19
2.3.1 Struktura DNA.....	19
2.3.2 Polymerasové řetězové reakce.....	20
2.3.2.1 <i>Inhibice polymerasové řetězové reakce</i>	22
2.3.2.2 <i>Kvantitativní Real Time PCR</i>	23
2.4 Magnetická separace.....	23
III. CÍL PRÁCE	27
IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
4.1 MATERIÁL A METODY.....	28
4.1.1 Použité mikroorganismy.....	28
4.1.2 Mléčné výrobky.....	28
4.1.3 Chemikálie.....	29
4.1.4 Magnetické částice.....	29
4.1.5 Roztoky a media.....	29
4.1.5.1 <i>Kultivační media pro bakterie rodu Lactobacillus</i>	29
4.1.5.2 <i>Roztoky pro přípravu hrubých lyzátů</i>	30
4.1.5.3 <i>Roztoky pro izolaci genomové DNA</i>	30
4.1.5.4 <i>Roztoky pro agarosovou gelovou elektroforézu</i>	30
4.1.6 DNA standardy používané v agarosové gelové elektroforéze.....	31
4.1.7 Komponenty pro PCR.....	32
4.1.8 Přístroje a pomůcky.....	32
4.1.9 Metody.....	32

4.1.9.1	Kontrola čistoty bakteriální kultury.....	32
4.1.9.2	Kultivace bakteriálních buněk.....	32
4.1.9.3	Příprava hrubých lysátů buněk z čistých bakteriálních kultur.....	33
4.1.9.4	Příprava hrubých lysátů z tekutých mléčných výrobků.....	33
4.1.9.5	Izolace genomové DNA z hrubých lysátů fenolovou extrakcí.....	33
4.1.9.6	Přesrážení DNA ethanolem.....	33
4.1.9.7	Izolace genomové DNA z hrubých lysátů vysolováním chloridem sodným.....	34
4.1.9.8	Přesrážení DNA v supernatantu po vysolování chloridem sodným ethanolem.....	34
4.1.9.9	Izolace genomové DNA z hrubých lysátů pomocí magnetických nosičů.....	34
4.1.9.10	Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA pomocí přístroje NanoPhotometer TM	35
4.1.9.11	Elektroforéza nukleových kyselin v agarosovém gelu.....	35
4.1.9.12	Metody PCR.....	36
V.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	39
5.1	Kontrola čistoty bakteriální kultury.....	39
5.2	Příprava hrubých lysátů buněk z 1 ml čistých bakteriálních kultur.....	39
5.3	Izolace DNA z hrubých lysátů buněk rodu <i>Lactobacillus</i> fenolovou extrakcí.....	40
5.4	Izolace DNA z hrubých lysátů buněk rodu <i>Lactobacillus</i> vysolováním chloridem sodným.....	41
5.5	Ověření kvality izolované DNA pomocí polymerasové řetězové reakce s rodově specifickými primery pro rod <i>Lactobacillus</i>	42
5.6	Ověření kvality izolované DNA pomocí polymerasové řetězové reakce s univerzálními primery pro doménu Baktérie.....	43
5.7	Ověření kvality izolované DNA pomocí polymerasové řetězové reakce s primery specifickými pro rod <i>Lactobacillus</i> a s využitím PPP Master Mixu.....	44
5.8	Ověření kvality izolované DNA pomocí polymerasové řetězové reakce s primery specifickými pro rod <i>Lactobacillus</i> s využitím PPP Master Mixu nebo klasické sady PCR komponent.....	45
5.9	Izolace DNA z hrubých lysátů buněk rodu <i>Lactobacillus</i> (3 ml bakteriální kultura, $A_{600} = 1$).....	47
5.10	Izolace DNA z hrubých lysátů buněk rodu <i>Lactobacillus</i> (3 ml bakteriální kultura, $A_{600} = 1,5$).....	48
5.11	Izolace DNA z hrubých lysátů buněk rodu <i>Lactobacillus</i> (5 ml bakteriální kultura, $A_{600} = 1,5$).....	50
5.12	Stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované fenolovou extrakcí a vysolováním chloridem sodným.....	55
5.13	Ověření kvality izolované DNA z 5 ml bakteriální kultury pomocí polymerasové řetězové reakce s primery specifickými pro rod <i>Lactobacillus</i> a s využitím PPP Master Mixu.....	56
5.14	Izolace DNA z hrubých lysátů buněk rodu <i>Lactobacillus</i> s využitím magnetických nosičů.....	58
5.14.1	Izolace DNA z hrubých lysátů buněk kmene <i>L. amylovorus</i> CCM 4380 ^T s využitím magnetických nosičů.....	58
5.14.2	Ověření kvality izolované DNA kmene <i>L. amylovorus</i> CCM 4380 ^T s využitím magnetických nosičů pomocí polymerasové řetězové reakce s primery specifickými pro rod <i>Lactobacillus</i> (PPP Master Mix).....	61

5.14.3 Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk kmenů <i>L. plantarum</i> CCM 7039 ^T a <i>L. zeae</i> CCM 7069 ^T s využitím magnetických nosičů.....	63
5.14.4 Ověření kvality izolované DNA kmenů <i>L. plantarum</i> CCM 7039 ^T a <i>L. zeae</i> CCM 7069 ^T s využitím magnetických nosičů pomocí polymerasové řetězové reakce s primery specifickými pro rod <i>Lactobacillus</i> (PPP Master Mix).....	67
5.15 Izolace DNA z hrubých lyzátů reálných vzorků s využitím magnetických nosičů.....	72
5.16 Ověření kvality izolované DNA z reálných vzorků s využitím magnetických nosičů pomocí polymerasové řetězové reakce s primery specifickými pro rod <i>Lactobacillus</i> (PPP MasterMix).....	76
5.17 Ověření kvality izolované DNA z reálných vzorků s využitím magnetických nosičů pomocí polymerasové řetězové reakce s primery specifickými pro rod <i>Lactobacillus</i> (PPP MasterMix), kdy objem DNA v PCR směsi byl zvýšen z 1μl na 5μl.....	80
5.18 Ověření kvality a kvantifikace DNA izolované z reálných vzorků s využitím magnetických nosičů pomocí Real Time PCR s primery specifickými pro rod <i>Lactobacillus</i>	82
VI. ZÁVĚR.....	87
SEZNAM LITERATURY.....	88
SEZNAM ZKRATEK.....	91

I. ÚVOD

Řada druhů bakterií rodu *Lactobacillus* se řadí mezi tzv. probiotické bakterie, které jsou hojně využívány při výrobě různých fermentovaných mléčných výrobků. Pro použití těchto bakterií ve výrobcích je požadována jednoznačná identifikace kmene. Nezbytnou součástí identifikace bakteriálních rodů a druhů jsou molekulárně biologické metody jako je polymerasová řetězová reakce se specifickými primery. Tato metoda může sloužit nejen k ověření identity zvolených probiotických bakterií, ale může být také využita k analýze různých probiotických výrobků.

Polymerasová řetězová reakce je velmi citlivou metodou. Pomocí ní lze prokázat velmi malé množství DNA, řádově fentogramy. Ač na jedné straně je tato vysoká citlivost výhodou, na straně druhé je tato metoda citlivá i na přítomnost řady dalších látek, které se v reálných vzorcích běžně vyskytují a které mohou průběh PCR inhibovat. Důležité je tedy DNA ze vzorků izolovat v dostatečné čistotě, bez těchto inhibujících látek. Vhodným způsobem jak toho dosáhnout je použití magnetických nosičů, na které se DNA reverzibilně váže. Tato imobilizace probíhá v prostředí poly(ethylenglykolu) (PEG 6000) a chloridu sodného, kdy dochází ke kondenzaci DNA, což je nezbytné k tomu aby mohlo dojít k navázání DNA na hydrofilní magnetický nosič.

Metody separace pomocí magnetických nosičů mají ve srovnání s klasickými metodami izolace DNA řadu výhod. S jejich využitím je izolace DNA rychlá, snadná, automatizovatelná, ekonomicky výhodná a není zapotřebí používání organických rozpouštědel jako je chloroform či fenol, které se běžně využívají při izolaci DNA standardní fenolovou extrakcí.

II. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Probiotika

Bakterie mléčného kvašení jsou dlouhou dobu využívány v tradičních fermentovaných potravinových výrobcích jako je kysané zelí, jogurty nebo kefíry. V poslední době dochází k prudkému nárůstu spotřeby potravin obsahujících širokou škálu různých probiotických kmenů. [1]

Jako probiotika se používají nepatogenní živé mikrobiální monokultury nebo směsné kultury, které pokud jsou dodávány v dostatečně vysokých dávkách, pozitivně ovlivňují zdraví konzumenta. [1] Denní dávka by měla být nejméně 10^9 CFU. Bylo zjištěno, že prospěšný účinek mohou mít také neživé mikroorganismy nebo části jejich buněk. [2, 3] Pozitivně ovlivňují imunitu, produkují antimikrobiální látky a brání adhezi patogenů. [1] Bakterie mléčného kvašení mají rovněž potenciální terapeutické vlastnosti jako jsou protizánětlivé a protirakovinné účinky. Snižují vznik DNA aduktů a mají pozitivní vliv na poškození DNA. Výzkumy se zvířaty ukazují, že bakterie mléčného kvašení mají inhibiční vliv na nádory tlustého střeva, močového měchýře, mléčné žlázy a jater. [4]

Jako probiotické mikroorganismy (Tabulka 1) jsou nejčastěji využívány bakterie rodu *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Lactococcus* patřící mezi bakterie mléčného kvašení a *Bifidobacterium*. Rod *Bifidobacterium* je řazen do vývojové větve aktinomycet, a je fylogeneticky odlišný od bakterií mléčného kvašení; je ale s nimi společně uváděn vzhledem k podobnosti fenotypu. [5] Dále probiotické vlastnosti mají i grampozitivní koky, kvasinky a bacily. Probiotické produkty jsou dostupné ve formě tablet, nápojů a fermentovaných mléčných výrobků.

Jednou z důležitých vlastností probiotických kmenů je odolnost vůči různým stresům během jejich cesty zažívacím traktem. Tyto mikroorganismy musí projít vysoce kyselým prostředím žaludku a také odolávat výměškům žluči do tenkého střeva. Navíc také musí soupeřit se stávající mikroflórou. [1]

Pozitivní účinek probiotických kmenů musí být vědecky ověřen: kmeny musí být jasně definovány, prostudovány vlastnosti populací a biochemické vlastnosti. Ke studiu každého nového kmene jsou využívána laboratorní zvířata nebo dynamické modely trávicího traktu, kdy se testují schopnosti přežívání a sledují se pozitivní a negativní účinky. [6]

2.2 Rod *Lactobacillus*

Bakterie patřící do rodu *Lactobacillus* jsou nesporulující grampozitivní tyčky, které se mohou lišit jak ve tvaru tak i velikosti; některé mohou být velmi dlouhé, zatímco jiné mohou mít tvar téměř jako kokový bacil. Bakterie se vyskytují buď samostatně, nebo vytváří kratší i delší řetězce. Jsou vesměs fakultativně anaerobní a většina druhů je nepohyblivých. Zpravidla patří mezi mezofily, ale některé druhy jsou psychrotrofní. Byly izolovány z rostlin, mléka a mléčných výrobků, masa a výkalů. Některé druhy jsou schopné růst při nízkých teplotách ve výrobcích, které jsou skladované chlazením. Některé kmeny produkují bakteriociny, které se mohou využívat jako konzervační nebo ochranné látky. [3] Jsou acidofilní a v přítomnosti potravin obsahující zkvasitelné cukry vytváří pH okolo hodnoty 4. Toto kyselé prostředí má negativní účinek na jiné přítomné bakterie, přičemž dochází k zastavení jejich růstu nebo i zahynutí bakterií. Bakterie rodu *Lactobacillus* rostou do pH hodnoty 7,2. [7]

oxid uhličitý a ethanol. Dalším charakteristickým znakem je produkce plynu z glukosy. Tato skupina obligátně heterofermentativních druhů se výrazně podílí na znehodnocování potravin. Způsobují například kažení vína a piva a také citrusového ovoce (*Lactobacillus brevis*) a také kažení majonéz (*Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fructivorans*). [7]

Bakterie rodu *Lactobacillus* exprimují řadu různých adhesivních povrchových proteinů, které využívají buď k adhezi na hostitelské povrchy buněk zažívacího traktu a následně kolonizaci hostitele nebo také k bakteriální interakci s fyziologickými a imunologickými procesy hostitele. Tyto adhesiny se dělí do čtyř skupin, kdy jejich cílem jsou buňky epiteliální či fagocytické stejně jako extracelulární matrice, muciny nebo cirkulující komponenty.

Z hlediska výroby mléčných výrobků je důležitý metabolismus laktosy, který je započat jejím přestupem do cytoplasmy prostřednictvím fosfoenolpyruvát-dependentního fosfotransferasového systému (PTS), kam vstupuje jako laktosa-fosfát. Ten je následně štěpen fosfo- β -D-galaktosidasou (P- β -gal) za vzniku glukosy a galaktosa-6-fosfátu. Glukosa je pak fosforylována glukokinasou a metabolizována v glykolytické dráze nebo pentosafosfátovém cyklu. Galaktosa-6-fosfát je metabolizován přes tagatosa-6-fosfátovou dráhu. Glukosa je represorem enzymového systému PTS a P- β -gal. [4]

2.2.1 Vybrané probiotické druhy rodu *Lactobacillus*

2.2.1.1 *Lactobacillus acidophilus*

Patří do skupiny obligátně homofermentativních druhů rodu *Lactobacillus*. Jsou to nesporulující grampozitivní anaerobní bakterie tvaru dlouhé tyčky, které tolerují vysoké koncentrace kyseliny octové. Obsahují enzym aldolasu a jsou katalasa negativní. Nacházejí se v ovoci, hnoji, střevním traktu člověka i zvířat a půdě. [9]

V současné době je známa kompletní genomová sekvence kmene *Lactobacillus acidophilus* NCFM, ale zatím nejsou všechny výsledky publikovány, pouze některá data týkající se genů umožňující štěpení fruktooligosacharidů, genů umožňující toleranci ke kyselému prostředí a genů ovlivňujících buněčný povrch, dělení buněk a adhezi k Caco-2 buňkám. [10]

Kmen *Lactobacillus acidophilus* NCFM má schopnost přežít při průchodu gastrointestinálním traktem a kolonizovat ho. Dále je schopen adheze na buňky urogenitálního traktu. Jeho využití v potravinářství je zejména při výrobě acidofilního mléka. [11]

2.2.1.2 *Lactobacillus fermentum*

Jedná se o grampozitivní anaerobní bakterie tvořící nesporulující tyčky, které jsou tolerantní k vysokým koncentracím kyseliny octové. Lze je nalézt v zažívacím traktu a ústní dutině člověka i živočichů. Využívají se při výrobě piva a kynutého těsta. Způsobují kažení řepy při výrobě cukru. [9]

Kmen *Lactobacillus fermentum* RC-14 je schopen adheze na buňky urogenitálního traktu a střevní sliznice. Společně s kmenem *L. fermentum* B-54 může snižovat výskyt infekcí urogenitálního traktu a bakteriální infekce vagíny stejně jako kvasinkové infekce vagíny. [11]

2.2.1.3 *Lactobacillus casei*

Tyto anaerobní grampozitivní nesporulující bakterie jsou stejně jako předchozí druhy tolerantní k vysokým koncentracím kyseliny octové a jsou katalasa negativní. Přirozeně se

nachází v hmyzu, rostlinách, střevním traktu lidí a živočichů, ústní dutině člověka a dalších místech. Jak již bylo zmíněno, využívají se jako startovací kultura při výrobě sýrů a kynutého těsta. [9]

Negativní vlastností tohoto druhu je fermentace citrátu, kdy dochází k uvolňování oxidu uhličitého do prostředí, který sýry znehodnocuje. [7]

L. casei neprodukuje bakteriociny a jeho pozitivním účinkem je, že zkracuje dobu trvání rotavirových průjmů u dětí a zmírňuje příznaky zácpy. [11, 12]

2.2.1.4 *Lactobacillus johnsonii*

Bakterie uvedeného druhu jsou grampozitivní fakultativně anaerobní nesporulující tyčky, které produkují kyselinu DL-mléčnou. Nalézají se v lidské krvi, stolici prasat, kuřat i myši. [9]

Bylo zjištěno, že kmen *Lactobacillus johnsonii* La1 adhezuje na buňky sliznice a taktéž buňky Caco-2, vytváří bakteriociny a je odolný vůči kyselému prostředí i působení žluči. Jeho velmi pozitivním účinkem je inhibice růstu bakterie *Salmonella typhimurium*. [12]

Kmen *Lactobacillus johnsonii* NCC533 má taktéž schopnost inhibovat patogeny. Může fermentovat různé disacharidy a hexosy a má širokou škálu různých transporterů, peptidas a proteas. Jeho genom obsahuje několik genů, které kódují proteiny schopné přichycení na vnějším povrchu buněk. [10]

2.2.1.5 *Lactobacillus rhamnosus*

L. rhamnosus jsou grampozitivní anaerobní nesporulující bakterie tvaru tyčky. Taktéž jsou tolerantní ke kyselému prostředí. Nejčastěji se vyskytují v ústní dutině člověka a způsobují vznik zubních kazů. [9]

Mezi nejvíce prostudované probiotické kmeny patří kmen *L. rhamnosus* GG, který se dříve nazýval *Lactobacillus casei* GG. Tento kmen je schopen *in vitro* adheze k různým typům střevních buněk a kolonizuje buňky střevního traktu intenzivněji než jiné kmeny rodu *Lactobacillus*. Dále produkuje antibakteriální látky, které mají široké spektrum působení.

L. rhamnosus GG se často využívá při léčbě nebo předcházení průjmů způsobených užíváním antibiotik a dále při léčbě průjmů vyvolaných rotaviry. Jeho dalším pozitivem je působení proti vzniku zácpy. [12, 13]

2.2.1.6 *Lactobacillus reuteri*

Bakterie se nalézají v zažívacím traktu člověka a živočichů, v lidské vagíně a ve vodném prostředí. Lze je využít jako producenta širokospektrého antibiotika reuterinu. Jedná se o nesporulující grampozitivní tyčky snášející vysoké koncentrace kyseliny octové. [9]

Bylo zjištěno, že kmen *Lactobacillus reuteri* MM53 získaný z mateřského mléka adhezuje na buňky gastrointestinálního traktu a tvoří bakteriociny. Jeho významnou vlastností je rezistence k některým antibiotikům. Příkladem takového antibiotika je erythromycin. Stejně jako *L. rhamnosus* se uplatňuje v prevenci průjmových onemocnění. [11, 12]

2.2.1.7 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* a *lactis*

L. delbrueckii ssp. *lactis* jsou anaerobní grampozitivní nesporulující bakterie patřící mezi termofilní mikroorganismy a jsou katalasa negativní. Nacházejí se v rostlinném i živočišném materiálu, který podléhá fermentaci při teplotách cca 40 °C. [9]

L. delbrueckii ssp. *bulgaricus* se používá jako startovací kultura ve výrobě jogurtů. Oba kmeny se využívají ve výrobě sýrů jako startovací kultura. Vyrábí se tak například Ementál, Mozzarella a další sýry. [7]

2.2.1.8 *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*

Jsou to nesporelující anaerobní grampozitivní bakterie, katalasa negativní a produkují bakteriocin. Jsou tolerantní ke kyselému prostředí. Jejich přirozeným zdrojem je stolice kojenců, fermentované mléko nebo žlutý bulharský sýr. [9]

2.2.2 Druhy rodu *Lactobacillus* použité v diplomové práci

2.2.2.1 *Lactobacillus plantarum*

Jedná se o grampozitivní anaerobní a nesporelující tyčky, které jsou tolerantní k vysokým koncentracím kyseliny octové. [9]

Bakterie *L. plantarum* se nalézají v zažívacím traktu člověka i živočichů, ústní dutině, vodě a vinné révě. Sekundárně osidlují zubní plak a stimulují imunitní systém. Náhodně se vyskytují ve fermentované zelenině a masných výrobcích. Využívají se při výrobě sýrů, kysaného zelí, párků, cereálních výrobků, fermentaci okurek a při produkci siláže. Tento druh způsobuje kažení citrusových džusů, vína, piva, mléka a některých sýrů. [7, 9]

L. plantarum je charakterizován velkou velikostí genomu, která je téměř o 50% větší než genom jiných bakterií mléčného kvašení (Tabulka 2). Například velikost genomu kmene *L. plantarum* WCFS1 je 3,3 Mb. [4] Z toho plyne jeho široká metabolická schopnost využívat širokou škálu zdrojů uhlíku. Tato schopnost vychází z velkého počtu genů, které jsou spojeny s transportem cukrů a jejich využíváním. [10]

Byl popsán kmen *L. plantarum* 299V, který je schopen exprimovat gen kódující tvorbu mucinu v zažívacím traktu, který následně omezuje adhesi enteropatogenů na buňky sliznice gastrointestinálního traktu. [5]

Tabulka 2: Genomová charakteristika sekvenovaných kmenů rodu *Lactobacillus* [4]

Kmen	Velikost genomu (bp)	Počet genů
<i>L. plantarum</i> WCFS1	3 308 274	3 051
<i>L. johnsonii</i> NCC 533	1 992 676	1 821
<i>L. acidophilus</i> NCFM	1 993 564	1 864
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842	1 864 998	1 562
<i>L. casei</i> ATCC 334	2 924 325	2 776

2.2.2.2 *Lactobacillus amylovorus*

Jedná se o grampozitivní anaerobní nesporelující tyčky, která jsou nepohyblivé a tolerují kyselé prostředí.

L. amylovorus je katalasa negativní a vytváří bakteriociny a produkuje glukoamylasu. Je schopen fermentovat celobiosu, škrob, amygdalin, sacharosu, maltosu a další. Nefermentuje ale laktosu, manitol, rafinosu. Přirozeným zdrojem je voda, ovoce, rostliny, půda, hnůj, potraviny a lidská vagina. [9]

2.2.2.3 *Lactobacillus zae*

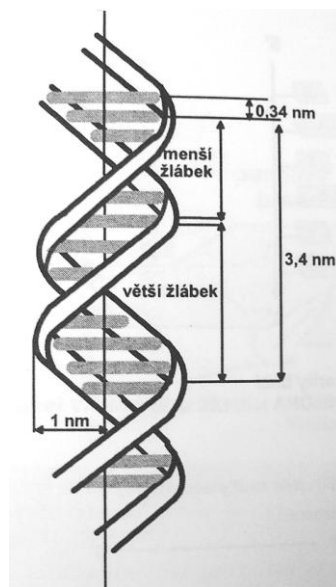
Jedná se o fakultativně heterofermentativní tyčky patřící mezi grampozitivní anaerobní nesporeující bakterie. Jako předchozí druhy, i *L. zae* je tolerantní ke kyselému prostředí. Jeho optimální růst probíhá při teplotě 10 – 45 °C.

Je katalasa negativní, neprodukuje z argininu amoniak a neredukuje nitráty ani nitrity. Z glukonátu produkuje plyn. [9]

2.3 Kyselina deoxyribonukleová (DNA) a její replikace

2.3.1 Struktura DNA

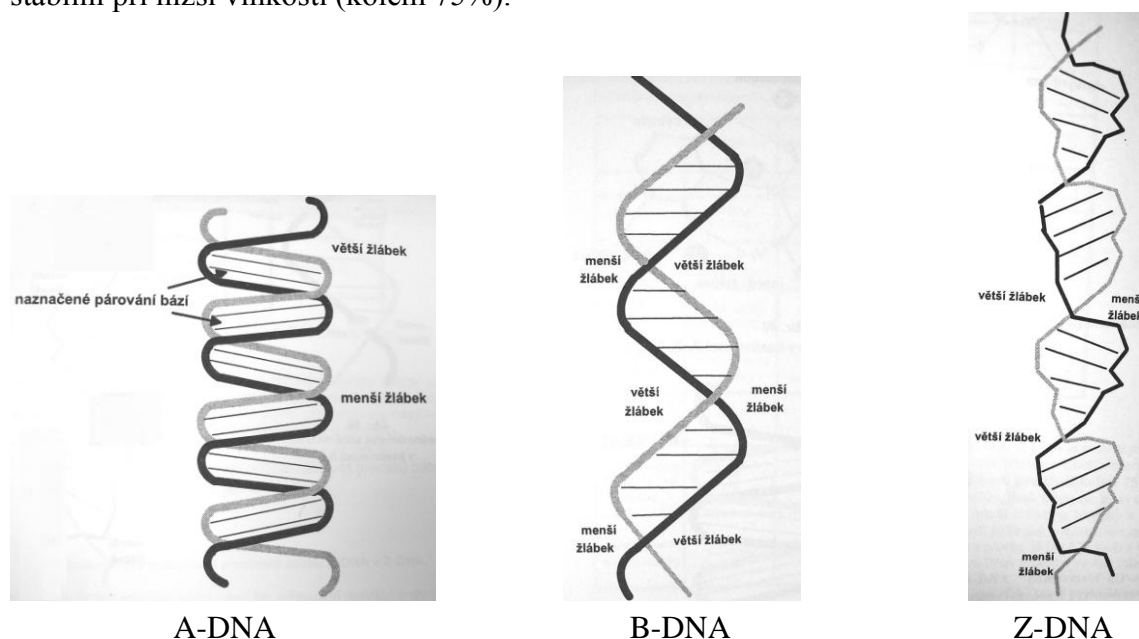
Molekula DNA je nositelkou genetické informace. Její struktura byla objasněna v roce 1953, kdy Watson a Crick vytvořili model molekuly DNA. Molekula DNA je tvořena dvěma polydeoxyribonukleotidovými řetězci, které jsou svinuté do pravotočivých šroubovic kolem pomyslné osy. Pořadí jednotlivých deoxyribonukleotidů v polydeoxyribonukleotidových řetězcích se označuje jako nukleotidová sekvence a vytváří **primární strukturu DNA**. Řetězce jsou v **sekundární struktuře DNA** vzájemně v opačném směru a jsou vzájemně komplementární, to znamená, že jednotlivé base nukleotidů v řetězcích DNA, které jsou umístěné proti sobě, jsou schopné vytvářet mezi sebou vodíkové vazby. Pentosové kruhy a fosfátové zbytky v polydeoxyribonukleotidových řetězcích jsou ve vnější oblasti struktury DNA a naopak base míří dovnitř této dvoušroubovicové struktury. Schopností dvoušroubovice DNA je rozvíjet se, kdy dochází k zpřístupnění genetické informace. Vnější část dvoušroubovice je hydrofilní a nese záporné náboje v důsledku fosfátových zbytků. Dvoušroubovice DNA obsahuje dva typy žlábků, které se liší svojí šířkou a hloubkou (Obr. 1). Oba žlábků nesou atomy, které jsou schopné tvořit vodíkové vazby s proteiny. [14, 15]



Obr. 1: Schéma dvoušroubovicové DNA s vyznačením dvou typů žlábků [14]

Vlákna DNA se přirozeně stáčí do dvoušroubovice, ale forma stočení není vždy stejná. Existují tři konformační formy DNA, a to A-DNA, B-DNA a Z-DNA (Obr. 2). Konformace A a B jsou pravotočivé; Z-DNA je levotočivá. B-DNA je stabilní při relativní vlhkosti 95 % a

přestavuje dvoušroubovici DNA, která byla popsána Watsonem a Crickem. A-DNA je stabilní při nižší vlhkosti (kolem 75%).



Obr. 2: Zjednodušené schéma konformačních typů DNA [14]

Terciární struktura DNA je představována nadšroubovicí vznikající zavedením dalšího vinutí do dvoušroubovicové DNA. Nadšroubovice se může vytvářet z kružnicové i lineární dvouřetězcové DNA. Pokud jde o formu výskytu DNA u prokaryotních buněk, které jsou používány v této diplomové práci, jedná se o formu DNA zpravidla cyklickou, kdy tato samotná DNA vytváří jediný chromosom. [14, 15]

2.3.2 Polymerasové řetězové reakce

Při replikaci DNA vzniknou z jedné mateřské molekuly dvě naprosto stejné molekuly dceřiné. V buňkách přirozeně probíhá replikace DNA *in vivo*. DNA lze replikovat i *in vitro*. Základní metodou je polymerasová řetězová reakce (polymerase chain reaction - PCR). [14]

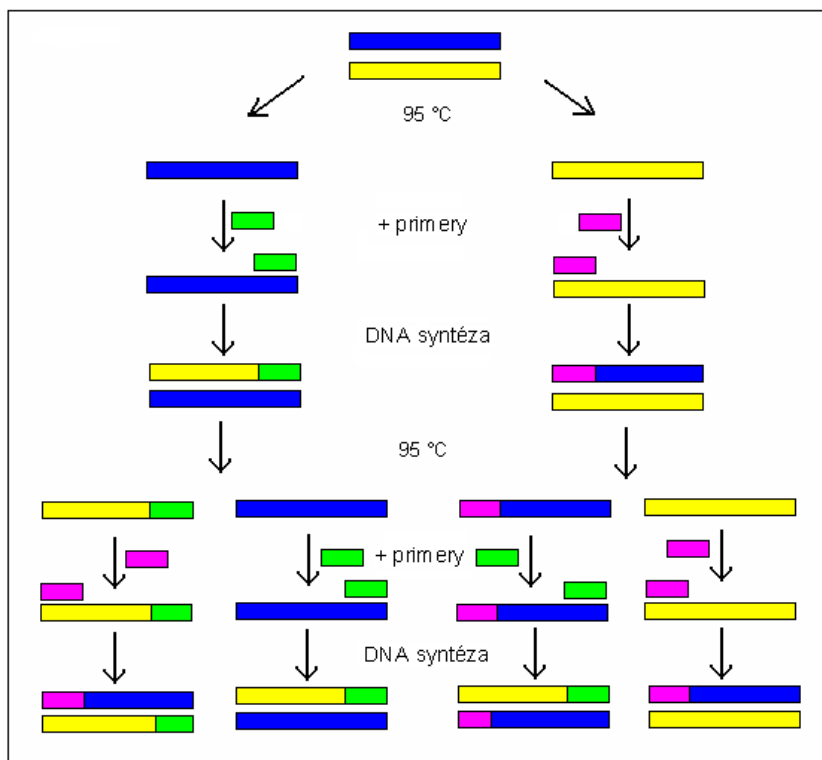
Protože mnoho bakterií mléčného kvašení má podobné nároky na růstové podmínky a výživu, je často obtížné využívat k jejich identifikaci na rodové úrovni klasické mikrobiální metody. Proto byly vyvinuty molekulárně biologické metody, které umožňují poměrně rychlou detekci a diferenciaci těchto bakterií, což je důležité při kontrole kvality mléčných výrobků, zejména těch, které obsahují smíšené kultury.

Jednou z metod používaných k identifikaci bakterií rodu *Lactobacillus* je PCR. [16] Při reakci dochází k opakované, enzymové syntéze nových řetězců specifických úseků dvouřetězcové DNA. Reakce probíhá v termocykleru, což je zařízení, ve kterém dochází k automatickému střídání teplot v naprogramovaných časových intervalech. [14]

K reakci jsou zapotřebí dva primery, což jsou krátké oligonukleotidové sekvence, které se chemicky syntetizují a obvykle mívají délku zhruba 18-30 basí. Jsou komplementární s amplifikovanou sekvencí na obou vláknech DNA a vymezují oblast amplifikace. Dále je k syntéze nových řetězců zapotřebí termostabilní polymerasy, která pochází z termostabilních organismů, například *Taq* polymerasa z *Thermus aquaticus*, která odolává teplotám, při

kterých DNA denaturuje (cca 95 °C). V reakční směsi musí být dále přítomna matricová DNA (templát) a směs deoxyribonukleosidtrifosfátů (dNTPs), z nichž se nová DNA tvoří.

Prvním krokem reakce je **denaturace**, při které dochází k oddělení řetězců dvouřetězcové DNA od sebe (94 – 98 °C). Následně se teplota sníží (50 – 65 °C) a dochází k nasednutí primerů k odděleným řetězcům DNA (tzv. **hybridizace**). Poté následuje zvýšení teploty na 65 – 75 °C a probíhá **polymerizační reakce**, kdy DNA polymerasa syntetizuje komplementární vlákno DNA od 3' konce primerů. Tento cyklus se zpravidla opakuje 30-35x. Po třiceti cyklech je vytvořeno několik milionů kopií původní cílové sekvence. [14] Schematické znázornění průběhu PCR je na Obr. 3. Detekce PCR produktů se provádí pomocí agarosové gelové elektroforézy, spektrofotometrickou detekcí imunologicky navázané sondy nebo detekce sondou emitované fluorescence. [17] V této diplomové práci byla využívána detekce PCR produktů pomocí agarosové gelové elektroforézy. Během elektroforézy dochází k pohybu nabitých molekul v elektrickém poli, přičemž hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou záporně nabitě fosfátové skupiny. Agarosové gely jsou vhodné pro separaci nukleových kyselin, jejichž velikost je od několika set bp až po cca 50 kb. [14]



Obr. 3: Znázornění průběhu PCR

Bylo zjištěno, že oblasti nukleotidových sekvencí nacházející se mezi geny 16S a 23S rRNA jsou u jednotlivých bakteriálních druhů mnohem variabilnější v porovnání se samotnými geny pro 16S a 23S rRNA. Toto vedlo k tomu, že identifikace bakterií mléčného kvašení se provádí amplifikací DNA v této oblasti pomocí PCR. [18]

Na základě analýzy podobností mezi nukleotidovými sekvencemi genů v oblasti mezi 16S a 23S rRNA u mnoha druhů rodu *Lactobacillus* byl navržen primer LbLMA1-rev.

Druhým primerem používaným v rodově specifické PCR pro rod *Lactobacillus* je univerzální primer R16-1, který vytváří PCR produkt u 23 druhů rodu *Lactobacillus* a byl vytvořen z ohraničující koncové sekvence kódující 16S rRNA. Oba primery amplifikují pouze genomovou DNA rodu *Lactobacillus*. DNA jiných rodů neamplifikují i když jsou tyto rody úzce příbuzné s rodem *Lactobacillus*. [16]

2.3.2.1 Inhibice polymerasové řetězové reakce

Metoda PCR patří mezi citlivé metody používané k detekci různých mikroorganismů. Tato metoda je citlivá k působení různých inhibitorů, které jsou přítomny v reálných vzorcích. V průběhu PCR tedy může docházet k její inhibici, která může být buď částečná nebo úplná. Inhibice snižuje efektivnost amplifikace a může vést ke snížení citlivosti metody nebo k falešně negativním výsledkům.

Inhibitory PCR se dělí do dvou skupin: intracelulární a extracelulární inhibitory. **Intracelulární inhibitory** se nachází přirozeně uvnitř buněk a jsou to endogenní nukleasy, proteinasy, polysacharidy a proteiny. Druhou skupinu **extracelulárních inhibitorů** vyskytujících se mimo bakteriální buňku představují komponenty vzorků v klinické medicíně jako je močovina, hemoglobin, heparin, IgG, hemin, bilirubin; dále v potravinách, kde jsou to především ionty Ca^{2+} , mléčné proteinasy, glykogen, lipidy; a také látky pocházející z environmentálního prostředí, což mohou být těžké kovy nebo látky fenolové povahy. Dalšími extracelulárními inhibitory mohou být některé složky kultivačních médií, detergenty, antibiotika, celulóza, žlučové kyseliny, soli žlučových kyselin, minerální oleje a další. [19]

Pokud jde o mléčné výrobky v potravinářství, zde jsou inhibitory, jak již bylo zmíněno, zejména Ca^{2+} ionty. Těmito ionty je pak během PCR ovlivňována interakce DNA polymerasy a iontů Mg^{2+} , kdy dochází ke kompetici mezi ionty Ca^{2+} a Mg^{2+} . Ca^{2+} se na DNA polymerasu vážou přednostně a tak dojde k inaktivaci této DNA polymerasy a tím i k inhibici PCR. [20, 21]

Lze rozlišit tři způsoby inhibice PCR, kdy inhibitory působí komplexně v závislosti na fyzikálních, chemických a enzymatických podmínkách reakce. Prvním mechanismem inhibice je neumožnění dostatečné lyze buněk, kdy pak nedochází k uvolnění DNA z buněk. Výsledek PCR pak bude falešně negativní. Ovšem i DNA, která byla z buněk získána, může způsobit inhibici PCR, a to zejména v případech, kdy tato DNA obsahuje mnoho strukturálních proteinů. Dále také může docházet k inhibici vlivem proteolytických enzymů, které mohou způsobit degradaci enzymu používaného k lyzi (př. lysozym).

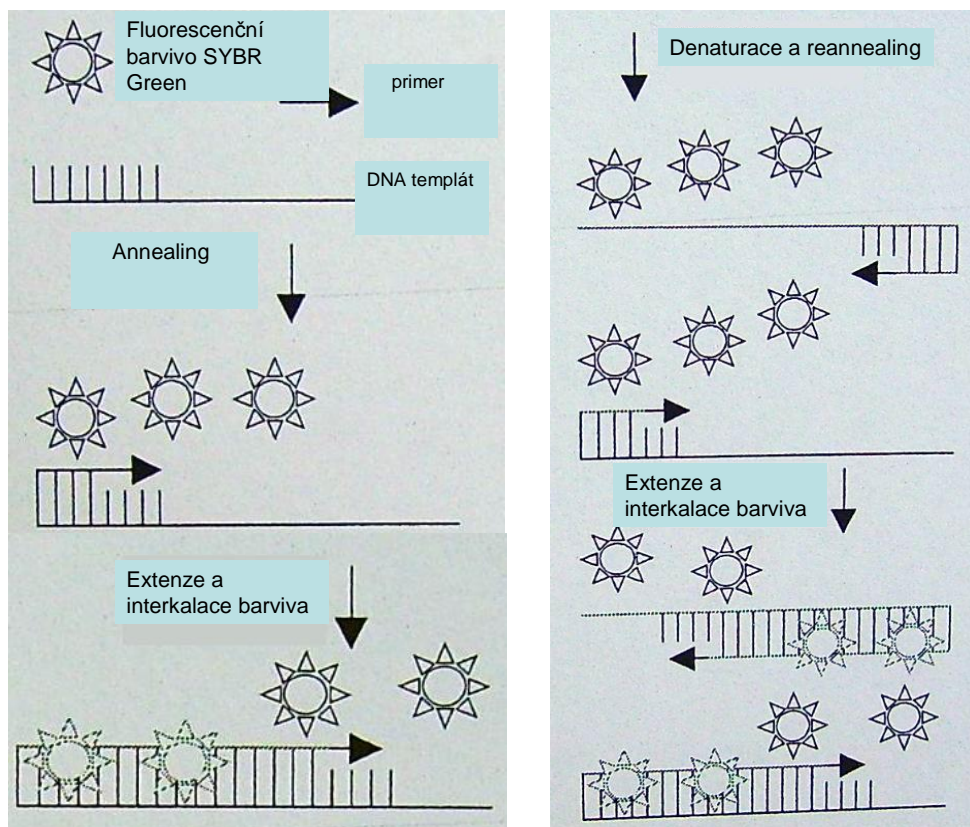
Druhým způsobem inhibice je degradace cílové nukleové kyseliny nebo primerů, případně obsazení cílových míst pro primery. Degradaci cílové molekuly DNA nebo primerů může vyvolat chemická hydrolýza, oxidace, methylace nebo enzymatická degradace během lyze buněk. Dále může dojít k autodegradaci cílové DNA vlivem specifických nukleas, které se mohou vyskytovat ve vzorku či testovaném mikroorganismu. Takovými specifickými nukleasami jsou zejména restriční endonukleasy.

Třetím mechanismem inhibice je inaktivace DNA polymerasy. Při této inhibici dochází k silné interakci lytických enzymů s DNA a proteiny a to má za následek znemožnění vazby DNA polymerasy. Také může docházet k inhibici funkce samotné DNA polymerasy vlivem některých látek obsažených v komplexních vzorcích. To má za následek inaktivaci funkce DNA polymerasy a dochází k její denaturaci. [19]

2.3.2.2 Kvantitativní Real Time PCR

Kvantitativní Real Time PCR (qPCR) je metoda, která je podobná klasické PCR metodě. Hlavní rozdíl mezi oběma metodami spočívá v tom, že při běžné PCR je množství PCR produktu měřeno po skončení amplifikace, kdežto při qPCR je toto množství měřeno po každém amplifikačním cyklu. Principem metody je interkalace fluorescenčního barviva do molekul dsDNA přičemž intenzita fluorescence je v každém cyklu zaznamenávána (Obr. 4). Fluorescenční signál je přímo úměrný koncentraci dsDNA PCR produktu ve vzorku. Fluorescence je detekována nad určitou hranicí, kterou představuje tzv. prahový cyklus (C_t hodnota).

Jak již bylo zmíněno, barvivo SYBR Green se váže k dsDNA PCR produktu. Specifičnost této metody lze zvýšit použitím tzv. disociační křivky, kde se znázorňuje nárůst fluorescence v průběhu akumulace PCR produktů a pokles dvouřetězcových produktů, které disociují na jednořetězcové během zahřívání. To tedy umožňuje rozlišit správné PCR produkty od možných artefaktů. [22]



Obr. 4: Schématické znázornění průběhu kvantitativní Real Time PCR

2.4 Magnetická separace

Techniky založené na magnetické separaci využívající magnetické mikro- a nanočástice jsou novým trendem mezi separačními technikami v posledních dvou desetiletích v oblastech chemie, biologie, lékařství a biochemie. Tyto techniky jsou jednou z možností,

jak v některých případech usnadnit určité běžně používané separační a purifikační postupy. Použití magnetických nosičů umožňuje rychlé a snadné získání látek a organismů z komplexních heterogenních reakčních směsí. Velkou výhodou je, že není zapotřebí ředění vzorku, snižuje se spotřeba organických činidel používaných v klasických metodách izolace DNA a nedochází ke ztrátám nosiče během promývání. Dále tyto separační techniky umožňují miniaturizaci, snadnou manipulaci a také automatizaci separačního procesu. Není zapotřebí používání filtrace ani centrifugace. Tím se jeví tato technika ekonomicky výhodná a tudíž vhodná nejen pro práci laboratorní, ale také ve výrobní praxi. [23, 24]

Magnetické nosiče vykazují své magnetické vlastnosti jen v přítomnosti vnějšího magnetického pole. Nedochází ke vzniku reziduálního magnetismu a tak pokud se tyto částice nenachází v bezprostřední blízkosti magnetického pole, vytváří homogenní suspenzi. [24]

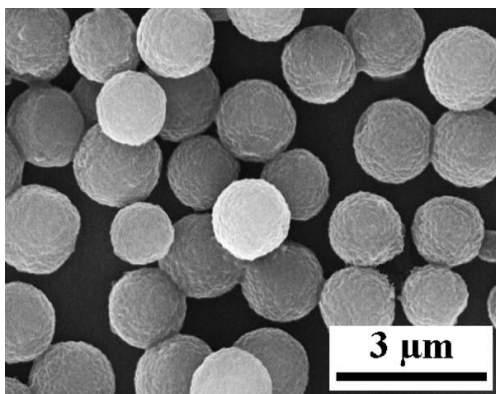
Základem přípravy magnetických částic je vytvoření jádérka určité velikosti mající magnetické vlastnosti. Dalším krokem je pokrytí této částice inertní nízko- nebo vysokomolekulární sloučeninou zajišťující stabilizaci a zabraňující nežádoucím nespecifickým reakcím, nebo lze provést enkapsulaci této částice do polymeru nebo anorganických materiálů. Poslední krok vyžaduje funkcionalizaci, kdy dochází k zavádění vhodných funkčních skupin pro určitou aplikaci.

Nejvíce používanými polymery používanými k pokrytí magnetických jáderek je polystyren a poly(methyl methakrylát) (PMMA). Bohužel tyto materiály mají nevýhodu v jejich hydrofobních vlastnostech. Mezi další nevýhody polystyrénových magnetických částic je nespecifická adsorpce proteinů, což vede k ovlivnění signálu pozadí. Polystyren také není snadné chemicky modifikovat. Zavádění funkčních skupin či jiných ligandů je tedy obtížnější.

PHEMA je hydrofilní nosič, jehož výhodou je biokompatibilita, mechanická stabilita, netoxičita, a také nízká nespecifická adsorpce proteinů v porovnání s hydrofobními nosiči. To jsou vlastnosti důležité pro využití v biomedicínských aplikacích. Na matrici je nutné zavádět funkční skupiny, protože reaktivita hydroxylových skupin s různými ligandy není velká. Těmito funkčními skupinami jsou například aminoskupina, tosylová skupina, polyethyleniminová skupina. Dalšími polymery, které lze využít k přípravě magnetických částic s funkčními skupinami je například celulóza, dextran, polysacharidy a jiné. [23]

Jedním z typem magnetických mikročástic, které jsou používány k izolaci bakteriální DNA je poly(2-hydroxyethyl methakrylát-*co*-glycidyl methakrylát) - P(HEMA-*co*-GMA), které jsou pokryté karboxylovými skupinami. Uvedené částice jsou zobrazeny na Obr. 5.

Magnetickou neporézní mikročástici P(HEMA-*co*-GMA) lze připravit disperzní kopolymerizací 2-hydroxyethyl methakrylátu (HEMA) a glycidyl methakrylátu (GMA) v přítomnosti koloidních částic magnetitu (Fe_3O_4) pokrytých kyselinou olejovou. Tato kopolymerizace je iniciována dibenzoyl peroxidem a stabilizována acetát-butyrátem celulosy. Poté se hydroxylové skupiny mikročástic oxidují 2 % vodným roztokem manganistanu draselného v kyselém prostředí kyseliny sírové. [25]



Obr. 5: Magnetické mikročástice P(HEMA-*co*-GMA) [25]

Pokud jde o tvar, v praxi se osvědčila forma kuličky, protože poskytuje výborné hydrodynamické vlastnosti a tudíž snadnější zacházení jak v separacích prováděných vsádkově, tak i kontinuálních procesech. Částice, které mají nepravidelný tvar jsou mnohem více náchylné k mechanickému tření a zničení. Nejlepších výsledků magnetické separace je dosaženo, pokud jsou částice monodisperzní nebo mají alespoň co nejmenší velikostní distribuci. Magnetické částice pak mají jednotné chemické i fyzikální vlastnosti a v roztocích nedochází k jejich agregaci tak snadno jako u částic polydisperzních. Co se týče velikosti magnetických částic, je upřednostňována velikost mikrometrová nebo i menší, protože částice pak mají větší specifický povrch, kde může docházet k přichycení funkčních skupin nebo k imobilizaci biomolekul. Příliš malé částice ale také nejsou vhodné, jelikož může dojít ke značnému snížení jejich magnetické citlivosti. Je tedy nutné vždy najít soulad mezi velikostí aktivního povrchu a magnetickou citlivostí.

Vlastní proces separace je založen na interakci ligandů na povrch nosiče s cílovými molekulami. Dochází k různým interakcím, od nespecifických jako jsou vazby hydrofobní, iontové či vodíkové, přes skupinově specifické vazby až po specifické afinitní interakce, což mohou být interakce enzym-inhibitor, biotin-avidin, protilátka-antigen a další. [23] Magnetická separace nalézá uplatnění v různých aplikacích jako je izolace enzymů a jejich inhibitorů, izolace antigenů a protilátek, imobilizace enzymů s následným použitím těchto enzymů k dalším účelům. Dalším možným použitím je odstraňování těžkých kovů z roztoků, imobilizace léčiv, separace určitých buněk z heterogenního prostředí, odstranění organických xenobiotik, kterými jsou například různé mutagenní nebo kancerogenní látky, dále je možné použití při imunopurifikaci a konečně samotná izolace a purifikace DNA. [26] Cílové buňky mohou být přichyceny na magnetické mikročástice, které nesou specifické protilátky a mohou být tak separovány z komplexního prostředí obsahujícího extracelulární inhibitory nebo kompetující mikroflóru. [27]

Izolace nukleových kyselin hraje důležitou úlohu v klinické diagnostice mikroorganismů, virů, ale také třeba v genových manipulacích. K izolaci nukleových kyselin lze použít postupy založené na selektivní nebo neselektivní izolaci cílových molekul. K separaci cílových nukleových kyselin ze směsi se používají magnetické nosiče funkcionalizované streptavidinem nebo magnetické nosiče s imobilizovaným krátkým oligonukleotidem. Separace s využitím streptavidinových magnetických částic využívá interakce s cílovou nukleovou kyselinou modifikovanou biotinem. V obou případech je separace založena na hybridizaci mezi cílovou komplementární DNA a oligonukleotidem na magnetické částici. [23]

Při nespecifické izolaci bakteriální DNA, magnetické částice vážou DNA reverzibilně v přítomnosti vysokých koncentrací poly(ethylenglykolu) (PEG 6000) a chloridu sodného. PEG 6000 má důležitou úlohu při navození kondenzace DNA, což vede ke změně stavu DNA na kulovitě-spirálovitý. Tento tvar je nezbytný k tomu, aby mohlo dojít k navázání DNA na záporně nabitě karboxylové skupiny magnetických částic, jelikož DNA sama nese záporný náboj. [25, 28]

Důležité je stanovit kritickou koncentraci a také stupeň polymerace PEG a koncentraci chloridu sodného, aby kondenzace DNA byla možná. Bylo zjištěno, že kritická koncentrace PEG klesá se stupněm polymerace PEG a koncentrací chloridu sodného. [28] DNA, která má kulovitě-spirálovitý tvar, je stabilnější v případě, kdy PEG dosahuje vyššího stupně polymerace a koncentrace chloridu sodného je také vyšší. [29]

III. CÍL PRÁCE

Cílem práce byla optimalizace metody izolace bakteriální DNA pomocí tří různých metod: fenolovou extrakcí, vysolováním chloridem sodným a magnetickou separací využívající reverzibilní adsorpce nukleových kyselin na různé magnetické nosiče. Byl studován vliv použitého postupu izolace DNA na její čistotu s cílem získat DNA v kvalitě vhodné pro polymerasovou řetězovou reakci (PCR). Navržené postupy byly použity k identifikaci bakterií rodu *Lactobacillus* v mléčných výrobcích.

IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a metody

4.1.1 Použité mikroorganismy

K izolaci DNA byly použity tři bakteriální kmeny z České sbírky mikroorganismů v Brně, a to kmeny *Lactobacillus amylovorus* CCM 4380^T, *Lactobacillus zea* CCM 7069^T a *Lactobacillus plantarum* CCM 7039^T.

4.1.2 Mléčné výrobky

- Jihočeský zákys s ovocem jahoda

Kysaný mléčný výrobek s probiotickou kulturou *L. acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* a *Streptococcus thermophilus*.



100 g výrobku obsahuje 2,8 g bílkovin, 10,4 g sacharidů, 1,2 g tuků, 3,0 mg vitamínu C, 0,5 mg vitamínu E a 0,1 mg betakarotenu.

Výrobce MADETA a.s., České Budějovice, ČR

- Revital active

Bílý jogurt s inulinem a probiotickou kulturou *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* a *Bifidobacterium* sp.

100 g výrobku obsahuje 4,1 g bílkovin, 6,5 g sacharidů, 2,9 g tuků, 0,5 g inulinu

Výrobce OLMA a.s., Olomouc, ČR



- Actimel višň

Mléčný výrobek s obsahem probiotické kultury *L. casei*.

1 lahvička obsahuje 2,7 g bílkovin, 11,8 g sacharidů a 1,20 g tuků.

Výrobce DANONE a.s., Benešov, ČR



4.1.3 Chemikálie

- Agarosa (Serva, Heidelberg, Německo)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma, St. Louis, USA)
- Ethanol pro UV spektroskopii (Penta, Praha, ČR)
- Ethidium bromid (Sigma, St. Louis, USA)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, Německo)
- Fenol (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Ficoll 400 (Pharmacia, Uppsala, Švédsko)
- Chlorid sodný (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Chloroform (Penta, Praha, ČR)
- Isoamylalkohol p.a. (Amresco, Solon, USA)
- Kyselina boritá (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Lysozym (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- MRS agar (Oxoid, Londýn, Velká Británie)
- MRS broth (Oxoid, Londýn, Velká Británie)
- Octan sodný (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- PCR vkládací pufr Yellow Load (TopBio, Praha, ČR)
- Poly(ethylenglykol) 6000 (Fluka, Buchs, Německo)
- Proteinasa K (Sigma, St. Louis, USA)
- RNasa A (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- Tris-base (Amresco, Solon, USA)
- Tris-HCl (Amresco, Solon, USA)

Ostatní chemikálie, které byly používány, byly v čistotě p.a. a pocházely z běžně dostupných komerčních zdrojů.

4.1.4 Magnetické částice

K izolaci DNA bylo používáno 5 různých magnetických částic:

- Silikagel (Merck, 10x ředěný)
- Dynal DNA Direct (Dynal, Oslo, Norsko)
- P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml) (Makromolekulární ústav AV ČR, ing. Daniel Horák, CSc.)
- P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml) (Makromolekulární ústav AV ČR, ing. Daniel Horák, CSc.)
- Perovskit 439 (Fyzikální ústav AV ČR, doc. Ing. Emil Pollert, DrSc.)

4.1.5 Roztoky a media

4.1.5.1 Kultivační media pro bakterie rodu *Lactobacillus*

- **MRS medium:** 52 g M.R.S. bujónu bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody; výsledné pH bylo 6,2. Sterilizace probíhala autoklávováním při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

- **MRS agar:** 62 g M.R.S. agaru bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody a sterilizace probíhala jako u přípravy MRS media.

4.1.5.2 Roztoky pro přípravu hrubých lyzátů

Jednotlivé roztoky byly připravovány podle návodu Španové a Ritticha (2002).

- **Roztok A:** 10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 5 mM EDTA (pH 8,0)

Roztok byl připravován sterilně ze zásobních roztoků (1 M Tris-HCl a 0,5 M EDTA).

- **Roztok B:** 10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 5 mM EDTA (pH 8,0), lysozym 3 mg/ml (15mg/ml)

Roztok byl připravován sterilně ze zásobních roztoků (1 M Tris-HCl a 0,5 M EDTA) a těsně před použitím byl přidáván lysozym.

- **EDTA (0,5 M, pH 8,0)**

202,23 g EDTA . 2 H₂O bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody za stálého míchání, pH bylo upraveno pomocí 1 M NaOH na hodnotu 8,0 a následně byl roztok doplněn na celkový objem 1000 ml.

- **1 M Tris-HCl**

V 80 ml destilované vody bylo rozpuštěno 12,1 g Tris-base. pH upraveno na 7,8 pomocí koncentrované HCl a doplněno destilovanou vodou do 100 ml.

4.1.5.3 Roztoky pro izolaci genomové DNA

- **CIZ:** směs chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1

- **3 M octan sodný**

40,8 g trihydrátu octanu sodného, 12 ml kyseliny octové

Složky byly doplněny destilovanou vodou do 100 ml, pH upraveno na 5,5 a roztok byl přefiltrován přes filtrační papír.

- **TE pufr**

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

4.1.5.4 Roztoky pro agarosovou gelovou elektroforézu

(Podle Španové a Ritticha (2002), Učební texty laboratorních cvičení Speciální metody analýzy mikroorganismů.; nepublikováno)

- **0,8 % agarosový gel:** agarosa 0,8 g, destilovaná voda do 100 ml
- **1,5% agarosový gel:** agarosa 1,5 g, destilovaná voda do 100 ml
- **1,8 % agarosový gel:** agarosa 1,8 g, destilovaná voda do 100 ml

- **TBE pufr (5x koncentrovaný)**

54 g Tris-HCl, 27,5 g kyseliny borité, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) Zásobní roztok byl připraven smícháním uvedených množství komponent a doplněn destilovanou vodou do objemu 1000 ml. Roztok byl přefiltrován a před použitím ředěn 10x destilovanou vodou.

- **Ethidiumbromid zásobní roztok:** 5 mg/ml (uchováván ve tmavé nádobě)

- **Ethidiumbromid barvicí roztok:** 0,5 µg/ml

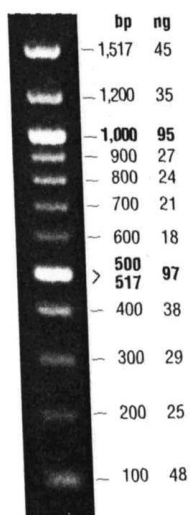
- **Nanášecí pufr (6x koncentrovaný):**

0,04 g bromfenolové modře, 2,5 g Ficoll 400, 100 ml destilované vody

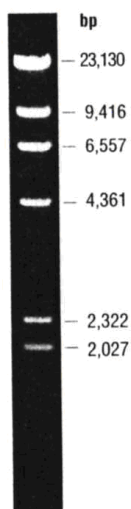
Pufr byl před použitím ředěn se vzorkem v poměru 1:5.

4.1.6 DNA standardy používané v agarosové gelové elektroforéze

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



- **λHindIII (New England Biolabs, Ipswich, Velká Británie)**



4.1.7 Komponenty pro PCR

- 10 x koncentrovaný PCR reakční pufr (Top-Bio, Praha, ČR)
- *Taq* DNA polymerasa 1.1 (1 U/μl) (Top-Bio, Praha, ČR)
- PCR dNTP mix (10 mM) (Top-Bio, Praha, ČR)
- PCR voda - voda pro injekce ČSL 4 (Biotika, Slovenská L'upča, SR)
- Oligonukleotidové primery: LbLMA 1-rev; R 16-1 (Oligo- Biotech, Hradec Králové, ČR)
- PPP Master Mix (Top-Bio, Praha, ČR)
- XL-qPCR 2x SYBR MIX (Top-Bio, Praha, ČR)

4.1.8 Přístroje a pomůcky

- Fotoaparát Polaroid DS 34 se žlutým filtrem (Polaroid, Cambridge, USA)
- Magnetický separátor (Dynal, Oslo, Norsko)
- Mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Varšava, Polsko)
- Minicentrifuga MINI Spin 13 400 min⁻¹ (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- MiniCykler PTC-150TM (MJ Research)
- NanoPhotometerTM (Implen, Německo)
- Termocykler PTC – 200TM (MJ Research, Watertown, USA)
- Transilluminátor TVR-321A (Spectroline, Paramount, 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)
- Přístroj na měření optické hustoty buněk - Cell density meter biowave WPA CO 8000 (Biochrom, Cambridge, Velká Británie)
- Laboratorní sklo a další běžné pomůcky

4.1.9 Metody

Většina popsaných metod byla prováděna podle Španové a Ritticha (Učební texty laboratorních cvičení - Speciální metody analýzy mikroorganismů I. (2002), nepublikováno). V jiných případech je zdroj uveden.

4.1.9.1 Kontrola čistoty bakteriální kultury

Kontrola čistoty bakteriálních kultur jednotlivých kmenů byla prováděna pomocí křížového roztěru bakteriální kultury narostlé v tekutém živném médiu na misku s pevným MRS médiem. Kultivace probíhala přes noc při teplotě 37 °C. Poté byl kontrolován vzhled kolonií a čistota kultury.

4.1.9.2 Kultivace bakteriálních buněk

Bakteriální buňky byly kultivovány v tekutém MRS médiu přes noc při 37 °C.

4.1.9.3 Příprava hrubých lyzátů buněk z čistých bakteriálních kultur

- 1 ml kultury buněk narostlé přes noc při 37 °C v tekutém živném MRS médiu bylo přeneseno do zkumavky Eppendorf a centrifugováno 3 min při 10 000 ot/min
- Po odlití supernatantu a okapání sedimentu byl získaný sediment resuspendován v 1 ml lyzačního roztoku A (10 mM Tris pH 7,8; 5 mM EDTA pH 8,0)
- Suspenze byla opět centrifugována 3 min při 10 000 ot/min
- K sedimentu bylo přidáno 500 µl roztoku B (roztok A s lysozymem, kdy koncentrace lysozymu činila 3 mg/ml) a následně probíhala inkubace vzorku 1 hodinu při laboratorní teplotě
- K suspenzi bylo přidáno 25 µl 10 % SDS a 5 µl proteinasy K (100 µg/ml). Směs byla inkubována 3 hodiny při 55 °C do projasnění roztoku

4.1.9.4 Příprava hrubých lyzátů z tekutých mléčných výrobků

- Z tekutého mléčného výrobku bylo odebráno 2x 1 ml vzorku do dvou 1,5 ml Eppendorfových zkumavek a vzorky byly následně centrifugovány 5 min při 14 000 ot/min
- Supernatant byl opatrně slit a sediment se nechal dobře okapat
- Sediment byl promyt v 1 ml sterilní vody a opět centrifugován 5 min při 14 000 ot/min a supernatant byl opět slit a sediment se nechal dobře okapat
- K sedimentu byl pak přidán 1 ml lyzačního roztoku B a byl v něm resuspendován
- Inkubace s tímto roztokem B probíhala 2 hodiny při laboratorní teplotě
- Ke vzorku bylo přidáno 50 µl 20 % SDS a 5 µl proteinasy K (1 mg/ml) a vzorky byly inkubovány při 55 °C do druhého dne

4.1.9.5 Izolace genomové DNA z hrubých lyzátů fenolovou extrakcí

- K hrubému lyzátu buněk bylo přidáno 10 µl RNasy A (100 µg/ml) a po promíchání probíhala inkubace 15 min při 37 °C
- Následně byl k lyzátu buněk přidán stejný objem predestilovaného fenolu (pH 7,8) a směs byla promíchávána 4 min
- Vzorek byl centrifugován 3 min při 10 000 ot/min
- Pomocí špičky s ustřiženým hrotem byla odebrána vodní fáze s DNA do čisté zkumavky
- K této vodní fázi s DNA bylo přidáno 700 µl CIZ směsi (chloroform: isoamylalkohol v poměru 24:1) a promícháváno 4 min
- Vzorek byl centrifugován 3 min při 10 000 ot/min a vodní fáze s DNA byla odebrána do nové Eppendorfovy zkumavky

4.1.9.6 Přesrážení DNA ethanolem

- Ke vzorku DNA bylo přidáno 1/10 objemu 3 M octanu sodného a směs promíchána
- Poté byl ke směsi přidán 1 ml 96 % ethanolu a směs opět promíchána
- DNA byla srážena při – 20 °C po dobu 30 min
- Vzorek byl centrifugován 15 min při 15 000 ot/min

- Supernatant byl opatrně slit a sediment sušen v exsikátoru 15 min
- K sedimentu bylo přidáno 200 μ l TE pufru
- Byla provedena agarosová gelová elektroforéza (0,8 % agarosový gel) k ověření přítomnosti a intaktnosti DNA

4.1.9.7 Izolace genomové DNA z hrubých lyzátů vysolováním chloridem sodným

Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk vysolováním NaCl byla prováděna podle postupu uvedeného v DP E. Němcové. [30]

- K 500 μ l hrubého lyzátu byl přidán definovaný objem 5,5 M NaCl a sterilní destilované vody do objemu 1 ml (Tabulka 3)
- Směs byla promíchávána 10 min a centrifugována 15 min při 10 000 ot/min
- Supernatant byl odebrán do nové mikrozkušavky

4.1.9.8 Přesrážení DNA v supernatantu po vysolování chloridem sodným ethanolom

Přesrážení DNA bylo prováděno podle postupu uvedeného v DP E. Němcové. [30]

- K 50 μ l supernatantu bylo přidáno takové množství sterilní destilované vody, aby výsledná koncentrace NaCl byla asi 0,3 M a 2,5x větší množství ethanolu (Tabulka 3)
- DNA byla srážena 30 min. při -20 °C a byla centrifugována 15 min při 10 000 ot/min
- Sediment byl vysušen v exsikátoru a resuspendován v 120 μ l TE pufru
- 10 μ l získané DNA bylo z každé koncentrace naneseno na 0,8 % agarosový gel a byla provedena agarosová gelová elektroforéza

Tabulka 3: Vysolování DNA z hrubých lyzátů buněk pomocí NaCl [30]

HL(μ l)	Izolace DNA			Purifikace DNA	
	5,5 M NaCl (μ l)	H ₂ O (μ l)	Výsledná c NaCl (M)	H ₂ O (μ l)	Ethanol (μ l)
500	100	400	0,55	50	250
500	200	300	1,10	150	500
500	300	200	1,65	250	750
500	400	100	2,20	350	1000
500	500	0	2,75	450	1250

HL hrubý lyzát buněk

4.1.9.9 Izolace genomové DNA z hrubých lyzátů pomocí magnetických nosičů

- Byla připravena separační směs podle Tabulky 4 v příslušném pořadí pipetování jednotlivých komponent
- Směs byla promíchána a inkubována 10 min při laboratorní teplotě
- Částice s navázanou DNA byly při laboratorní teplotě separovány prostřednictvím magnetu během 10 min
- Byl odpipetován supernatant a uchován pro pozdější analýzu
- Magnetický nosič s navázanou DNA byl promyt 500 μ l 70 % ethanolu a následovalo separování částic magnetem 2 min při laboratorní teplotě
- Mikrozkušavky byly sušeny 10 min při 37 °C v horizontální poloze

- DNA byla eluována do 100 μl TE pufru 10 min při laboratorní teplotě
- Poté byly částice separovány magnetem 2 min při laboratorní teplotě a eluovaná DNA byla napipetována do čisté mikrozkušavky

Paralelně probíhala izolace v 8 a 16 % PEG 6000. Jednotlivé komponenty byly smíchány v poměrech dle Tabulky 4 (celkový objem směsi byl 1000 μl). Na agarosový gel bylo nanášeno 30 μl izolované DNA a 10 μl standardu.

Tabulka 4: Příprava separační směsi

Pořadí komponent	Komponenta	PEG 6000 (%)/ μl	
		8	16
1.	H ₂ O	200	0
2.	NaCl (5M)	400	400
3.	hrubý lyzát	100	100
4.	PEG (40 %)	200	400
5.	magn.částice	100	100
Celkový objem		1000	1000

4.1.9.10 Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA pomocí přístroje NanoPhotometer™

Koncentrace DNA byla měřena pomocí přístroje NanoPhotometer™. Absorbance byla měřena při 230, 260, 280 a 320 nm a jako blank byl použit TE pufr. Koncentraci lze vypočítat z Lambert-Beerova zákona:

$$A = c \cdot \varepsilon \cdot l$$

A = absorbance při určité vlnové délce

c = koncentrace DNA (mol/l)

ε = molární absorbanční koeficient ($\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

l = délka optické dráhy (cm)

Byla použita velikost víčka 1 mm Lid (Factor 5 a 10), což v případě dsDNA znamená, že lze měřit v rozsahu koncentrací DNA 7 – 350 ng/ μl v případě použití Lid (Factor 5) a 15 – 700 ng/ μl v případě použití Lid (Factor 10).

4.1.9.11 Elektroforéza nukleových kyselin v agarosovém gelu

Agarosová gelová elektroforéza byla použita k ověření přítomnosti, intaktnosti a kvality izolované DNA. K ověření přítomnosti a intaktnosti DNA byl použit gel o hustotě agarosy 0,8 %, k detekci PCR produktů gel o hustotě agarosy 1,8%.

Agarosový gel byl připraven smícháním odpovídajícího množství agarosy podle hustoty gelu a 0,5x koncentrovaného TBE pufru. Agarosa byla za horka rozpuštěna v TBE pufru. Poté byl roztok nalit do elektroforetické vaničky s hřebínkem. Následně se gel nechal ztuhnout při laboratorní teplotě po dobu asi 30-60 min. Před samotným nanášením vzorků byl vyjmut hřebínek

Vzorek byl připraven smícháním DNA, TE pufru a nanášecího pufru v poměru 5:1. Po nanesení vzorku do komůrky gelu byl gel vložen do elektroforetické vany tak, aby negativně nabitá DNA mohla migrovat ke kladně nabitě anodě. Následně byl gel převrstven 0,5 x koncentrovaným TBE pufrem. Elektroforéza probíhala při napětí 60 V dokud barvivo nanášecího pufru nedoputovalo do 2/3 agarosového gelu.

Po ukončení elektroforézy byla DNA na gelu barvena ve vodní lázni s ethidium bromidem (0,5 µg/ml) a následně detekována pomocí transilluminátoru v UV světle při 305 nm. Agarosový gel s DNA byl fotografován buď digitálním fotoaparátem nebo kamerou Polaroid DS 34 na Polaroid film TT667.

4.1.9.12 Metody PCR

▪ Polymerasová řetězová reakce s rodově specifickými primery pro rod *Lactobacillus*

Bakterie patřící do rodu *Lactobacillus* byly detekovány pomocí amplifikace úseku DNA o délce asi 250 bp, jehož oblast vymezují dva primery: LbLMA 1 a R 16-1. [16] Komponenty PCR byly promíchány, krátce zcentrifugovány (Tabulka 5) Poté byla připravena DNA matrice o koncentraci 10 ng/µl. Bylo připraveno 25 µl PCR směsi do 200 µl sterilních PCR zkumavek. Jako negativní kontrola byla použita PCR směs bez matricové DNA. Poté byla směs umístěna do termocycleru a spuštěn program LBC ROD (Tabulka 6). Po skončení reakce byly PCR produkty detekovány pomocí agarosové gelové elektroforézy na 1,8 % gelu.

Tabulka 5: Složení reakční směsi pro rodově specifickou PCR rodu *Lactobacillus*

Komponenty	Objem (µl)
PCR voda	19,0
10x reakční pufr kompletní	2,5
směs dNTPs (10 mM)	0,5
primer LbLMA 1 (10 pmol/µl)	0,5
primer R 16-1 (10pmol/µl)	0,5
Taq DNA polymerasa 1.1 (1 U/µl)	1,0
matricová DNA (10 ng/µl)	1,0
Celkový objem	25,0

Tabulka 6: Program LBC ROD

Krok č.	Teplota (°C)	Proces	Čas (min)
1	95		5
2	95	denaturace DNA	0,5
3	55	hybridizace primerů	0,5
4	72	syntéza DNA řetězce	0,5
5	29x krok 2,3,4		
6	95	denaturace DNA	0,5
7	55	hybridizace primerů	0,5
8	72	syntéza DNA řetězce	10
9	10	chlazení	dle potřeby

- **Příprava PCR směsi s univerzálními primery pro doménu Baktérie**

Bakterie patřící do rodu *Lactobacillus* byly také detekovány pomocí primerů DG 74 a RW 01 [31], přičemž byl amplifikován úsek DNA o délce 370 bp. Pomocí uvedených primerů lze detekovat všechny druhy domény Baktérie.

Oproti polymerasové řetězové reakci s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* se proces lišil množstvím jednotlivých komponent (Tabulka 7) a použitým programem UNIV 30 (Tabulka 8). Amplikony byly detekovány pomocí agarosové gelové elektroforézy na 1,5 % agarosovém gelu.

Tabulka 7: Složení reakční směsi s univerzálními primery pro PCR domény Baktérie

Komponenty	Objem (μl)
PCR voda	14,5
10x reakční pufr kompletní	2,5
směs dNTP (10 mM)	1,0
primer DG 74 (10 pmol/μl)	1,0
primer RW 01 (10 pmol/μl)	1,0
Taq DNA polymerasa 1.1 (1 U/μl)	2,0
MgCl ₂	2,0
matricová DNA (10 ng/μl)	1,0
Celkový objem	25,0

Tabulka 8: Program UNIV 30

Krok č.	Teplota (°C)	Proces	Čas (min)
1	95		5
2	95	denaturace DNA	1
3	60	hybridizace primerů	1
4	72	syntéza DNA řetězce	2
5	28x krok 2,3,4		
6	95	denaturace DNA	1
7	60	hybridizace primerů	1
8	72	syntéza DNA řetězce	10
9	10 (chlazení)		dle potřeby

- **Polymerasová řetězová reakce pro rod *Lactobacillus* s využitím PPP Master Mixu (Top-Bio, Taq-Purple DNA Polymerasa PCR Master Mix s 5 mM MgCl₂)**

V reakci byl použit 2x koncentrovaný PPP Master Mix, což umožňuje rychlou přípravu reakční směsi bez nutnosti pipetování jednotlivých komponent zvlášť. PPP Master Mix obsahoval 400 μM dATP, 400 μM dCTP, 400 μM dGTP, 400 μM dTTP, příslušný pufr (150 mM Tris-HCl, pH 8,8, 40 mM (NH₂)SO₄, 0,02 % Tween 20), 5 mM MgCl₂, stabilizátory, 100 U/ml Taq Purple DNA polymerasu, aditiva. Není zapotřebí dodávat ani nanášecí pufr pro gelovou elektroforézu PCR produktů, jelikož barvivo je již ve směsi obsaženo. Reakce se oproti dvěma předcházejícím reakcím lišila objemem komponent (Tabulka 9). Do reakce se

přidávají rodově specifické primery pro rod *Lactobacillus* a DNA matrice. Byl použit program LBC ROD (Tabulka 6).

Tabulka 9: Složení reakční směsi s PPP Master Mixem pro PCR rodu *Lactobacillus*

Komponenty	Objem (μl)
PPP Master Mix	12,5
primer LbLMA 1 (10 pmol/μl)	1,0
primer R 16-1 (10 pmol/μl)	1,0
matricová DNA (10 ng/μl)	1,0
PCR voda	9,5
Celkový objem	25,0

▪ Kvantitativní Real Time PCR

DNA izolovaná z reálných vzorků byla amplifikována a kvantifikována pomocí kvantitativní Real Time PCR (qPCR). V qPCR byly opět použity primery LbLMA1 a R 16-1, které jsou specifické pro rod *Lactobacillus*. Složení reakční směsi je uvedeno v Tabulce 10. Byl použit program qLBC ROD (Tabulka 11). Po skončení reakce byly pro kontrolu qPCR produkty detekovány pomocí agarosové gelové elektroforézy na 1,8 % gelu.

Tabulka 10: Složení reakční směsi pro rodově specifickou qPCR rodu *Lactobacillus*

Komponenty	Objem (μl)
PCR voda	9,5
XL-qPCR 2x SYBR MIX	12,5
primer LbLMA 1 (10 pmol/μl)	1,0
primer R 16-1 (10 pmol/μl)	1,0
matricová DNA	1,0
Celkový objem	25,0

Tabulka 11: Program qLBC ROD

Krok č.	Teplota (°C)	Proces	Čas (min)
1	95		5,0
2	95	denaturace DNA	0,5
3	55	hybridizace primerů	0,5
4	72	syntéza DNA řetězce	0,5
5	39x krok 2,3,4		
6	95	denaturace DNA	0,5
7	55	hybridizace primerů	0,5
8	72	syntéza DNA řetězce	10,0

V. VÝSLEDKY A DISKUZE

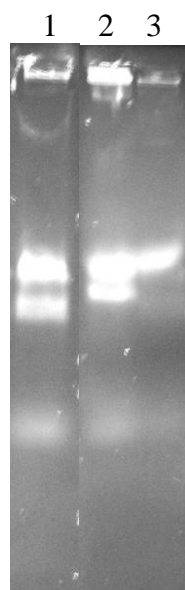
5.1. Kontrola čistoty bakteriální kultury

Kultury bakteriálních kmenů *L. amylovorus* CCM 4380^T, *L. plantarum* CCM 7039^T a *L. zea* CCM 7069^T narostlé přes noc v MRS mediu byly křížovým roztěrem rozetřeny a kultivovány na miskách s pevným MRS mediem, jak je uvedeno v kapitole Metody.

- Všechny tři kmeny tvořily bílé kolonie s hladkým okrajem a lesklým povrchem o velikost cca 1-2 mm, z čehož lze usuzovat, že bakteriální buňky byly čisté a tedy i vhodné pro izolaci genomové bakteriální DNA

5.2 Příprava hrubých lyzátů buněk z 1 ml čistých bakteriálních kultur

Hrubé lyzáty buněk byly připravovány z narostlých kultur lyzí pomocí lyzačního roztoku, což je podrobněji popsáno v kapitole Metody. Hrubé lyzáty všech tří druhů rodu *Lactobacillus* byly nanášeny na agarosový gel a byly podrobeny agarosové gelové elektroforéze (Obr.6, Tabulka 12).



Obr. 6: Agarosová gelová elektroforéza hrubých lyzátů buněk z 1 ml čistých bakteriálních kultur

Tabulka 12: Schéma nanesení vzorků hrubých lyzátů buněk z 1 ml čistých bakteriálních kultur na agarosový gel

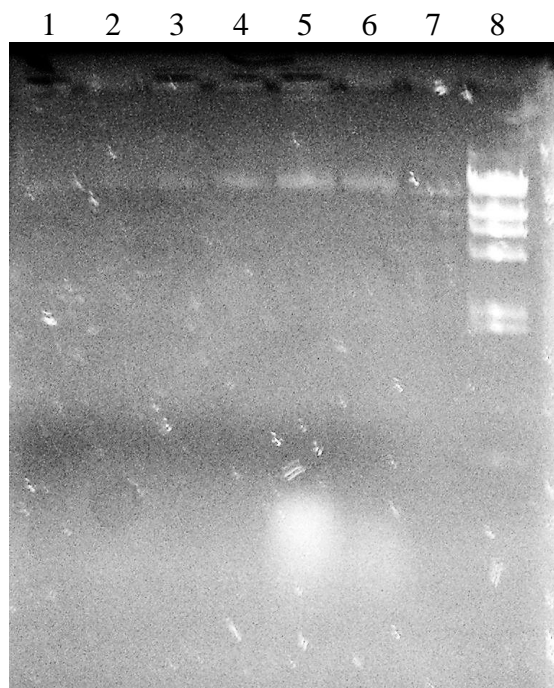
Běh	Kmen	DNA
1	<i>L. zea</i> CCM 7069 ^T	+++
2	<i>L. plantarum</i> CCM 7039 ^T	+++
3	<i>L. amylovorus</i> CCM 4380 ^T	+++

+++ DNA byla detekována ve velkém množství.

- DNA v hrubých lyzátech byla detekována, buňky tedy byly rozrušeny.

5.3 Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk rodu *Lactobacillus* fenolovou extrakcí

K izolaci celkové DNA pomocí fenolové extrakce byly použity 2 vzorky hrubých lyzátů od každého kmene (2x 500 μ l). Celkem tedy bylo nanášeno na gel 6 vzorků hrubých lyzátů po fenolové extrakci a následném vysrážení ethanolem. Přítomnost a intaktnost DNA byla ověřena pomocí agarosové gelové elektroforézy (Obr. 7, Tabulka 13). Na gel bylo nanášeno 10 μ l eluované DNA.



Obr. 7: Agarosová gelová elektroforéza celkové DNA izolované z hrubých lyzátů různých kmenů rodu *Lactobacillus* pomocí fenolové extrakce

Tabulka 13: Schéma nanesení vzorků celkové DNA izolované z hrubých lyzátů různých kmenů rodu *Lactobacillus* fenolovou extrakcí na agarosový gel

Běh	Kmen	DNA
1		+/-
2		+/-
3	<i>L. amylovorus</i> CCM 4380 ^T	+/-
4		+
5	<i>L. plantarum</i> CCM 7039 ^T	+
6		+
7	-	-
8	DNA standard λ / <i>Hind</i> III	-

- +/- DNA byla detekována velmi slabě,
- + DNA byla detekována v malém množství.

- DNA získaná fenolovou extrakcí byla na agarosovém gelu detekována. DNA kmene *L. zae* CCM 7069^T byla detekována ve velmi malém množství.

5.4 Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk rodu *Lactobacillus* vysolováním chloridem sodným

Pro izolaci celkové DNA pomocí vysolování bylo použito 5 vzorků hrubého lyzátu kmene *L. plantarum* CCM 7039^T. Bylo provedeno vysolování s různými koncentracemi NaCl a následné srážení ethanolem, jak je uvedeno v Tabulce 3 v kapitole Metody.

Přítomnost a intaktnost DNA byla ověřena pomocí agarosové gelové elektroforézy (Obr. 8, Tabulka 14). Na gel bylo nanášeno 10 µl DNA.



Obr. 8: Agarosová gelová elektroforéza celkové DNA izolované z hrubých lyzátů různých kmenů rodu *Lactobacillus* vysolováním s různými koncentracemi NaCl

Tabulka 14: Schéma nanesení vzorků celkové DNA izolované z hrubých lyzátů různých kmenů rodu *Lactobacillus* vysolováním NaCl na agarosový gel

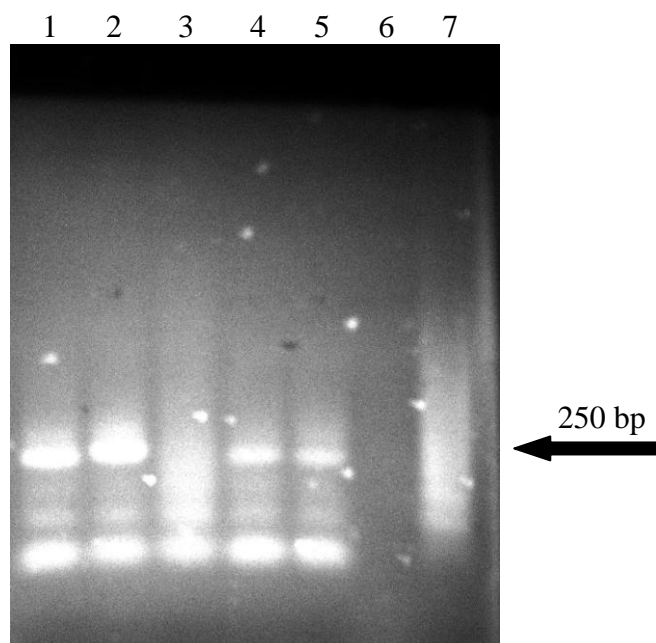
Běh	NaCl (M)	Kmen	DNA
1	-	DNA standard λ / <i>Hind</i> III	-
2	-	-	-
3	0,55	<i>L. plantarum</i> CCM 7039 ^T	-
4	1,10		-
5	1,65		-
6	2,20		-
7	2,75		-

- DNA nebyla detekována,

- Na rozdíl od DNA izolované fenolovou extrakcí, nebyly pomocí vysolování příslušné proužky DNA na gelu viditelné. Pro zjištění, zda vůbec nějaká DNA byla vysolováním NaCl získána, byla provedena PCR.

5.5 Ověření kvality izolované DNA pomocí polymerasové řetězové reakce s rodově specifickými primery pro rod *Lactobacillus*

DNA izolovaná fenolovou extrakcí a vysolováním s NaCl byla použita jako DNA matrice v rodově specifické PCR. Příprava PCR směsi je uvedena v Tabulce 5 v kapitole Metody a podmínky amplifikace v Tabulce 6 v téže kapitole. Detekce PCR produktů agarosovou gelovou elektroforézou je uvedena na Obr. 9, schéma nanesení PCR produktů na agarosový gel v Tabulce 15.



Obr. 9: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů (250 bp) amplifikovaných z izolované DNA

DNA byla izolována z různých druhů rodu *Lactobacillus* fenolovou extrakcí a vysolováním pomocí NaCl a amplifikována s využitím primerů specifických pro rod *Lactobacillus*.

Tabulka 15: Schéma nanesení PCR produktů na agarosový gel

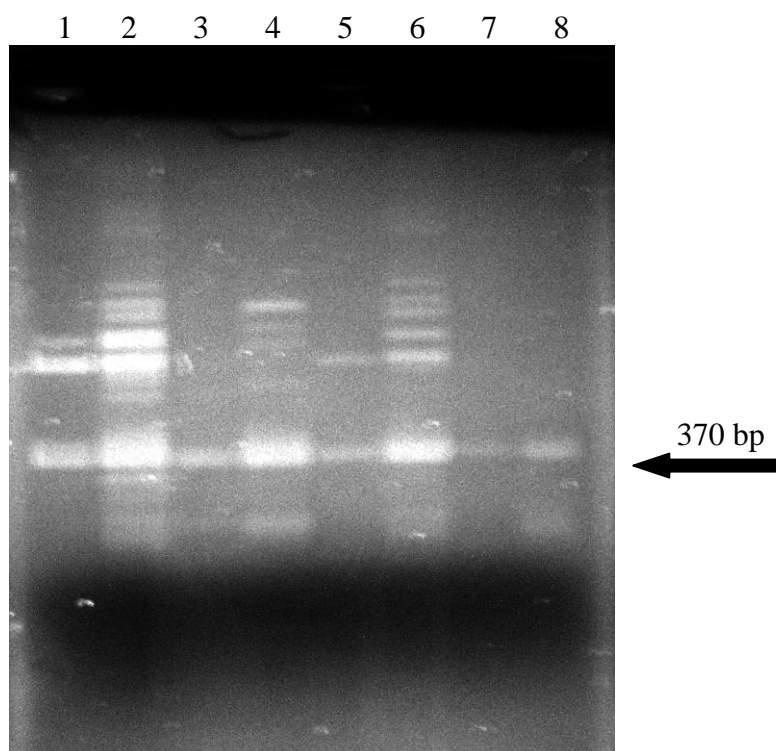
Běh	NaCl (M)	Metoda izolace DNA	Kmen	PCR produkt
1	-	fenolová extrakce	<i>L.plantarum</i> CCM 7039 ^T	++
2	-		<i>L. zae</i> CCM 7069 ^T	++
3	-		<i>L. amylovorus</i> CCM 4380 ^T	++
4	1,65	vysolování NaCl	<i>L.plantarum</i> CCM 7039 ^T	++
5	2,75			++
6	-	-	-	-
7	negativní kontrola		-	+

- PCR produkt nebyl detekován,
- + PCR produkt detekován v malém množství,
- ++ PCR produkt detekován ve větším množství.

- DNA všech vzorků se amplifikovala v PCR, tudíž tato DNA byla izolována v kvalitě vhodné pro PCR. Pomocí vysolování chloridem sodným bylo získáno dostatečné množství DNA pro amplifikaci v PCR. Bohužel degradovaný PCR produkt byl přítomen i v negativní kontrole. Zřejmě tedy byla některá z PCR komponent kontaminována DNA.

5.6 Ověření kvality izolované DNA pomocí polymerasové řetězové reakce s univerzálními primery pro doménu Baktérie

Pro ověření, že kontaminace nebyla v primerech specifických pro rod *Lactobacillus*, byla provedena PCR s univerzálními primery pro doménu Baktérie. Příprava PCR směsi je uvedena v Tabulce 7 v kapitole Metody a podmínky amplifikace v Tabulce 8 v téže kapitole. Současně byly použity 2 sady komponent x a y , které měly shodné dNTP, primery a $MgCl_2$. Tímto způsobem byla testována možnost kontaminace některé z PCR komponent. PCR produkty byly detekovány na agarosovém gelu (Obr. 10), schéma nanesení PCR produktů na agarosový gel je uvedeno v Tabulce 16.



Obr. 10: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů (370 bp) při studiu citlivosti PCR

DNA byla izolována vysolováním různými koncentracemi NaCl a fenolovou extrakcí a amplifikována pomocí univerzálních primerů pro doménu Baktérie.

Tabulka 16: Schéma nanesení PCR produktů na agarosový gel

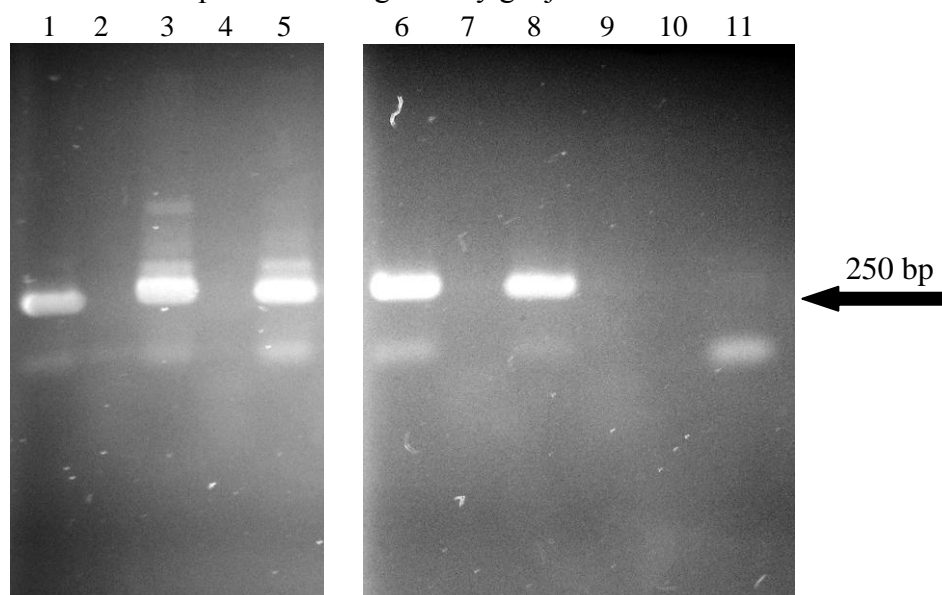
Běh	NaCl (M)	Metoda izolace DNA	Kmen	Sada PCR komponent	PCR produkt
1	-	fenolová extrakce	<i>L. plantarum</i> CCM 7039 ^T	x	+
2	-			y	++
3	-		<i>L. amylovorus</i> CCM 4380 ^T	x	+
4	-			y	++
5	1,65	vysolování NaCl	<i>L. plantarum</i> CCM 7039 ^T	x	+
6	1,65			y	++
7	negativní kontrola			x	+/-
8	negativní kontrola			y	+

- +/- PCR produkt detekován velmi slabě,
- + PCR produkt detekován v malém množství,
- ++ PCR produkt detekován ve větším množství.

- Na agarosovém gelu (Obr. 10) v PCR produktech bylo přítomno vedle specifických amplikonů DNA velké množství nespecifických amplikonů DNA o jiných velikostech stejně jako v negativní kontrole, zejména pokud se jedná o sadu PCR komponent y. Z toho plyne, že některá z PCR komponent této sady byla kontaminována. Proto bylo přistoupeno k použití PPP Master Mixu, což je popsáno v následující kapitole 5.7.

5.7 Ověření kvality izolované DNA pomocí polymerasové řetězové reakce s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* a s využitím PPP Master Mixu

PCR reakce a amplifikace se lišila objemy jednotlivých komponent, které jsou uvedeny v Tabulce 9 v kapitole Metody. K reakci byl použit program LBC ROD (Tabulka 6). PCR produkty byly detekovány pomocí agarosové gelové elektroforézy (Obr. 11), schéma nanesení PCR produktů na agarosový gel je uvedeno v Tabulce 17.



Obr. 11: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů (250 bp) - citlivost PCR

DNA byla izolována vysolováním různými koncentracemi NaCl a fenolovou extrakcí a poté amplifikována pomocí primerů specifických pro rod *Lactobacillus* a PPP Master Mix.

Tabulka 17: Schéma nanesení PCR produktů na agarosový gel

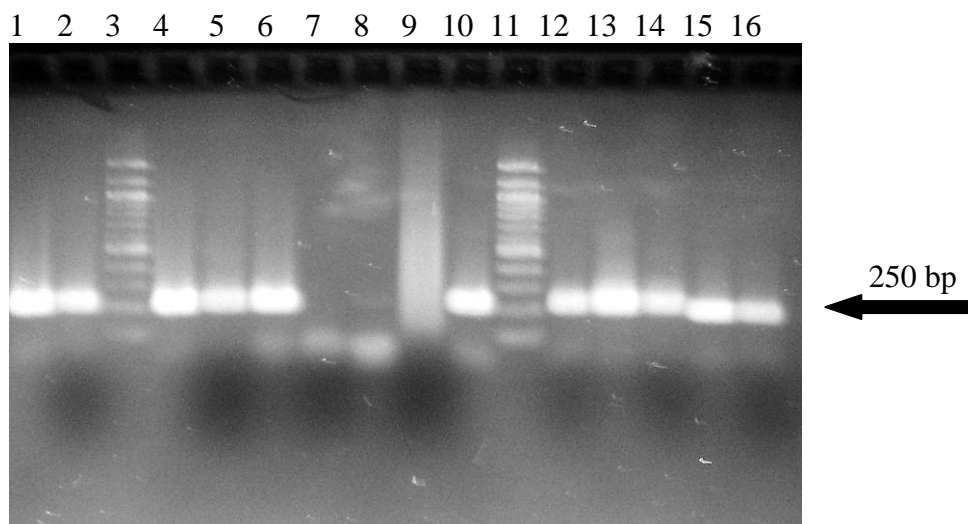
Běh	NaCl (M)	Metoda izolace DNA	Kmen	PCR produkt
1	-	fenolová extrakce	<i>L.plantarum</i> CCM 7039 ^T	+++
2	-	-	-	-
3	-	fenolová extrakce	<i>L. amylovorus</i> CCM 4380 ^T	+++
4	-	-	-	-
5	-	fenolová extrakce	<i>L. zaeae</i> CCM 7069 ^T	+++
6	1,65	vysolování NaCl	<i>L.plantarum</i> CCM 7039 ^T	+++
7	-	-	-	-
8	2,75	vysolování NaCl	<i>L.plantarum</i> CCM 7039 ^T	+++
9	-	-	-	-
10	negativní kontrola		-	-
11	negativní kontrola		-	-

- PCR produkt nebyl detekován,
- +++ PCR produkt detekován ve velkém množství.

- DNA byla amplifikována v rodově specifické PCR a na agarosovém gelu (Obr. 11) jsou viditelné specifické amplikony DNA ve vysoké intenzitě a čistotě, čímž se osvědčilo používání PPP Master Mixu místo klasické sady PCR komponent.

5.8 Ověření kvality izolované DNA pomocí polymerasové řetězové reakce s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* s využitím PPP Master Mixu nebo klasické sady PCR komponent

PCR směs byla připravena buď s PPP Master Mixem (Tabulka 9, kapitola Metody) nebo s klasickou sadou PCR komponent (sada w) jak je uvedeno v Tabulce 5 v kapitole Metody. K reakci byl použit program LBC ROD (Tabulka 6, kapitola Metody). Cílem bylo porovnat výsledky obou PCR reakcí (Obr. 12). Schéma nanesení PCR produktů na agarosový gel je uvedeno v Tabulce 18.



Obr. 12: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů (250 bp) - citlivost PCR

DNA byla izolována vysolováním různými koncentracemi NaCl a fenolovou extrakcí a amplifikována s využitím PPP Master Mixu a klasické sady PCR komponent.

Tabulka 18: Schéma nanesení PCR produktů na agarosový gel

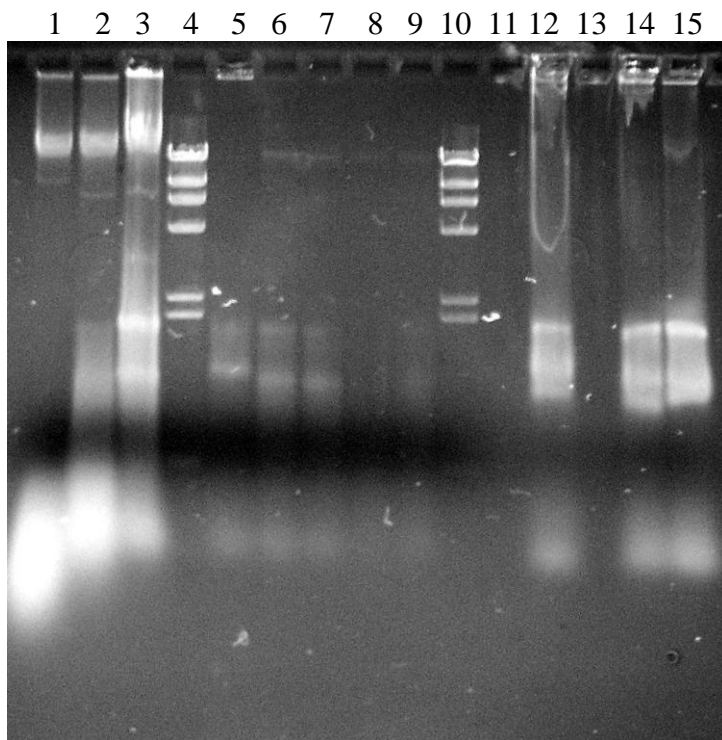
Běh	NaCl (M)	Metoda izolace DNA	Kmen	Poznámka	PCR produkt
1	2,75	vysolování NaCl	<i>L.plantarum</i> CCM 7039 ^T	PPP Master Mix	+++
2				sada w	+++
3	DNA standard (100 bp)		-	-	-
4	1,65	vysolování NaCl	<i>L.plantarum</i> CCM 7039 ^T	PPP Master Mix	+++
5				sada w	+++
6	0,55	vysolování NaCl	<i>L.plantarum</i> CCM 7039 ^T	PPP Master Mix	+++
7				sada w	-
8	negativní kontrola		-	PPP Master Mix	-
9	negativní kontrola		-	sada w	+/-
10	-	fenolová extrakce	<i>L. zeae</i> CCM 7069 ^T	PPP Master Mix	+++
11	DNA standard (100bp)		-	-	-
12	-	fenolová extrakce	<i>L. zeae</i> CCM 7069 ^T	sada w	+++
13	-		<i>L. amylovorus</i> CCM 4380 ^T	PPP Master Mix	+++
14	-			sada w	+++
15	-		<i>L.plantarum</i> CCM 7039 ^T	PPP Master Mix	+++
16	-			sada w	+++

- PCR produkt nebyl detekován,
- +/- PCR produkt detekován velmi slabě,
- +++ PCR produkt detekován ve velkém množství.

- DNA byla amplifikována a byly detekovány specifické PCR produkty při použití jak PPP Master Mixu tak i klasické sady PCR komponent (kromě vysolování DNA *L. plantarum* CCM 7039^T pomocí 0,55 M NaCl v běhu č. 7, kde patrně došlo k chybě při přípravě vzorku). V případě negativní kontroly v běhu č. 9 došlo zřejmě ke kontaminaci.
- Při použití PPP Master Mixu jsou PCR produkty nepatrně intenzivnější než u klasické sady PCR komponent.
- V dalších PCR reakcích už byl používán pouze PPP Master Mix a to z důvodu přetrvávajících problémů kontaminace klasických sad PCR komponent, buď přímo v PCR produktech nebo v negativních kontrolách.

5.9 Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk rodu *Lactobacillus* (3 ml bakteriální kultura, $A_{600} = 1$)

Protože předchozí postup přípravy hrubých lyzátů z 1 ml čistých bakteriálních kultur byl nedostačující z hlediska množství izolované DNA (kapitola 5.2), byl objem bakteriální kultury zvýšen na 3 ml a buňky byly naředěny na stejnou absorbanci $A_{600} = 1$. Byly také zvýšeny objemy vzorků nanášených na agarosový gel, v případě fenolové extrakce i vysolované DNA bylo nanášeno 20 μ l (Obr. 13). Schéma nanesení vzorků na agarosový gel je uvedeno v Tabulce 19.



Obr. 13: Agarosová gelová elektroforéza hrubých lyzátů různých kmenů rodu *Lactobacillus*, vysolované DNA a DNA izolované fenolovou extrakcí

Tabulka 19: Schéma nanesení vzorků hrubých lyzátů různých kmenů rodu *Lactobacillus*, vysolované DNA a DNA izolované fenolovou extrakcí na agarosový gel

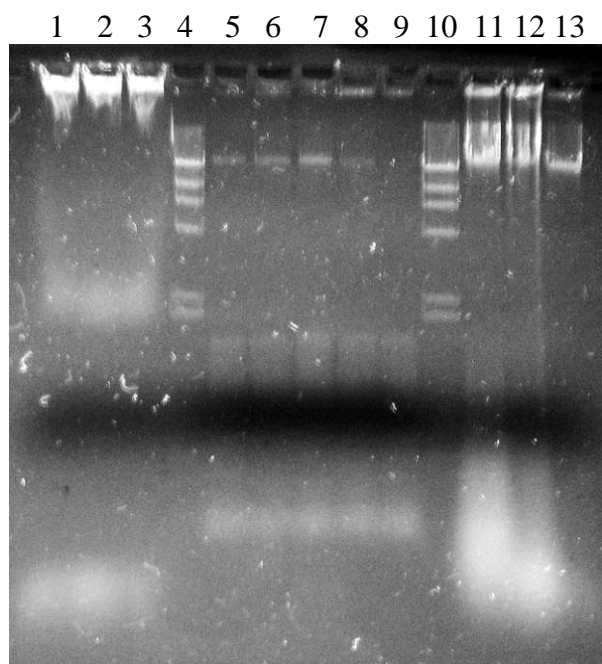
Běh.	NaCl (M)	Metoda izolace DNA	Kmen	DNA
1	-	fenolová extrakce	<i>L. amylovorus</i> CCM 4380 ^T	+++
2	-		<i>L. plantarum</i> CCM 7039 ^T	+++
3	-		<i>L. zaeae</i> CCM 7069 ^T	+++
4	DNA standard λ /Hind III			-
5	0,55	vysolování NaCl	<i>L. amylovorus</i> CCM 4380 ^T	-
6	1,10			+/-
7	1,65			+/-
8	2,20			+/-
9	2,75			+/-
10	DNA standard λ /Hind III			-
11	-	-	-	-
12		hrubý lyzát	<i>L. amylovorus</i> CCM 4380 ^T	+++
13	-	-	-	-
14		hrubý lyzát	<i>L. plantarum</i> CCM 7039 ^T	+++
15			<i>L. zaeae</i> CCM 7069 ^T	+++

- DNA nebyla detekována,
- +/- DNA detekována velmi slabě,
- +++ DNA detekována ve velkém množství.

- Zvýšení množství bakteriální kultur při přípravě hrubých lyzátů buněk a zvýšení nanášeného objemu DNA na agarosový gel mělo pozitivní dopad na množství DNA izolované fenolovou extrakcí viditelnou na Obr. 13, běh č. 1-3
- Pokud se jedná o vysolování DNA chloridem sodným, tak izolace DNA touto cestou neposkytla uspokojivé výsledky.

5.10 Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk rodu *Lactobacillus* (3 ml bakteriální kultura, $A_{600} = 1,5$)

V předchozím případě nebyla izolace DNA vysolováním chloridem sodným příliš úspěšná, proto bylo přistoupeno ke zvýšení optické hustoty buněk z $A_{600} = 1$ na $A_{600} = 1,5$ a také byly zvýšeny objemy vzorků s vysolovanou DNA nanášených na agarosový gel na 30 μ l, objem nanášené DNA izolované fenolovou extrakcí byl snížen na 10 μ l (Obr. 14). Schéma nanesení vzorků na agarosový gel je uvedeno v Tabulce 20.



Obr. 14: Agarosová gelová elektroforéza hrubých lyzátů různých kmenů rodu *Lactobacillus*, vysolované DNA s různými koncentracemi NaCl a DNA izolované fenolovou extrakcí

Tabulka 20: Schéma nanesení vzorků hrubých lyzátů různých kmenů rodu *Lactobacillus*, vysolované DNA a DNA izolované fenolovou extrakcí na agarosový gel

Běh	NaCl (M)	Metoda izolace DNA	Kmen	DNA
1	-	fenolová extrakce	<i>L. amylovorus</i> CCM 4380 ^T	+++
2	-		<i>L. plantarum</i> CCM 7039 ^T	+++
3	-		<i>L. zeae</i> CCM 7069 ^T	+++
4	DNA standard λ /Hind III			-
5	0,55	vysolování NaCl	<i>L. amylovorus</i> CCM 4380 ^T	+
6	1,10			+
7	1,65			++
8	2,20			+/-
9	2,75			-
10	DNA standard λ /Hind III			-
11	-	hrubý lyzát	<i>L. amylovorus</i> CCM 4380 ^T	+++
12	-		<i>L. plantarum</i> CCM 7039 ^T	+++
13	-		<i>L. zeae</i> CCM 7069 ^T -	+++

- DNA nebyla detekována,
- +/- DNA detekována velmi slabě,
- + DNA detekována v malém množství,
- ++ DNA byla detekována ve větším množství,
- +++ DNA detekována ve velkém množství.

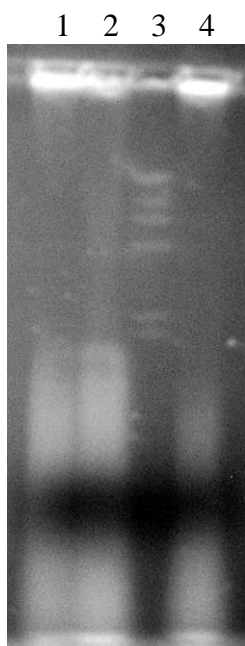
- Zvýšení optické hustoty buněk z $A_{600} = 1$ na $A_{600} = 1,5$ a zvýšení nanášeného objemu vysolené DNA vedlo k mírnému zvýšení intenzity DNA na agarosovém gelu, stále

však ve srovnání s výsledky izolace DNA fenolovou extrakcí není tato intenzita DNA dostatečně vysoká.

5.11 Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk rodu *Lactobacillus* (5 ml bakteriální kultura, $A_{600} = 1,5$)

DNA byla izolována z hrubých lyzátů buněk fenolovou extrakcí a vysolováním s různými koncentracemi NaCl. Tyto hrubé lyzáty (Obr. 15, Tabulka 21) byly připraveny z buněk naředěných na stejnou absorbanci $A_{600} = 1,5$ z celkového objemu kultury 5 ml. Na rozdíl od předchozích postupů byla v lyzačním roztoku B použita vyšší koncentrace lysozymu, místo 3 mg/ml bylo přidáno 15 mg/ml. Dále byla zvýšena doba inkubace s tímto roztokem B z 1 na 2 hodiny.

Na agarosový gel bylo nanášeno 10 μ l DNA v případě fenolové extrakce (Obr. 16, Tabulka 22), 7 μ l DNA v případě standardu λ /Hind III a 30 μ l vysolované DNA (Obr. 17, Tabulka 23).

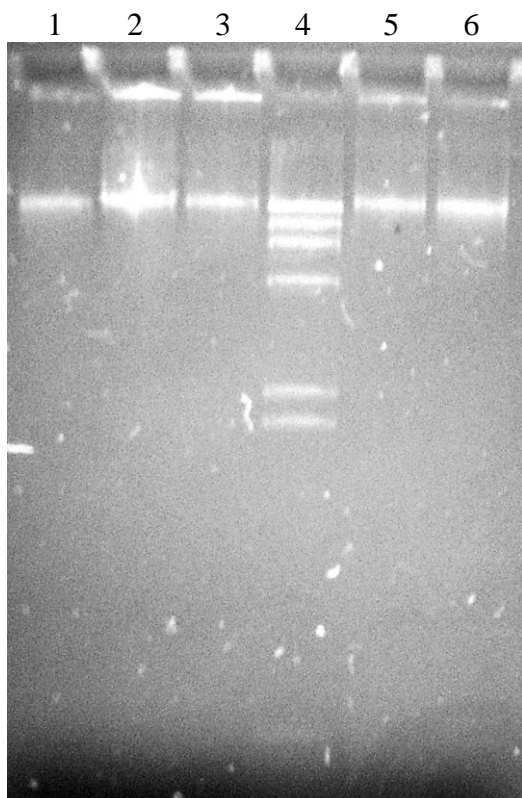


Obr. 15: Agarosová gelová elektroforéza hrubých lyzátů buněk různých kmenů rodu *Lactobacillus*

Tabulka 21: Schéma nanesení vzorků hrubých lyzátů na agarosový gel

Běh	Kmen	DNA
1	<i>L. plantarum</i> CCM 7039 ^T	+++
2	<i>L. amylovorus</i> CCM 4380 ^T	+++
3	DNA standard λ /Hind III	-
4	<i>L. zeae</i> CCM 7069 ^T	+++

+++ DNA detekována ve velkém množství.

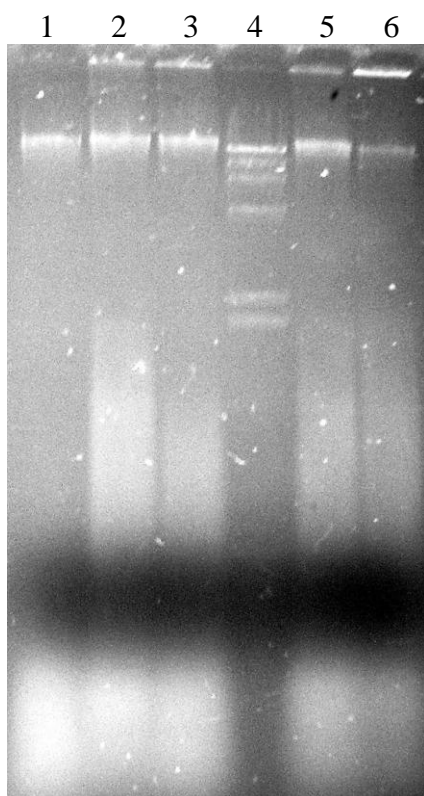


Obr. 16: Agarosová gelová elektroforéza celkové DNA izolované z hrubých lyzátů různých kmenů rodu *Lactobacillus* pomocí fenolové extrakce

Tabulka 22: Schéma nanesení vzorků celkové DNA izolované z hrubých lyzátů různých kmenů rodu *Lactobacillus* fenolovou extrakcí na agarosový gel

Běh	Kmen	DNA
1	<i>L. amylovorus</i> CCM 4380 ^T	+++
2	<i>L. plantarum</i> CCM 7039 ^T	+++
3		+++
4	DNA standard λ /Hind III	-
5	<i>L. zeae</i> CCM 7069 ^T	+++
6		+++

+++ DNA detekována ve velkém množství.



Obr. 17: Agarosová gelová elektroforéza celkové DNA izolované z hrubých lyzátů pomocí vysolování s různými koncentracemi NaCl

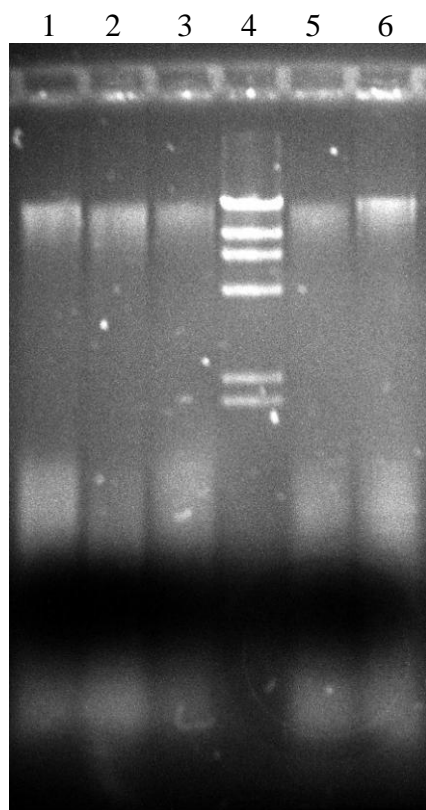
Tabulka 23: Schéma nanesení vzorků celkové DNA izolované z hrubých lyzátů pomocí vysolování s různými koncentracemi NaCl na agarosový gel

Běh	NaCl (M)	Kmen	DNA
1	2,75	<i>L. amylovorus</i> CCM 4380 ^T	+++
2	2,20		+++
3	1,65		+++
4	-	DNA standard λ /Hind III	-
5	1,10	<i>L. amylovorus</i> CCM 4380 ^T	+++
6	0,55		+++

+++ ... DNA detekována ve velkém množství.

- Zvýšení množství bakteriální kultury použité pro přípravu hrubých lyzátů buněk ze 3 ml na 5 ml a současně zvýšení množství lysozymu v lyzačním roztoku ze 3 na 15 mg/ml vedlo k úspěšným výsledkům. Na obou agarosových gelech (Obr. 16, Obr. 17) jsou vidět proužky izolované DNA vysoké intenzity.
- V předchozím případě (kap. 5.9 a 5.10), kdy izolace fenolovou extrakcí i vysolováním chloridem sodným byla optimalizována zvýšením objemu bakteriální kultury pro přípravu hrubých lyzátů, nebylo dosaženo výrazné změny v intenzitě DNA na agarosovém gelu. Zásadním krokem pro zlepšení výsledků bylo zřejmě tedy zvýšení množství použitého lysozymu.

DNA byla také izolována z hrubých lyzátů dalších dvou kmenů, *L.plantarum* CCM 7039^T a *L. zea* CCM 7069^T, vysolováním s různými koncentracemi NaCl. Hrubé lyzáty byly připraveny stejným způsobem jako v předchozím případě u kmene *L. amylovorus* CCM 4380^T. Na agarosový gel (Obr. 18 a Tabulka 24; Obr. 19 a Tabulka 25) bylo nanášeno 30 μ l vysolované DNA a 7 μ l standardu λ /Hind III.

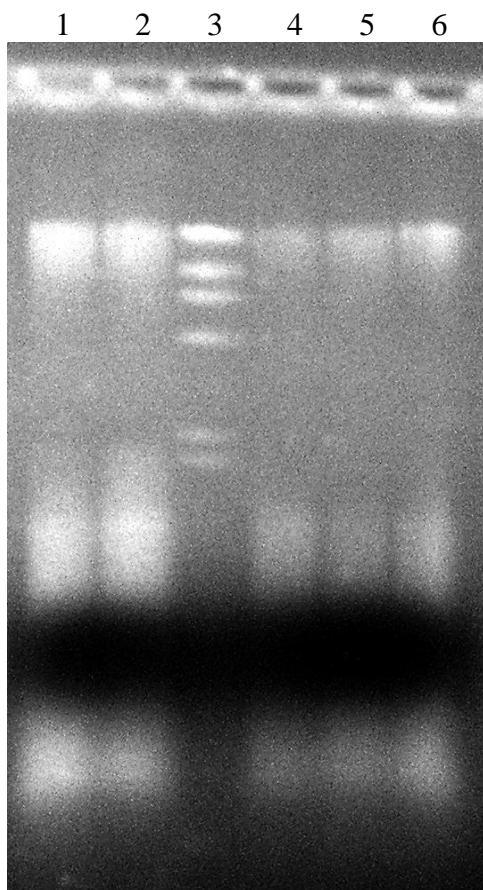


Obr. 18: Agarosová gelová elektroforéza celkové DNA izolované z hrubých lyzátů pomocí vysolování s různými koncentracemi NaCl

Tabulka 24: Schéma nanesení vzorků celkové DNA izolované z hrubých lyzátů pomocí vysolování s různými koncentracemi NaCl na agarosový gel

Běh	NaCl (M)	Kmen	DNA
1	0,55	<i>L.plantarum</i> CCM 7039 ^T	++
2	1,10		++
3	1,65		++
4	-	DNA standard λ /Hind III	-
5	2,20	<i>L.plantarum</i> CCM 7039 ^T	++
6	2,75		++

++ DNA detekována ve větším množství.



Obr. 19: Agarosová gelová elektroforéza celkové DNA izolované z hrubých lyzátů pomocí vysolování s různými koncentracemi NaCl

Tabulka 25: Schéma nanesení vzorků celkové DNA izolované z hrubých lyzátů pomocí vysolování s různými koncentracemi NaCl na agarosový gel

Běh	NaCl (M)	Kmen	DNA
1	0,55	<i>L. zeae</i> CCM 7069 ^T	+++
2	1,10		+++
3	-	DNA standard λ /Hind III	-
4	1,65	<i>L. zeae</i> CCM 7069 ^T	++
5	2,20		++
6	2,75		++

++ DNA detekována ve větším množství,

+++ DNA detekována ve velkém množství.

- DNA izolovaná vysolováním s různými koncentracemi chloridu sodného byla u obou kmenů (*L. plantarum* CCM 7039^T, *L. zeae* CCM 7069^T) v mírně degradovaném stavu detekována.
- Nejvyšší kvalita DNA byla získána v případě kmene *L. amylovorus* CCM 4380^T.

5.12 Stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované fenolovou extrakcí a vysolováním chloridem sodným

Koncentrace DNA izolované fenolovou extrakcí a vysolováním NaCl (kap. 5.11) byla měřena na přístroji NanoPhotometerTM, jak je uvedeno v kapitole Metody.

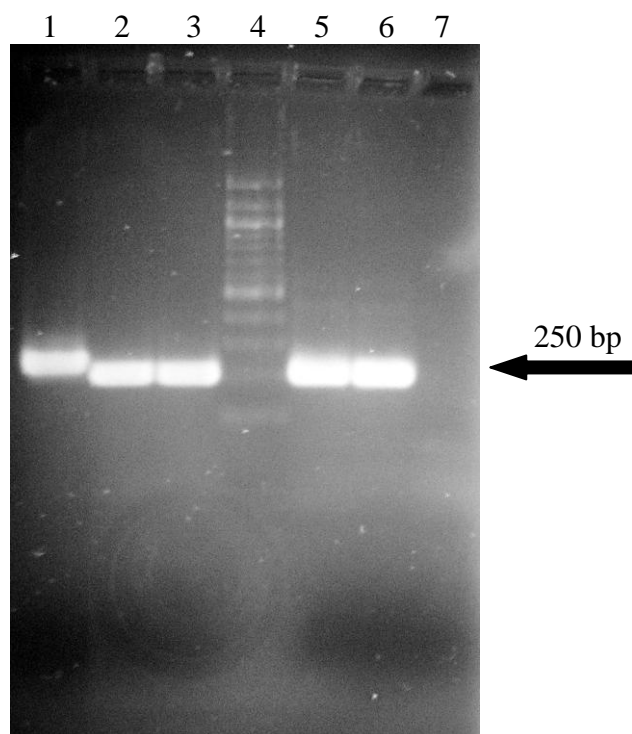
Tabulka 26: Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA

Metoda izolace DNA	NaCl (M)	Kmen	DNA (ng/μl)
Vysolování NaCl	0,55	<i>L. amylovorus</i> CCM 4380 ^T	96,4
	1,10		101,7
	1,65		107,0
	2,20		91,6
	2,75		60,0
	0,55	<i>L. plantarum</i> CCM 7039 ^T	60,1
	1,10		50,7
	1,65		42,8
	2,20		41,0
	2,75		46,4
	0,55	<i>L. zae</i> CCM 7069 ^T	74,8
	1,10		71,3
	1,65		42,7
	2,20		41,6
	2,75		54,1
Fenolová extrakce	-	<i>L. amylovorus</i> CCM 4380 ^T	191,6
		<i>L. zae</i> CCM 7069 ^T	181,7
			181,7
		<i>L. plantarum</i> CCM 7039 ^T	163,0
			181,7

- Fenolovou extrakcí bylo získáno přibližně dvojnásobné až trojnásobné množství DNA než izolací DNA vysolováním chloridem sodným, čímž se jeví tato metoda izolace DNA účinnější. Metoda vysolování chloridem sodným je ale výhodnější zejména z hlediska nepoužívání toxických látek, kdy tato metoda nevyžaduje k izolaci DNA látky jako je fenol či chloroform, které jsou nezbytné u fenolové extrakce.
- Optimální koncentrace chloridu sodného pro izolaci DNA byla v rozmezí 0,55-1,65 M.

5.13 Ověření kvality izolované DNA z 5 ml bakteriální kultury pomocí polymerasové řetězové reakce s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* a s využitím PPP Master Mixu

Kvalita DNA, která byla izolovaná fenolovou extrakcí i vysolováním chloridem sodným z hrubých lyzátů buněk připravených z 5 ml bakteriální kultury a se zvýšeným obsahem lysozymu v lyzačním roztoku, byla ověřena v PCR (Obr. 20 a Tabulka 27; Obr. 21 a Tabulka 28). Objemy jednotlivých komponent jsou uvedeny v Tabulce 9 v kapitole Metody. K reakci byl použit program LBC ROD (Tabulka 6).



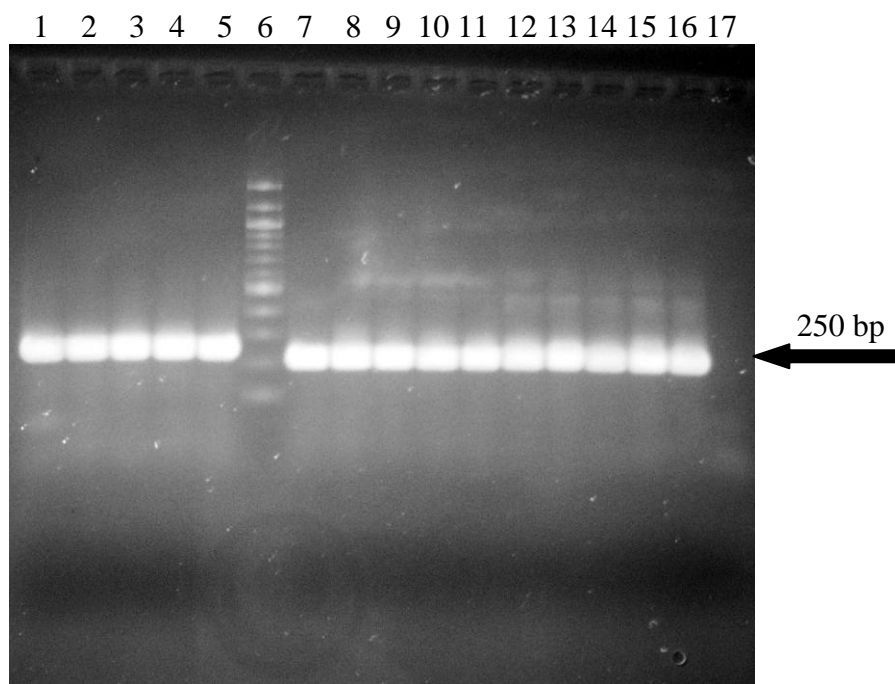
Obr. 20: Agarosová gelová elektroforéza znázorňující citlivost PCR po fenolové extrakci DNA

Tabulka 27: Schéma nanesení PCR produktů (250 bp) na agarosový gel při studiu citlivosti PCR po fenolové extrakci DNA

Běh	Kmen	PCR produkt
1	<i>L. amylovorus</i> CCM 4380 ^T	+++
2	<i>L. plantarum</i> CCM 7039 ^T	+++
3		+++
4	DNA standard (100 bp)	-
5	<i>L. zeae</i> CCM 7069 ^T	+++
6		+++
7	negativní kontrola	-

- PCR produkt nebyl detekován,

+++ PCR produkt detekován ve velkém množství.



Obr. 21: Agarosová gelová elektroforéza znázorňující vliv koncentrace NaCl při vysolování DNA na citlivost PCR

Tabulka 28: Schéma nanesení PCR produktů (250 bp) na agarosový gel při studiu citlivosti PCR při vysolování DNA různými koncentracemi NaCl

Běh	NaCl (M)	Kmen	PCR produkt
1	0,55	<i>L. amylovorus</i> CCM 4380 ^T	+++
2	1,10		+++
3	1,65		+++
4	2,20		+++
5	2,75		+++
6	-	DNA standard (100 bp)	-
7	0,55	<i>L. plantarum</i> CCM 7039 ^T	+++
8	1,10		+++
9	1,65		+++
10	2,20		+++
11	2,75		+++
12	0,55	<i>L. zeae</i> CCM 7069 ^T	+++
13	1,10		+++
14	1,65		+++
15	2,20		+++
16	2,75		+++
17	-	negativní kontrola	-

- PCR produkt nebyl detekován,

+++ PCR produkt detekován ve velkém množství.

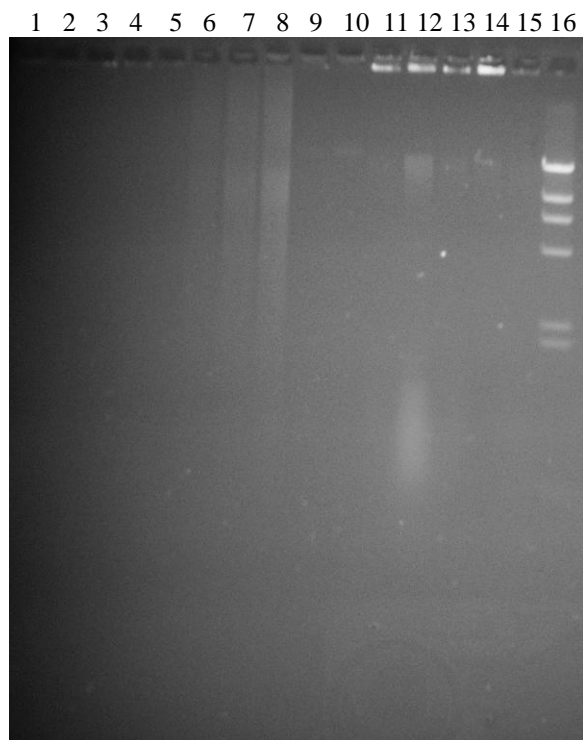
- Na agarosových gelech (Obr. 20, Obr. 21) byly detekovány intenzivní PCR produkty u všech vzorků.
- Bylo ověřeno, že z čistých bakteriálních kultur všech tří testovaných kmenů lze získat pomocí fenolové extrakce i vysolováním chloridem sodným DNA v kvalitě vhodné pro PCR.

5.14 Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk rodu *Lactobacillus* s využitím magnetických nosičů

5.14.1 Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk kmene *L. amylovorus* CCM 4380^T s využitím magnetických nosičů

Kromě izolace DNA fenolovou extrakcí a vysolováním chloridem sodným, byla DNA izolována také magnetickou separací s využitím magnetických nosičů. DNA byla izolována z hrubých lyzátů buněk připravených z 5 ml overnight kultury buněk kmene *L. amylovorus* CCM 4380^T, které byly zředěny na $A_{600} = 1,5$. K přípravě hrubého lyzátu buněk byla použita v lyzačním roztoku B koncentrace lysozymu 15 mg/ml a inkubace s tímto roztokem probíhala 2 hodiny.

K izolaci DNA bylo použito 5 různých magnetických částic. Paralelně probíhala izolace s konečnou koncentrací 8 a 16 % PEG 6000. Jednotlivé komponenty byly smíchány v poměrech dle Tabulky 4 uvedené v kapitole Metody. Izolovaná DNA byla nanášena na agarosový gel (30 μ l) a podrobena elektroforéze (Obr. 22, Tabulka 29).



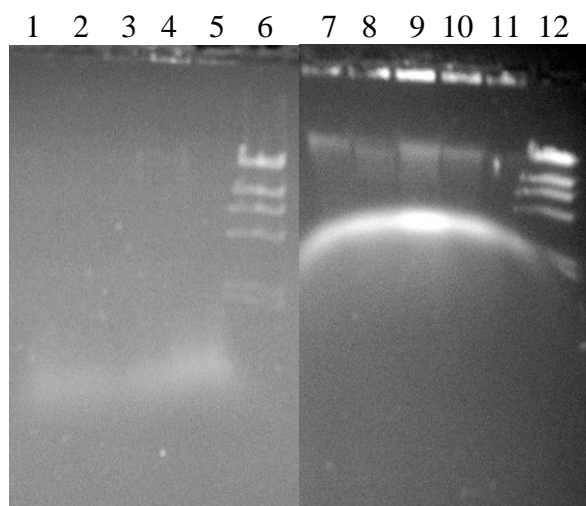
Obr. 22: Agarosová gelová elektroforéza ukazující vliv složení magnetických částic na množství izolované DNA kmene *L. amylovorus* CCM 4380^T

Tabulka 29: Schéma nanesení vzorků na agarosový gel při studiu vlivu složení magnetických částic na množství izolované DNA kmene *L. amylovorus* CCM 4380^T

Běh	Magnetická částice/DNA	PEG 6000 (%)	Kmen	DNA	Koncentrace DNA (ng/μl)
1	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	<i>L. amylovorus</i> CCM 4380 ^T	-	4,3
2	Dynal DNA Direct			-	4,9
3	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			-	3,1
4	P(HEMA-GMA) ox. II (2 mg/ml)			-	6,4
5	Perovskit 439			-	4,4
6	DNA	-	<i>Salmonella</i> sp.	+/-	50
7	DNA	-		+/-	100
	DNA	-		+/-	200
9	DNA	-		+/-	40
10	DNA	-		+/-	50
11	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	<i>L. amylovorus</i> CCM 4380 ^T	+	8,7
12	Dynal DNA Direct			+	24,5
13	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			+	4,8
14	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			+	5,8
15	Perovskit 439			+	4,5
16	DNA standard λ /Hind III	-		-	-

- DNA nebyla detekována,
- +/- DNA byla detekována velmi slabě,
- + DNA byla detekována v malém množství,

Agarosová gelová elektroforéza byla provedena i se supernatanty, které byly získány po navázání DNA na magnetické částice (Obr. 23, Tabulka 30). Na gel bylo nanášeno 30μl supernatantu a 10 μl DNA standardu λ /Hind III.



Obr. 23: Agarosová gelová elektroforéza se supernatanty po izolaci DNA pomocí různých magnetických nosičů

Tabulka 30: Schéma nanesení vzorků supernatantů po izolaci DNA magnetickou separací na agarosový gel

Běh	Magnetická částice	PEG 6000 (%)	Kmen	DNA	Koncentrace DNA (ng/μl)
1	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	<i>L. amylovorus</i> CCM 4380 ^T	-	31,0
2	Dynal DNA Direct			-	27,2
3	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			-	29,0
4	P(HEMA-co-GMA) ox. II(2 mg/ml)			-	30,0
5	Perovskit 439			-	21,5
6	DNA standard λ /Hind III	-	-	-	-
7	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	<i>L. amylovorus</i> CCM 4380 ^T	++	41,2
8	Dynal DNA Direct			++	50,3
9	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			++	43,8
10	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			++	35,0
11	Perovskit 439			++	21,8
12	DNA standard λ /Hind III	-	-	-	-

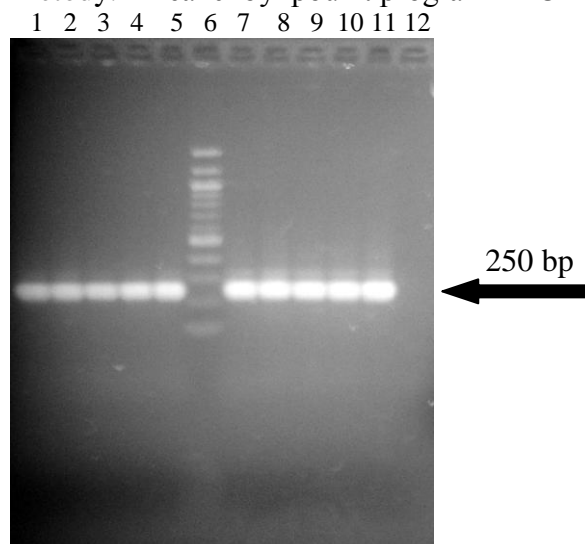
- DNA nebyla detekována,

++ DNA byla detekována ve větším množství.

- Bakteriální DNA kmene *L. amylovorus* CCM 4380^T byla izolována pomocí všech testovaných magnetických nosičů. Koncentrace izolované DNA se pohybovala v rozmezí 3,1 - 24,5 ng/μl, kdy nejvyšší koncentrace bylo dosaženo pomocí magnetického nosiče Dynal DNA Direct v prostředí 16 % PEG 6000 (Tabulka 29).
- DNA byla detekována ve všech supernatantech, čímž byla potvrzena lyze buněk a přítomnost dostatečného množství DNA v hrubých lyzátech.

5.14.2 Ověření kvality izolované DNA kmene *L. amylovorus* CCM 4380^T s využitím magnetických nosičů pomocí polymerasové řetězové reakce s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* (PPP Master Mix)

Kvalita izolované DNA kmene *L. amylovorus* CCM 4380^T byla ověřena v PCR (Obr. 24, Tabulka 31). Objemy jednotlivých komponent jsou uvedeny v Tabulce 9 v kapitole Metody. K reakci byl použit program LBC ROD (Tabulka 6).



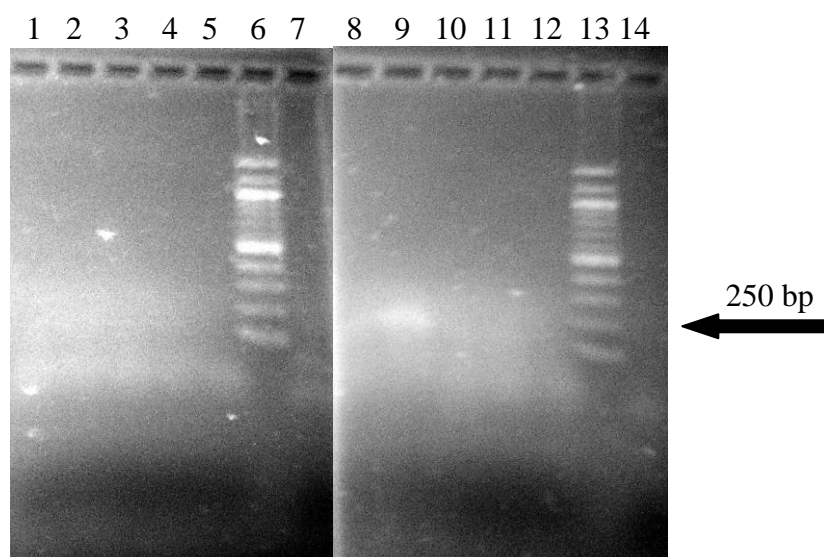
Obr. 24: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů (250 bp) znázorňující vliv použitých magnetických částic a koncentrace PEG 6000 na citlivost PCR

Tabulka 31: Schéma nanesení PCR produktů na agarosový gel při studiu citlivosti PCR s použitím různých magnetických částic a koncentrace PEG 6000

Běh	Magnetická částice	PEG 6000 (%)	Kmen	PCR produkt
1	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	<i>L. amylovorus</i> CCM 4380 ^T	+++
2	Dynal DNA Direct			+++
3	P(HEMA-co-GMA) ox. I (2 mg/ml)			+++
4	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			+++
5	Perovskit 439			+++
6	DNA standard (100 bp)			-
7	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	<i>L. amylovorus</i> CCM 4380 ^T	+++
8	Dynal DNA Direct			+++
9	P(HEMA-co-GMA) ox. I (2 mg/ml)			+++
10	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			+++
11	Perovskit 439			+++
12	negativní kontrola			-

- PCR produkt nebyl detekován,
+++ PCR produkt detekován ve velkém množství.

Stejná PCR reakce byla provedena i s příslušnými supernatanty (Obr. 25, Tabulka 32).



Obr. 25: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů (250 bp) příslušných supernatantů po izolaci DNA magnetickou separací

Tabulka 32: Schéma nanesení PCR produktů příslušných supernatantů na agarosový gel

Běh	Magnetická částice	PEG 6000 (%)	Kmen	PCR produkt
1	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	<i>L. amylovorus</i> CCM 4380 ^T	-
2	Dynal DNA Direct			-
3	P(HEMA-co-GMA) ox. I (2 mg/ml)			-
4	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			-
5	Perovskit 439			-
6	DNA standard (100 bp)			-
7	negativní kontrola			-
8	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	<i>L. amylovorus</i> CCM 4380 ^T	-
9	Dynal DNA Direct			+
10	P(HEMA-co-GMA) ox. I (2 mg/ml)			-
11	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			-
12	Perovskit 439			-
13	DNA standard (100 bp)			-
14	negativní kontrola			-

- PCR produkt nebyl detekován,

+ PCR produkt byl detekován v malém množství.

- Kvalita DNA kmene *L. amylovorus* CCM 4380^T eluované z různých magnetických nosičů při různé koncentraci PEG 6000 byla ověřena metodou PCR.

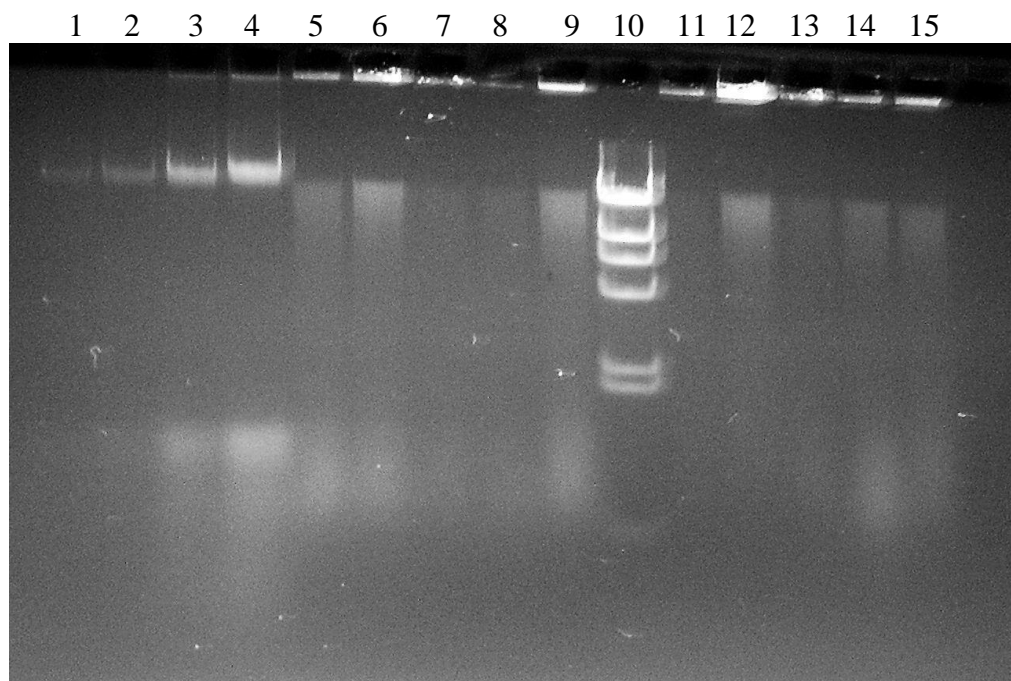
Po amplifikaci 1 μ l eluátů byly získány PCR produkty (250 bp) přibližně stejné intenzity bez ohledu na magnetický nosič, s jehož využitím byla DNA separována.

- PCR produkty příslušných supernatantů nebyly, až na vzorek v běhu č. 9, detekovány (Obr. 25). PEG patří mezi inhibitory PCR. V supernatantech bylo přítomno velké množství PEG 6000, proto ve většině vzorků k amplifikaci DNA nedošlo.

5.14.3 Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk kmenů *L. plantarum* CCM 7039^T a *L. zae* CCM 7069^T s využitím magnetických nosičů

Izolace DNA pomocí magnetických nosičů z hrubých lyzátů připravených z 5 ml kultury buněk naředěných na $A_{600} = 1,5$ byla provedena i s dalšími kmeny, *L. plantarum* CCM 7039^T a *L. zae* CCM 7069^T. Postup se nelišil od izolace DNA kmene *L. amylovorus* CCM 4380^T v kapitole 5.14.1.

Izolovaná DNA byla nanášena na agarosový gel (30 μ l) a podrobena elektroforéze (Obr. 26 a Tabulka 33; Obr. 27 a Tabulka 34).

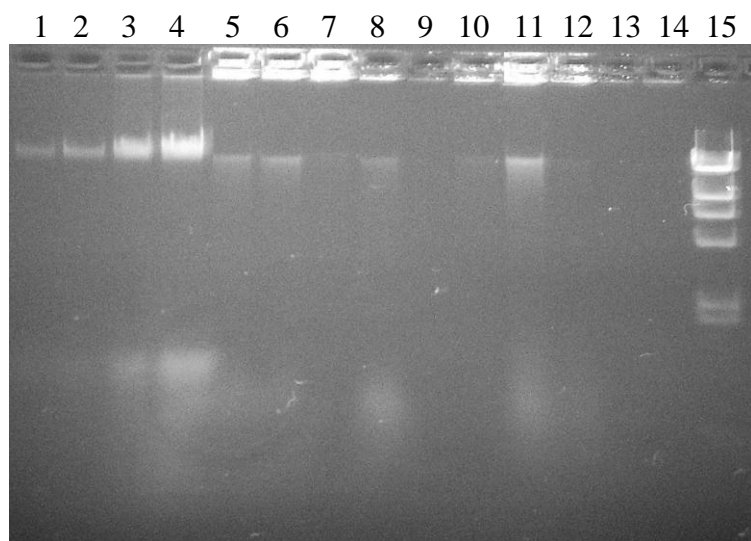


Obr. 26: Agarosová gelová elektroforéza znázorňující vliv složení magnetických částic na množství izolované DNA kmene *L. plantarum* CCM 7039^T

Tabulka 33: Schéma nanesení vzorků na agarosový gel při studiu vlivu složení magnetických částic na množství izolované DNA *L.plantarum* CCM 7039^T

Běh	Magnetická částice/DNA	PEG 6000 (%)	Kmen	DNA	Koncentrace DNA (ng/μl)
1	DNA	-	<i>Salmonella</i> sp.	+/-	50,0
2	DNA			+	100,0
3	DNA			++	250,0
4	DNA			+++	500,0
5	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	<i>L. plantarum</i> CCM 7039 ^T	+	18,2
6	Dynal DNA Direct			+	17,4
7	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			+/-	5,3
8	P(HEMA-GMA) ox. II(2 mg/ml)			+/-	8,6
9	Perovskit 439			+	21,6
10	DNA standard λ /Hind III	-	-	-	-
11	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	<i>L. plantarum</i> CCM 7039 ^T	+/-	3,5
12	Dynal DNA Direct			+	27,8
13	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			+/-	4,3
14	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			+	13,7
15	Perovskit 439			+	10,3

- +/- DNA byla detekována velmi slabě,
 + DNA byla detekována v malém množství,
 ++ DNA byla detekována ve větším množství,
 +++ DNA byla detekována ve velkém množství.



Obr. 27: Agarosová gelová elektroforéza znázorňující vliv složení magnetických částic na množství izolované DNA kmene *L. zae* CCM 7069^T

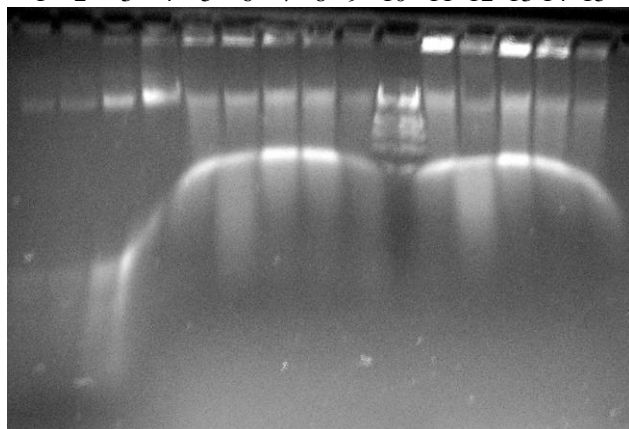
Tabulka 34: Schéma nanesení vzorků na agarosový gel při studiu vlivu složení magnetických částic na množství izolované DNA kmene *L. zea* CCM 7069^T

Běh	Magnetická částice/DNA	PEG 6000 (%)	Kmen	DNA	Koncentrace DNA (ng/μl)
1	DNA	-	<i>Salmonella</i> sp.	+/-	50,0
2	DNA			+	100,0
3	DNA			++	250,0
4	DNA			+++	500,0
5	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	<i>L. zea</i> CCM 7069 ^T	+	13,5
6	Dynal DNA Direct			+	10,4
7	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			+/-	4,4
8	P(HEMA-GMA) ox. II (2 mg/ml)			+	15,0
9	Perovskit 439			-	3,9
10	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	<i>L. zea</i> CCM 7069 ^T	+/-	10,0
11	Dynal DNA Direct			+	20,9
12	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			+/-	8,5
13	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			-	3,4
14	Perovskit 439			-	2,3
15	DNA standard λ Hind III	-	-	-	-

- DNA nebyla detekována,
- +/- DNA byla detekována velmi slabě,
- + DNA byla detekována v malém množství,
- ++ DNA byla detekována ve větším množství,
- +++ DNA byla detekována ve velkém množství.

Agarosová gelová elektroforéza byla provedena i se supernatanty, které byly získány po navázání DNA obou kmenů na magnetické částice (Obr. 28 a Tabulka 35; Obr. 29 a Tabulka 36) Na gel bylo nanášeno 30μl supernatantu a 10 μl standardu λ Hind III.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



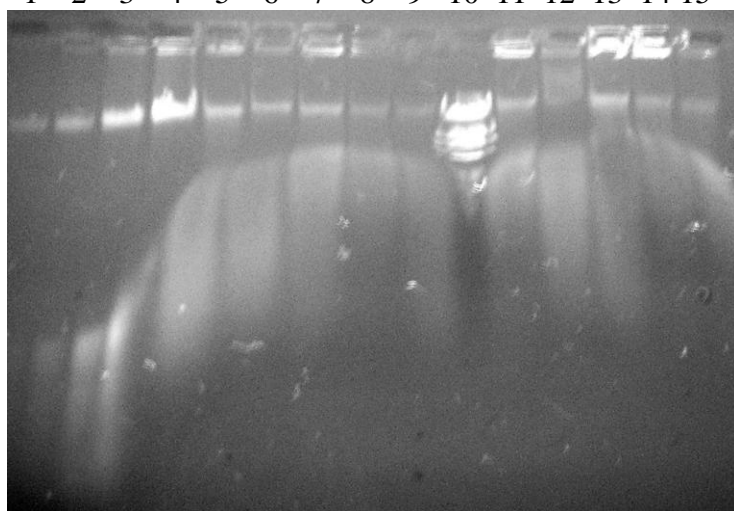
Obr. 28: Agarosová gelová elektroforéza se supernatanty po izolaci DNA kmene *L. plantarum* CCM 7039^T pomocí různých magnetických nosičů

Tabulka 35: Schéma nanesení vzorků supernatantů po izolaci DNA kmene *L. plantarum* CCM 7039^T magnetickou separací na agarosový gel

Běh	Magnetická částice/DNA	PEG 6000 (%)	Kmen	DNA	Koncentrace DNA (ng/μl)
1	DNA	-	<i>Salmonella</i> sp.	+/-	50,0
2	DNA			+	100,0
3	DNA			++	250,0
4	DNA			+++	500,0
5	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	<i>L. plantarum</i> CCM 7039 ^T	++	16,4
6	Dynal DNA Direct			++	17,4
7	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			++	13,3
8	P(HEMA-GMA) ox. II (2 mg/ml)			++	31,1
9	Perovskit 439			+	16,5
10	DNA standard λ /Hind III	-	-	-	-
11	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	<i>L. plantarum</i> CCM 7039 ^T	++	34,9
12	Dynal DNA Direct			+	18,2
13	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			++	39,2
14	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			++	12,9
15	Perovskit 439			+	10,0

- +/- DNA byla detekována velmi slabě,
 + DNA byla detekována v malém množství,
 ++ DNA byla detekována ve větším množství,
 +++ DNA byla detekována ve velkém množství.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



Obr. 29: Agarosová gelová elektroforéza se supernatanty po izolaci DNA kmene *L. zeae* CCM 7069^T pomocí různých magnetických nosičů

Tabulka 36: Schéma nanesení vzorků supernatantů po izolaci DNA kmene *L. zeae* CCM 7069^T magnetickou separací na agarosový gel

Běh	Magnetická částice/DNA	PEG 6000 (%)	Kmen	DNA	Koncentrace DNA (ng/μl)
1	DNA	-	<i>Salmonella</i> sp.	+/-	50,0
2	DNA			+	100,0
3	DNA			++	250,0
4	DNA			+++	500,0
5	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	<i>L. zeae</i> CCM 7069 ^T	++	25,8
6	Dynal DNA Direct			++	16,2
7	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			++	15,2
8	P(HEMA-GMA) ox. II (2 mg/ml)			+	10,3
9	Perovskit 439			+	15,3
10	DNA standard λ /Hind III	-	-	-	-
11	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	<i>L. zeae</i> CCM 7069 ^T	++	11,8
12	Dynal DNA Direct			+	11,3
13	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			++	12,2
14	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			++	25,9
15	Perovskit 439			+	10,3

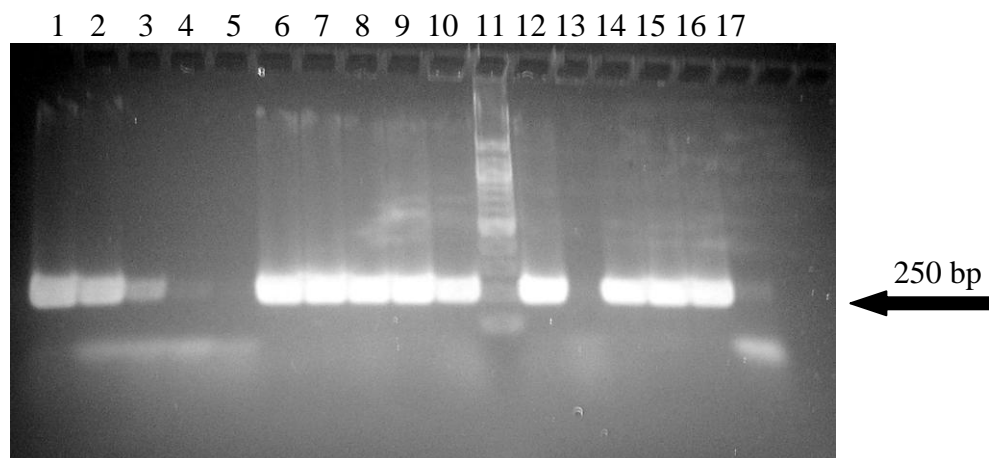
- +/- DNA byla detekována velmi slabě,
 + DNA byla detekována v malém množství,
 ++ DNA byla detekována ve větším množství,
 +++ DNA byla detekována ve velkém množství.

- Bakteriální DNA obou kmenů, *L. plantarum* CCM 7039^T i *L. zeae* CCM 7069^T, byla izolována pomocí všech testovaných magnetických nosičů. Koncentrace izolované DNA kmene *L. plantarum* CCM 7039^T se pohybovala v rozmezí 3,5 - 27,8 ng/μl, koncentrace DNA kmene *L. zeae* CCM 7069^T byla od 2,3 do 20,9 ng/μl. Nejvyšší koncentrace DNA bylo u obou kmenů dosaženo pomocí magnetického nosiče Dynal DNA Direct v prostředí 16 % PEG 6000.
- V supernatantech byla DNA detekována ve všech vzorcích. Byla opět potvrzena lyze buněk a přítomnost dostatečného množství DNA v hrubých lyzátech buněk.

5.14.4 Ověření kvality izolované DNA kmenů *L. plantarum* CCM 7039^T a *L. zeae* CCM 7069^T s využitím magnetických nosičů pomocí polymerasové řetězové reakce s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* (PPP Master Mix)

Kvalita izolované DNA kmenů *L. plantarum* CCM 7039^T a *L. zeae* CCM 7069^T byla ověřena v PCR (Obr. 30 a Tabulka 37; Obr. 31 a Tabulka 38). Objemy jednotlivých

komponent jsou uvedeny v Tabulce 9 v kapitole Metody. K reakci byl použit program LBC ROD (Tabulka 6).



Obr. 30: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů (250 bp) znázorňující vliv použitých magnetických částic a koncentrace PEG 6000 na citlivost PCR (*L. plantarum* CCM 7039^T)

Tabulka 37: Schéma nanesení PCR produktů na agarosový gel při studiu citlivosti PCR s použitím různých magnetických částic a koncentrace PEG 6000

Běh	Magnetická částice/DNA	PEG 6000 (%)	Kmen	PCR produkt
1	pozitivní kontrola 1 ng/μl	-	<i>Lactobacillus</i> sp.	+++
2	pozitivní kontrola 100 pg/μl			+++
3	pozitivní kontrola 10 pg/μl			++
4	pozitivní kontrola 1 pg/μl			+/-
5	pozitivní kontrola 100 fg/μl			-
6	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	<i>L.plantarum</i> CCM 7039 ^T	+++
7	Dynal DNA Direct			+++
8	P(HEMA-co-GMA) ox. I (2 mg/ml)			+++
9	P(HEMA-co-GMA) ox. II(2 mg/ml)			+++
10	Perovskit 439			+++
11	DNA standard (100 bp)	-	-	-
12	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	<i>L.plantarum</i> CCM 7039 ^T	+++
13	Dynal DNA Direct			- (*)
14	P(HEMA-co-GMA) ox. I (2 mg/ml)			+++
15	P(HEMA-co-GMA) ox. II(2 mg/ml)			+++
16	Perovskit 439			+++
17	negativní kontrola	-	-	-

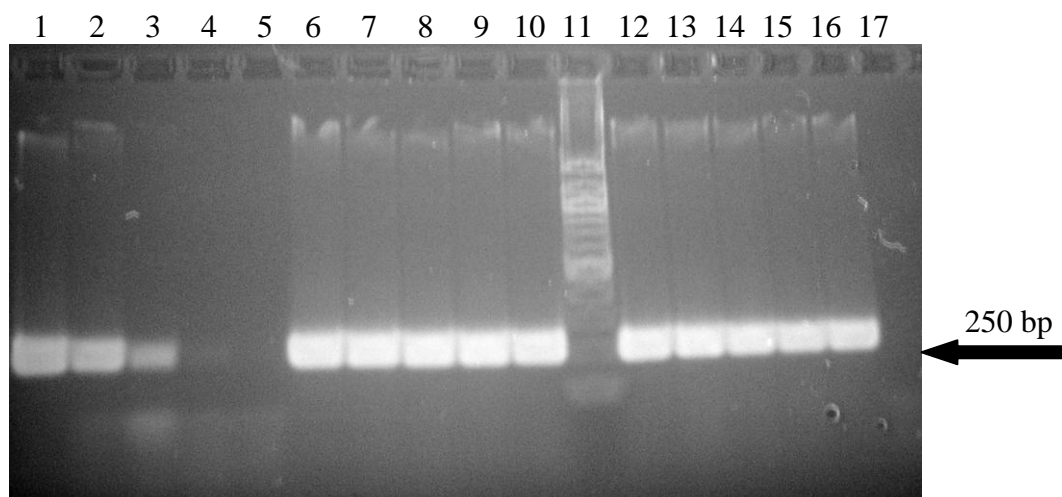
- PCR produkt nebyl detekován,

+/- PCR produkt detekován velmi slabě,

++ PCR produkt detekován ve větším množství,

+++ PCR produkt detekován ve velkém množství,

* PCR produkt byl prokázán ve velkém množství při opakování PCR (Obr. 36).



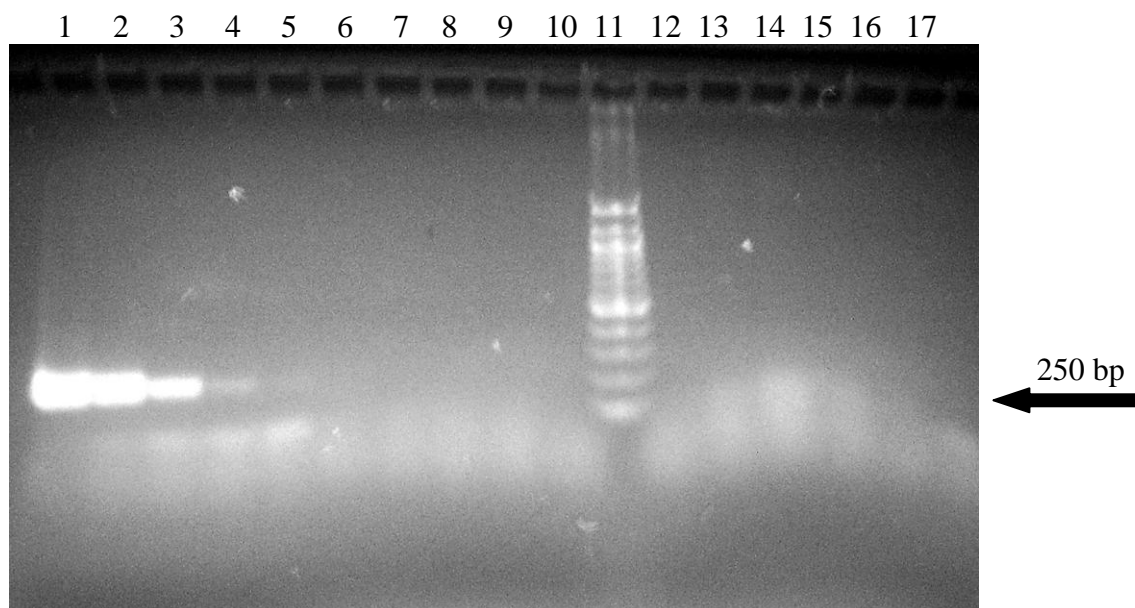
Obr. 31: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů (250 bp) znázorňující vliv použitých magnetických částic a koncentrace PEG 6000 na citlivost PCR (*L. zeae* CCM 7069^T)

Tabulka 38: Schéma nanesení PCR produktů na agarosový gel při studiu citlivosti PCR s použitím různých magnetických částic a koncentrace PEG 6000

Běh	Magnetická částice/DNA	PEG 6000 (%)	Kmen	PCR produkt
1	pozitivní kontrola 1 ng/μl	-	<i>Lactobacillus</i> sp.	+++
2	pozitivní kontrola 100 pg/μl			+++
3	pozitivní kontrola 10 pg/μl			++
4	pozitivní kontrola 1 pg/μl			+/-
5	pozitivní kontrola 100 fg/μl			-
6	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	<i>L. zeae</i> CCM 7069 ^T	+++
7	Dynal DNA Direct			+++
8	P(HEMA-co-GMA) ox. I (2 mg/ml)			+++
9	P(HEMA-co-GMA) ox. II(2 mg/ml)			+++
10	Perovskit 439			+++
11	DNA standard (100 bp)	-	-	-
12	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	<i>L. zeae</i> CCM 7069 ^T	+++
13	Dynal DNA Direct			+++
14	P(HEMA-co-GMA) ox. I (2 mg/ml)			+++
15	P(HEMA-co-GMA) ox. II(2 mg/ml)			+++
16	Perovskit 439			+++
17	negativní kontrola	-	-	-

- PCR produkt nebyl detekován,
- +/- PCR produkt detekován velmi slabě,
- ++ PCR produkt detekován ve větším množství,
- +++ PCR produkt detekován ve velkém množství.

Stejná PCR reakce byla provedena i s příslušnými supernatanty po izolaci DNA obou výše uvedených kmenů.



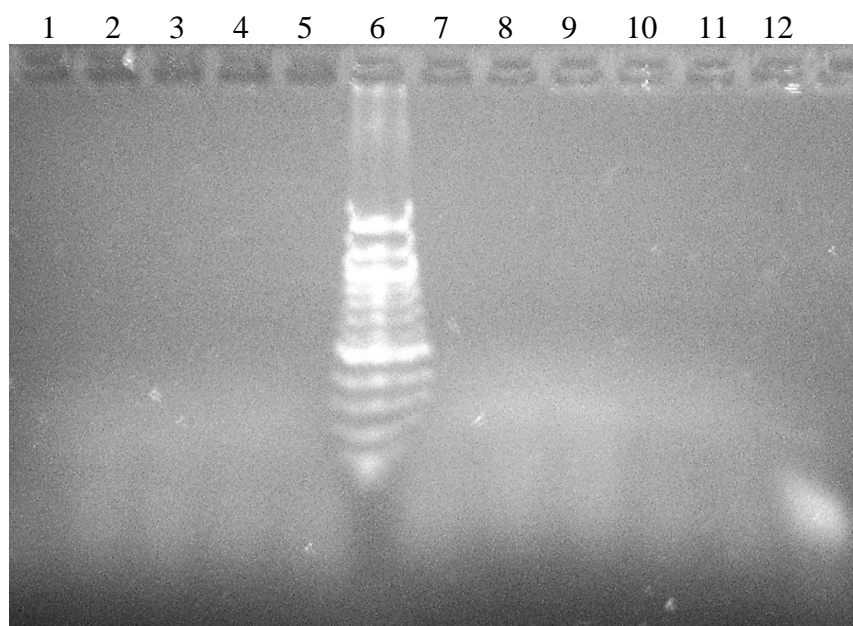
Obr. 32: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů (250 bp) příslušných supernatantů po izolaci DNA magnetickou separací (*L. plantarum* CCM 7039^T)

Tabulka 39: Schéma nanesení PCR produktů příslušných supernatantů na agarosový gel

Běh	Magnetická částice/DNA	PEG 6000 (%)	Kmen	PCR produkt
1	pozitivní kontrola 1 ng/μl	-	<i>Lactobacillus</i> sp.	+++
2	pozitivní kontrola 100 pg/μl			+++
3	pozitivní kontrola 10 pg/μl			++
4	pozitivní kontrola 1 pg/μl			+/-
5	pozitivní kontrola 100 fg/μl			-
6	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	<i>L. plantarum</i> CCM 7039 ^T	-
7	Dynal DNA Direct			-
8	P(HEMA-co-GMA) ox. I (2 mg/ml)			-
9	P(HEMA-co-GMA) ox. II(2 mg/ml)			-
10	Perovskit 439			-
11	DNA standard (100 bp)	-	-	-
12	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	<i>L. plantarum</i> CCM 7039 ^T	-
13	Dynal DNA Direct			-
14	P(HEMA-co-GMA) ox. I (2 mg/ml)			-
15	P(HEMA-co-GMA) ox. II(2 mg/ml)			-
16	Perovskit 439			-
17	negativní kontrola	-	-	-

- PCR produkt nebyl detekován,
- +/- PCR produkt detekován velmi slabě,
- ++ PCR produkt detekován ve větším množství,
- +++ PCR produkt detekován ve velkém množství.

PCR, která byla provedena se supernatanty kmene *L. zea* CCM 7069^T (Obr. 33, Tabulka 40), probíhala současně s PCR supernatantů kmene *L. plantarum* CCM 7039^T (Obr. 32, Tabulka 39). Proto nebyla opakovaně použita pozitivní kontrola.



Obr. 33: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů (250 bp) příslušných supernatantů po izolaci DNA magnetickou separací (*L. zea* CCM 7069^T)

Tabulka 40: Schéma nanesení PCR produktů příslušných supernatantů na agarosový gel

Běh	Magnetická částice/DNA	PEG 6000 (%)	Kmen	PCR produkt
1	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	<i>L. zea</i> CCM 7069 ^T	-
2	Dynal DNA Direct			-
3	P(HEMA-co-GMA) ox. I (2 mg/ml)			-
4	P(HEMA-co-GMA) ox. II(2 mg/ml)			-
5	Perovskit 439			-
6	DNA standard (100 bp)	-	-	-
7	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	<i>L. zea</i> CCM 7069 ^T	-
8	Dynal DNA Direct			-
9	P(HEMA-co-GMA) ox. I (2 mg/ml)			-
10	P(HEMA-co-GMA) ox. II(2 mg/ml)			-
11	Perovskit 439			-
12	negativní kontrola	-	-	-

- PCR produkt nebyl detekován.

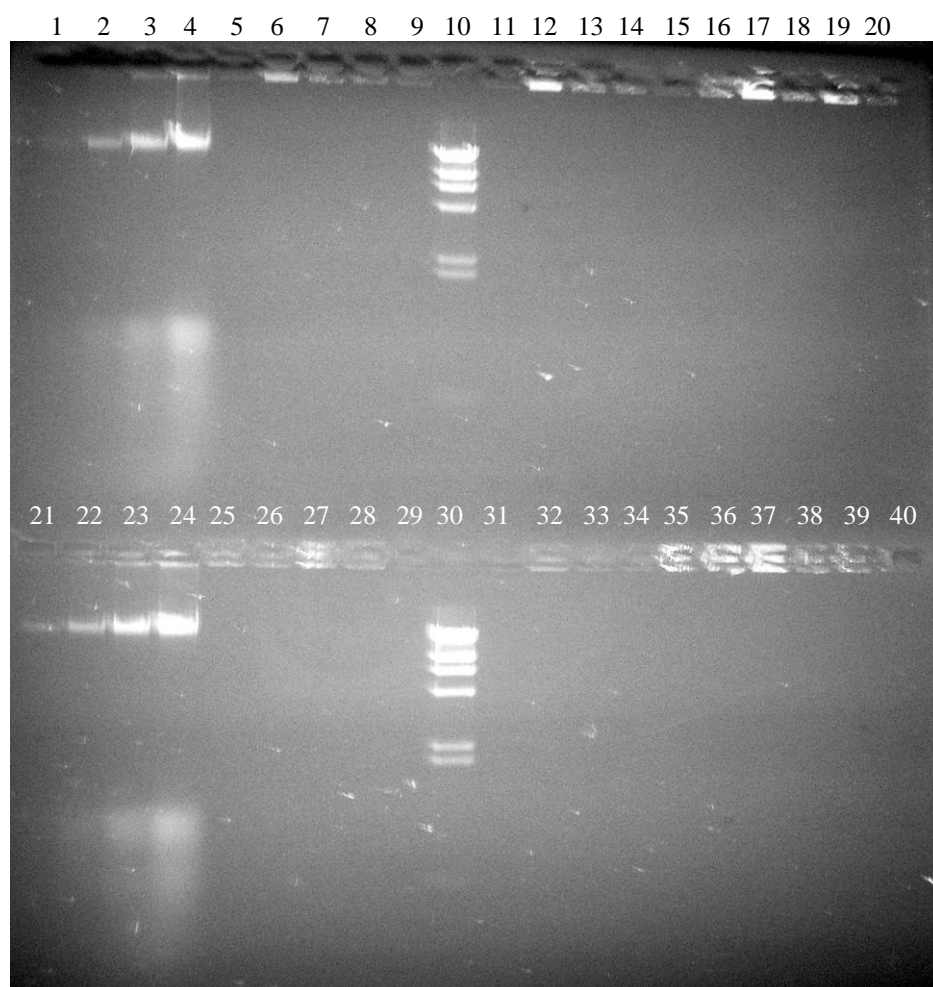
- Kvalita izolované DNA kmenů *L. plantarum* CCM 7039^T i *L. zea* CCM 7069^T eluované z různých magnetických nosičů při různé koncentraci PEG 6000 byla ověřena metodou PCR. Po amplifikaci 1 µl eluátů byly získány PCR produkty (250 bp) přibližně stejné intenzity.
- PCR produkty příslušných supernatantů nebyly na agarosovém gelu detekovány pravděpodobně ze stejného důvodu jako u PCR produktů supernatantů kmene *L. amylovorus* CCM 4380^T (kapitola 5.14.2).

5.15 Izolace DNA z hrubých lyzátů reálných vzorků s využitím magnetických nosičů

Izolace DNA pomocí magnetických nosičů z hrubých lyzátů reálných vzorků probíhala podle postupu popsaneho v kapitole Metody. K izolaci DNA bylo použito 5 různých magnetických částic jako při izolaci DNA z bakteriálních kultur. Paralelně probíhala izolace v 8 a 16 % PEG 6000. Jednotlivé komponenty byly smíchány v poměrech podle Tabulky 4 uvedené v kapitole Metody.

Jako reálné vzorky byly použity jogurt Revital a jogurtové nápoje Actimel a Jihočeský zákys s ovocem (Zákys). Tyto reálné vzorky jsou podrobněji popsány v kapitole 4.1.2.

Na agarosový gel bylo nanášeno 30 μ l izolované DNA a byla provedena elektroforéza (Obr. 34, Tabulka 41).



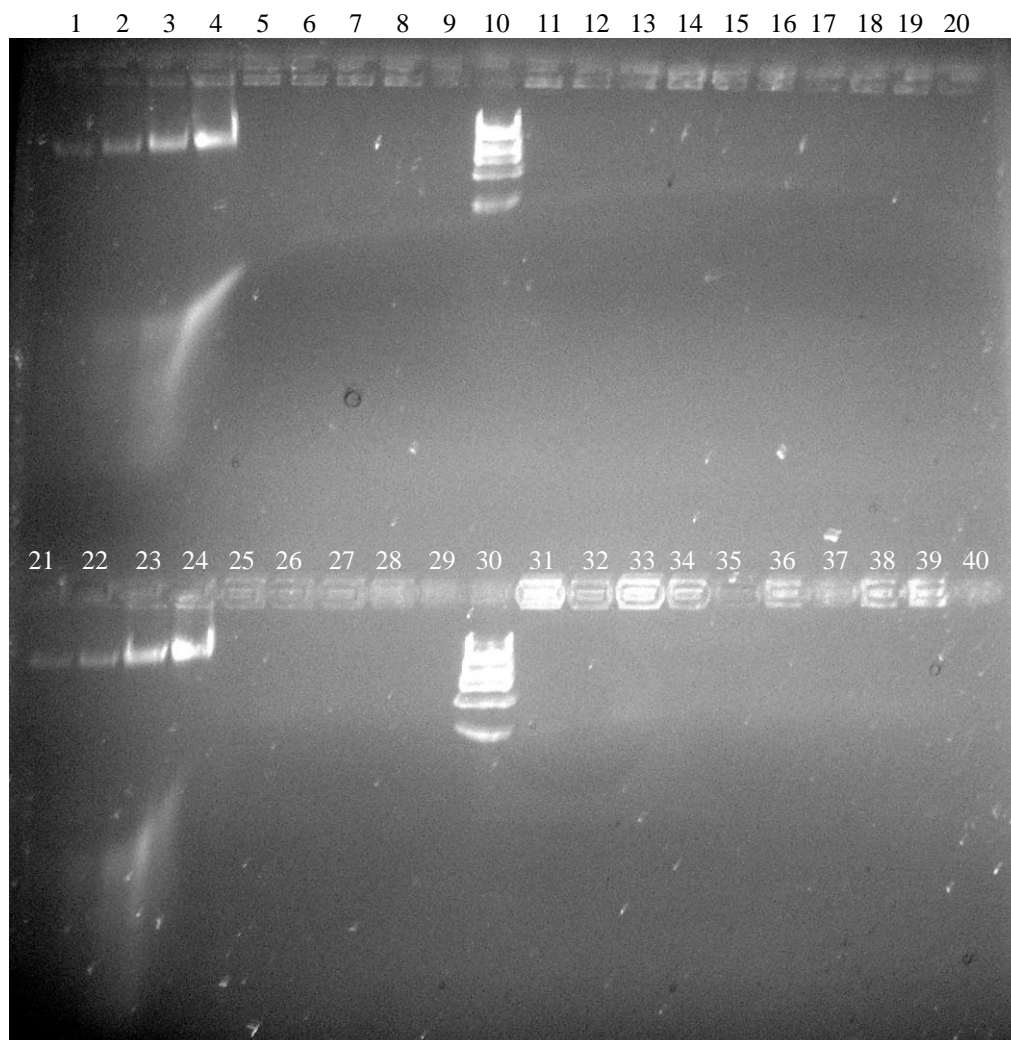
Obr. 34: Agarosová gelová elektroforéza ukazující vliv složení magnetických částic na množství izolované DNA z reálných vzorků

Tabulka 41: Schéma nanesení vzorků na agarosový gel při studiu vlivu složení magnetických částic na množství izolované DNA z reálných vzorků

Běh	Magnetická částice/DNA	PEG 6000 (%)	Kmen/Reálný vzorek	DNA	Koncentrace DNA (ng/μl)
1	DNA	-	<i>Salmonella</i> sp.	+/-	50,0
2	DNA			+	100,0
3	DNA			++	250,0
4	DNA			+++	500,0
5	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	Actimel	-	8,3
6	Dynal DNA Direct			-	7,1
7	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			-	3,0
8	P(HEMA-GMA) ox. II(2 mg/ml)			-	-
9	Perovskit 439			-	3,2
10	DNA standard λ /Hind III	-	-	-	-
11	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	Actimel	-	9,9
12	Dynal DNA Direct			-	27,9
13	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			-	0,8
14	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			-	2,5
15	Perovskit 439			-	5,1
16	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	Revital	-	5,1
17	Dynal DNA Direct			-	19,3
18	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			-	3,8
19	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			-	7,0
20	Perovskit 439			-	5,8
21	DNA	-	<i>Salmonella</i> sp.	+/-	50
22	DNA			+	100
23	DNA			++	250
24	DNA			+++	500
25	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	Zákys	-	8,8
26	Dynal DNA Direct			-	2,8
27	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			-	4,6
28	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			-	2,5
29	Perovskit 439			-	7,5
30	DNA standard λ /Hind III	-	-	-	-
31	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	Zákys	-	1,9
32	Dynal DNA Direct			-	16,7
33	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			-	2,0
34	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			-	1,9
35	Perovskit 439			-	9,1
36	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	Revital	-	9,0
37	Dynal DNA Direct			-	9,5
38	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			-	0,3
39	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			-	5,1
40	Perovskit 439			-	3,6

- DNA nebyla detekována; +/- DNA detekována velmi slabě; + DNA detekována v malém množství; ++ DNA detekována ve větším množství; +++DNA detekována ve velkém množství

Agarosová gelová elektroforéza byla provedena i se supernatanty, které byly získány po navázání DNA z reálných vzorků na magnetické částice (Obr. 35, Tabulka 42). Na gel bylo nanášeno 30 μ l supernatantu a 10 μ l standardu λ Hind III.



Obr. 35: Agarosová gelová elektroforéza se supernatanty po izolaci DNA z reálných vzorků pomocí různých magnetických nosičů

Tabulka 42: Schéma nanesení vzorků supernatantů po izolaci DNA reálných vzorků magnetickou separací na agarosový gel

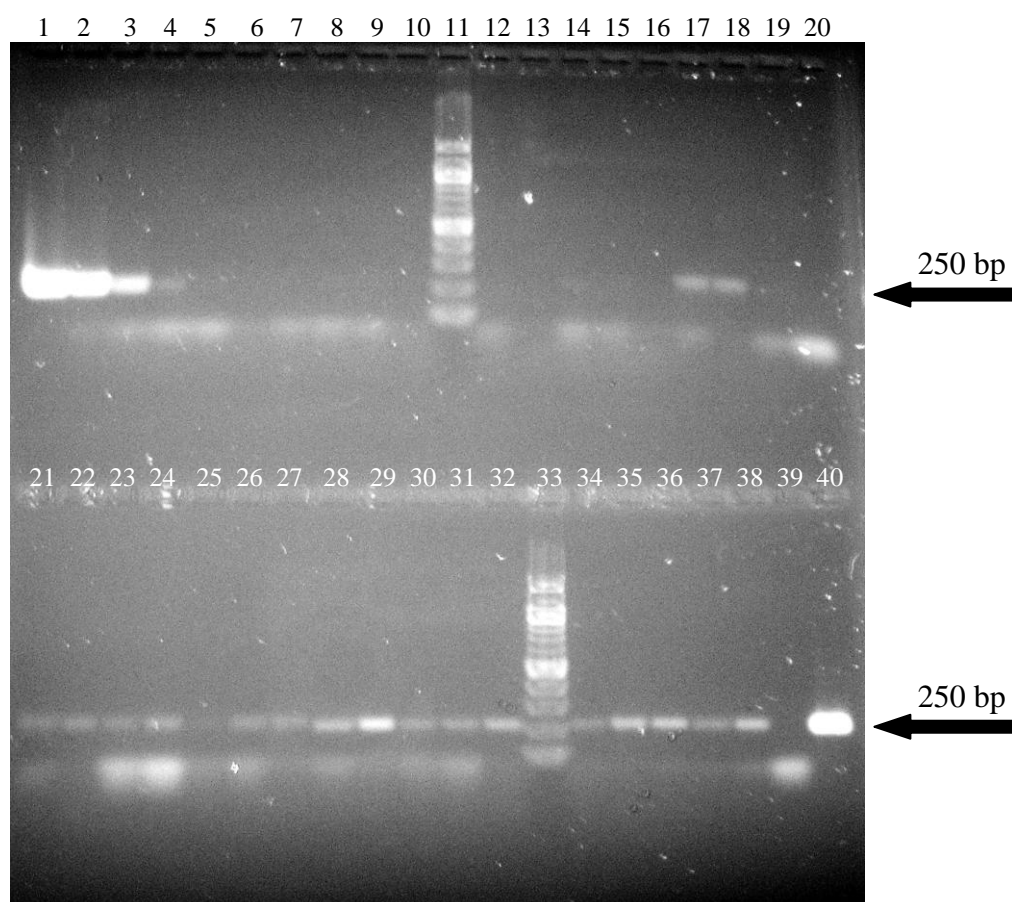
Běh	Magnetická částice/DNA	PEG 6000 (%)	Kmen/Reálný vzorek	DNA	Koncentrace DNA (ng/μl)
1	DNA	-	<i>Salmonella</i> sp.	+/-	50,0
2	DNA			+	100,0
3	DNA			++	250,0
4	DNA			+++	500,0
5	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	Actimel	-	16,9
6	Dynal DNA Direct			-	19,2
7	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			-	15,0
8	P(HEMA-GMA) ox. II(2 mg/ml)			-	10,8
9	Perovskit 439			-	13,2
10	DNA standard λ /Hind III	-	-	-	-
11	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	Actimel	-	15,4
12	Dynal DNA Direct			-	17,1
13	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			-	13,8
14	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			-	13,3
15	Perovskit 439			-	11,5
16	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	Revital	-	7,4
17	Dynal DNA Direct			-	10,9
18	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			-	10,2
19	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			-	11,4
20	Perovskit 439			-	11,9
21	DNA	-	<i>Salmonella</i> sp.	+/-	50
22	DNA			+	100
23	DNA			++	250
24	DNA			+++	500
25	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	Zákys	-	10,9
26	Dynal DNA Direct			-	13,4
27	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			-	11,7
28	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			-	12,9
29	Perovskit 439			-	16,7
30	DNA standard λ /Hind III	-	-	-	-
31	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	Zákys	-	15,3
32	Dynal DNA Direct			-	17,3
33	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			-	16,0
34	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			-	14,4
35	Perovskit 439			-	9,6
36	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	Revital	-	12,0
37	Dynal DNA Direct			-	13,3
38	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			-	13,0
39	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			-	12,0
40	Perovskit 439			-	10,4

- DNA nebyla detekována; +/- DNA detekována velmi slabě; + DNA detekována v malém množství; ++ DNA detekována ve větším množství; +++DNA detekována ve velkém množství

- DNA izolovaná z reálných vzorků pomocí magnetických nosičů nebyla na agarosovém gelu po proběhnutí elektroforézy detekovatelná. Nejvyšší koncentrace DNA bylo dosaženo u výrobku Actimel a Jihočeský zákys s ovocem v prostředí 16 % PEG 6000 a s využitím magnetického nosiče Dynal DNA Direct. Tento nosič se jevil jako nejlepší i v případě výrobku Revital. Nejvyšší koncentrace bylo ale dosaženo v prostředí 8 % PEG 6000.
- V supernatantech také nebyla DNA na agarosovém gelu detekována. Naměřené koncentrace DNA v supernatantech byly vyšší než v eluátech.
- Důvodem, proč nebyla DNA z reálných vzorků po elektroforéze detekována, je zřejmě nižší množství bakterií ve výrobcích. Při izolaci z čistých bakteriálních kultur DNA totiž detekována byla.

5.16 Ověření kvality izolované DNA z reálných vzorků s využitím magnetických nosičů pomocí polymerasové řetězové reakce s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* (PPP Master Mix)

Kvalita DNA izolované z reálných vzorků byla ověřena v PCR (Obr. 36, Tabulka 43). Objemy jednotlivých komponent jsou uvedeny v Tabulce 9 v kapitole Metody. K reakci byl použit program LBC ROD (Tabulka. 6).



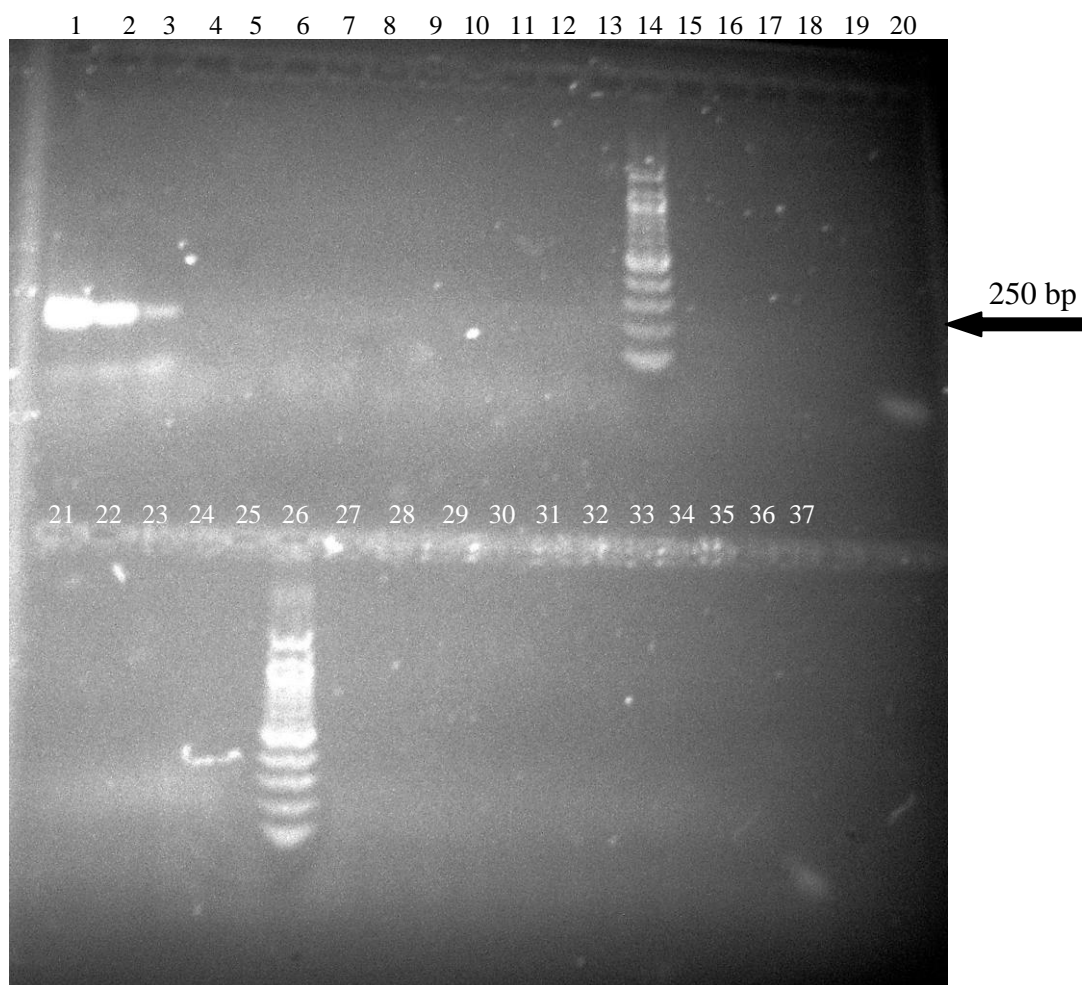
Obr. 36: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů (250 bp) ukazující vliv použitých magnetických částic a koncentrace PEG 6000 na citlivost PCR

Tabulka 43: Schéma nanesení PCR produktů na agarosový gel při studiu citlivosti PCR s použitím různých magnetických částic a koncentrace PEG 6000

Běh	Magnetická částice/DNA	PEG 6000 (%)	Kmen/Reálný vzorek	PCR produkt
1	pozitivní kontrola 1 ng/μl	-	<i>Lactobacillus</i> sp.	+++
2	pozitivní kontrola 100 pg/μl			+++
3	pozitivní kontrola 10 pg/μl			++
4	pozitivní kontrola 1 pg/μl			+/-
5	pozitivní kontrola 100 fg/μl			-
6	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	Zákys	-
7	Dynal DNA Direct			-
8	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			-
9	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			-
10	Perovskit 439			-
11	DNA standard (100 bp)	-	-	-
12	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	Zákys	-
13	Dynal DNA Direct			-
14	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			-
15	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			-
16	Perovskit 439			-
17	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	Revital	+
18	Dynal DNA Direct			+
19	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			-
20	negativní kontrola	-	-	-
21	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)	8	Revital	+
22	Perovskit 439			+
23	Silikagel (Merck) (10x ředěný)			+
24	Dynal DNA Direct	16	Revital	+
25	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			+/-
26	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			+
27	Perovskit 439			+
28	Silikagel (Merck) (10x ředěný)			+
29	Dynal DNA Direct	8	Actimel	++
30	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			+
31	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			+
32	Perovskit 439			+
33	DNA standard (100 bp)			-
34	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	Actimel	+
35	Dynal DNA Direct			++
36	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			++
37	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			+
38	Perovskit 439			++
39	negativní kontrola	-	-	-
40	Dynal DNA Direct	16	<i>L.plantarum</i> CCM 7039 ^T	+++

- PCR produkt nebyl detekována; +/- PCR produkt detekován velmi slabě; + PCR produkt detekován v malém množství; ++ PCR produkt detekován ve větším množství; +++PCR produkt detekován ve velkém množství

PCR reakce byla provedena i s příslušnými supernatanty po izolaci DNA z reálných vzorků (Obr. 37, Tabulka 44).



Obr. 37: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů (250 bp) supernatantů po izolaci DNA z reálných vzorků magnetickou separací

Tabulka 44: Schéma nanesení PCR produktů supernatantů po izolaci DNA z reálných vzorků magnetickou separací na agarosový gel

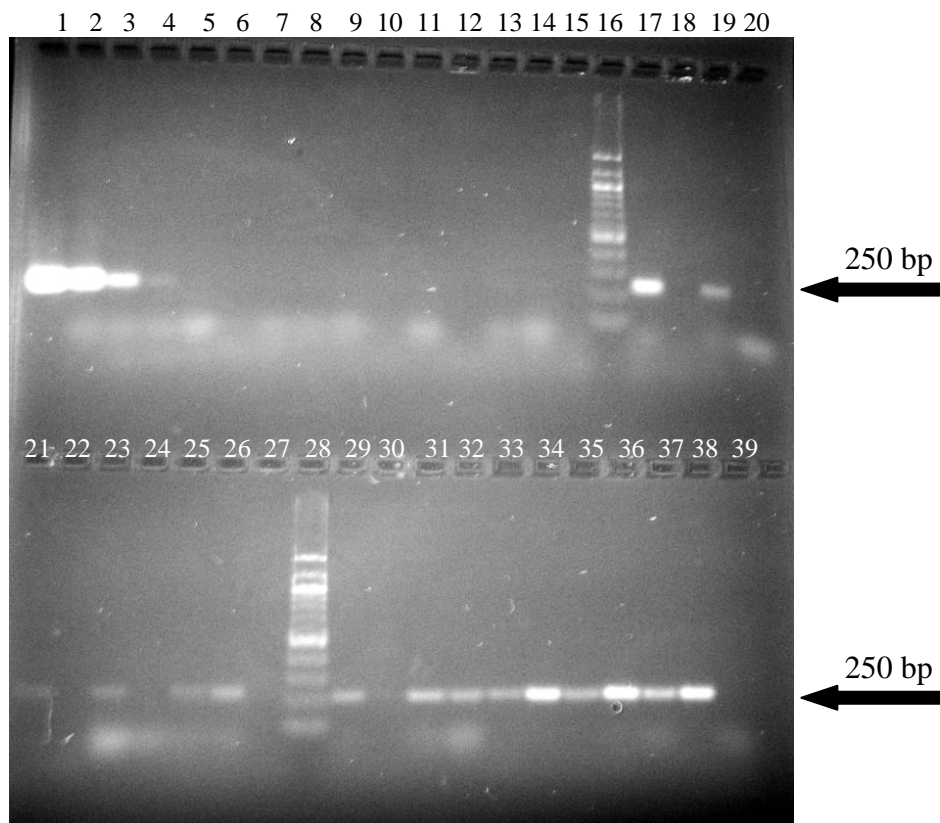
Běh	Magnetická částice/DNA	PEG 6000 (%)	Kmen/Reálný vzorek	PCR produkt
1	pozitivní kontrola 100 pg/μl	-	++	+++
2	pozitivní kontrola 10 pg/μl			++
3	pozitivní kontrola 1 pg/μl			+/-
4	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	Zákys	-
5	Dynal DNA Direct			-
6	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			-
7	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			-
8	Perovskit 439			-
9	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	Zákys	-
10	Dynal DNA Direct			-
11	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			-
12	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			-
13	Perovskit 439	-	-	-
14	DNA standard (100 bp)	-	-	-
15	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	Revital	-
16	Dynal DNA Direct			-
17	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			-
18	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			-
19	Perovskit 439			-
20	negativní kontrola	-	-	-
21	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	Revital	-
22	Dynal DNA Direct			-
23	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			-
24	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			-
25	Perovskit 439			-
26	DNA standard (100 bp)	-	-	-
27	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	Actimel	-
28	Dynal DNA Direct			-
29	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			-
30	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			-
31	Perovskit 439	-	-	-
32	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	Actimel	-
33	Dynal DNA Direct			-
34	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			-
35	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			-
36	Perovskit 439			-
37	negativní kontrola	-	-	-

- PCR produkt nebyl detekován,
- +/- PCR produkt detekován velmi slabě,
- ++ PCR produkt detekován ve větším množství,
- +++ PCR produkt detekován ve velkém množství.

- Izolovaná DNA byla amplifikována v PCR. Intenzivní PCR produkty byly detekovány po amplifikaci DNA izolované z výrobku Actimel pomocí všech magnetických nosičů v prostředí 16 % PEG 6000 a 2 M NaCl. V prostředí 8 % PEG 6000 byly PCR produkty také detekovány. Pozitivních výsledků bylo dosaženo i v případě výrobku Revital. Po amplifikaci DNA, která byla izolována z výrobku Jihočeský zákys, nebyl detekován PCR produkt. Množství DNA nebylo zřejmě dostatečné pro amplifikaci v PCR. Jihočeský zákys má deklarovaný obsah pouze jednoho druhu rodu *Lactobacillus* ve srovnání s dalšíma dvěma výrobky.
- V supernatantech nebyl detekován žádný PCR produkt. Jak již bylo zmíněno, PEG 6000 je inhibitorem PCR.

5.17 Ověření kvality izolované DNA z reálných vzorků s využitím magnetických nosičů pomocí polymerasové řetězové reakce s primery specifickými pro rod *Lactobacillus* (PPP Master Mix), kdy objem DNA v PCR směsi byl zvýšen z 1 μl na 5 μl

Protože v předchozí PCR nebyly některé z PCR produktů detekovány, bylo zvýšeno množství DNA v PCR směsi z 1 na 5 μl. Toto zvýšení bylo na úkor PCR vody, celkový objem PCR směsi (25 μl) byl tedy zachován. Agarosový gel s PCR produkty po elektroforéze je na Obr. 38. Schéma nanesení PCR produktů na gel je uvedeno v Tabulce 45.



Obr. 38: Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů (250 bp) ukazující vliv použitých magnetických částic a koncentrace PEG 6000 na citlivost PCR

Tabulka 45: Schéma nanesení PCR produktů na agarosový gel při studiu citlivosti PCR s použitím různých magnetických částic a koncentrace PEG 6000

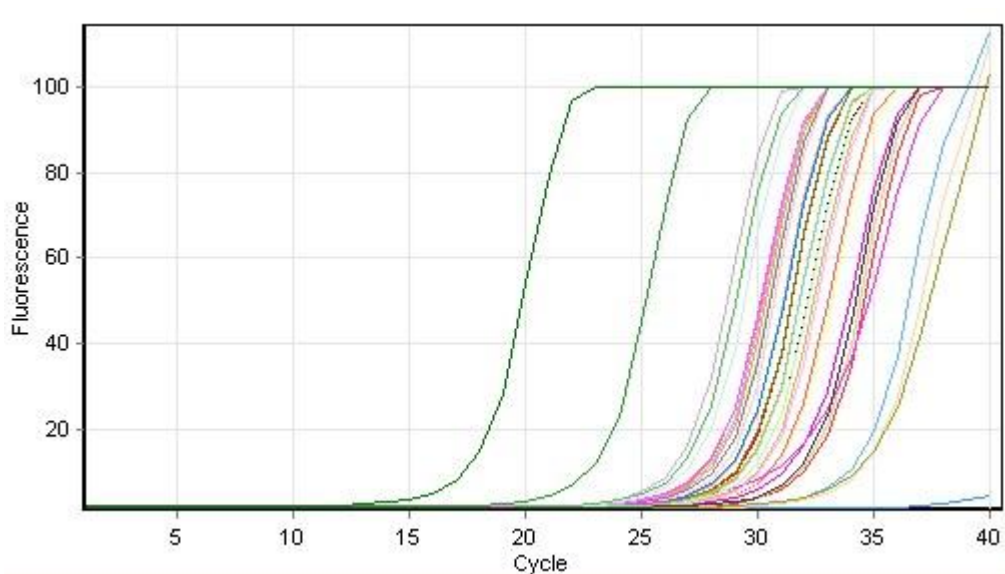
Běh	Magnetická částice/DNA	PEG 6000 (%)	Kmen/Reálný vzorek	PCR produkt
1	pozitivní kontrola 1 ng/μl	-	<i>Lactobacillus</i> sp.	+++
2	pozitivní kontrola 100 pg/μl			+++
3	pozitivní kontrola 10 pg/μl			++
4	pozitivní kontrola 1 pg/μl			+/-
5	pozitivní kontrola 100 fg/μl			-
6	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	Zákys	-
7	Dynal DNA Direct			-
8	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			-
9	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			-
10	Perovskit 439			-
11	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	Zákys	-
12	Dynal DNA Direct			-
13	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			-
14	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			-
15	Perovskit 439			-
16	DNA standard (100 bp)	-	-	-
17	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	Revital	++
18	Dynal DNA Direct			-
19	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			+
20	negativní kontrola	-	-	-
21	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)	8	Revital	+/-
22	Perovskit 439			-
23	Silikagel (Merck) (10x ředěný)			+/-
24	Dynal DNA Direct	16	Revital	-
25	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			+/-
26	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			+
27	Perovskit 439			-
28	DNA standard (100 bp)	-	-	-
29	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	Actimel	+
30	Dynal DNA Direct			-
31	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			+
32	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			+
33	Perovskit 439			+
34	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	Actimel	++
35	Dynal DNA Direct			+
36	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			++
37	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			+
38	Perovskit 439			++
39	negativní kontrola	-	-	-

- PCR produkt nebyl detekována; +/- PCR produkt detekován velmi slabě; + PCR produkt detekován v malém množství; ++ PCR produkt detekován ve větším množství; +++PCR produkt detekován ve velkém množství

- Zvýšením objemu DNA z 1 na 5 μ l v PCR směsi bylo dosaženo přibližně stejných výsledků jako v předchozí PCR. V případě výrobku Jihočeský zákys opět nebyl detekován žádný PCR produkt. Množství DNA nebylo zřejmě ani po tomto zvýšení dostatečné pro amplifikaci v PCR.




5.18 Ověření kvality a kvantifikace DNA izolované z reálných vzorků s využitím magnetických nosičů pomocí Real Time PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus*

Objemy jednotlivých PCR komponent jsou uvedeny v Tabulce 10 v kapitole Metody. K reakci byl použit program qLBC ROD (Tabulka 11). Byly získány křivky závislosti fluorescence na počtu cyklů (Obr. 39). V Tabulce 46 jsou vypočtené koncentrace DNA v jednotlivých vzorcích.

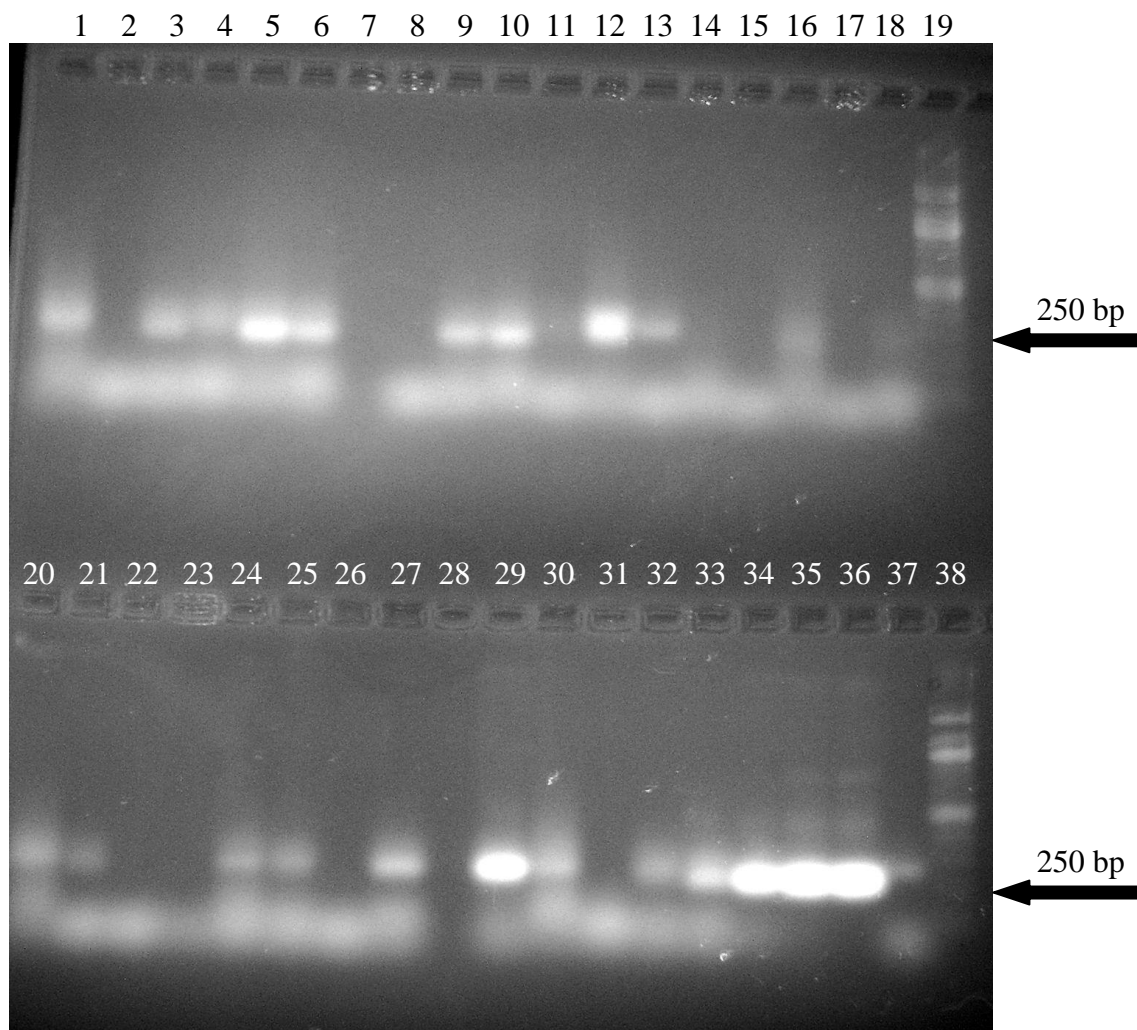


Obrázek 39: Závislost fluorescence na počtu cyklů v qPCR

Tabulka 46: Barevné označení křivky závislosti fluorescence na počtu cyklů v qPCR, Ct a vypočtená koncentrace DNA ve vzorku. Amplifikována byla DNA izolovaná z hrubého lyzátu buněk mléčných výrobků v prostředí 8% a 16% PEG.

Barva křivky	Magnetická částice/DNA	PEG 6000 (%)	DNA z výrobku	Ct	Koncentrace DNA (ng/μl)
	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	Actimel	27,70	0,0006
	Dynal DNA Direct			30,63	0,0001
	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			29,21	0,0002
	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			27,41	0,0007
	Perovskit 439			27,07	0,0010
	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	Actimel	27,34	0,0008
	Dynal DNA Direct			-	-
	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			32,55	0,0000
	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			27,98	0,0005
	Perovskit 439			25,64	0,0028
	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	Revital	26,27	0,0017
	Dynal DNA Direct			27,88	0,0005
	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			28,64	0,0003
	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			30,49	0,0001
	Perovskit 439			33,01	0,0000
	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	Revital	27,69	0,0006
	Dynal DNA Direct			33,12	0,0000
	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			26,57	0,0014
	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			26,91	0,0011
	Perovskit 439			29,31	0,0002
	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	Zákys	29,92	0,0001
	Dynal DNA Direct			30,49	0,0001
	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			26,31	0,0017
	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			26,63	0,0013
	Perovskit 439			28,74	0,0003
	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	Zákys	28,48	0,0003
	Dynal DNA Direct			-	-
	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			26,79	0,0012
	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			24,89	0,0049
	Perovskit 439			21,44	0,0659
	pozitivní kontrola 100 fg/μl	-	<i>Lactobacillus</i> sp.	28,50	0,0003
	pozitivní kontrola 1 pg/μl			27,93	0,0005
	pozitivní kontrola 10 pg/μl			25,36	0,0035
	pozitivní kontrola 100 pg/μl			21,63	0,0568
	pozitivní kontrola 1 ng/μl			16,31	3,0847
	negativní kontrola			30,41	0,0001

Byla provedena agarosová gelová elektroforéza PCR produktů získaných v qPCR na 1,8 % agarosovém gelu (Obr. 40, Tabulka 47).



Obr. 40: Agarosová gelová elektroforéza rodově specifických qPCR produktů (250 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná z reálných vzorků.

Tabulka 47: Schéma nanesení qPCR produktů (250 bp) na agarosový gel

Běh	Magnetická částice/DNA	PEG 6000 (%)	Vzorek/Kmen	PCR produkt
1	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	Actimel	+
2	Dynal DNA Direct			-
3	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			+
4	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			+
5	Perovskit 439			+++
6	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	Actimel	++
7	Dynal DNA Direct			-
8	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			-
9	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			++
10	Perovskit 439			++
11	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	8	Revital	+/-
12	Dynal DNA Direct			+++
13	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			+
14	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			-
15	Perovskit 439			-
16	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	Revital	+/-
17	Dynal DNA Direct			-
18	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			+/-
19	DNA standard (100 bp)	-	-	-
20	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)	16	Revital	+
21	Perovskit 439			+
22	Silikagel (Merck) (10x ředěný)			-
23	Dynal DNA Direct	8	Zákys	-
24	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			+
25	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			+
26	Perovskit 439			-
27	Silikagel (Merck) (10x ředěný)	16	Zákys	++
28	Dynal DNA Direct			-
29	P(HEMA-co-GMA) ox.I (2 mg/ml)			+++
30	P(HEMA-co-GMA) ox. II (2 mg/ml)			+
31	Perovskit 439			-
32	pozitivní kontrola 100 fg/μl	-	<i>Lactobacillus</i> sp.	+
33	pozitivní kontrola 1 pg/μl			++
34	pozitivní kontrola 10 pg/μl			+++
35	pozitivní kontrola 100 pg/μl			++++
36	pozitivní kontrola 1 ng/μl			++++
37	negativní kontrola			-
38	DNA standard (100 bp)	-	-	-

* Pravděpodobně došlo k přelití PCR produktu ze sousedního vzorku

- PCR produkt nebyl detekován; +/- PCR produkt detekován velmi slabě; + PCR produkt detekován v malém množství; ++ PCR produkt detekován ve větším množství; +++PCR produkt detekován ve velkém množství; ++++ PCR produkt detekován ve velmi velkém množství

- Byly získány křivky závislosti fluorescence na počtu cyklů, kde se potvrdilo, že nejvyšší koncentrace DNA byla v pozitivní kontrole 1 ng/μl, protože v tomto vzorku byl fluorescenční signál detekován při nejnižší hodnotě Ct = 16,3. Většina ostatních vzorků DNA měla hodnotu Ct přibližně v rozmezí 25-33.
- Při agarosové gelové elektroforéze byly PCR produkty detekovány v souladu s fluorometrickou detekcí. U vzorků DNA, které po amplifikaci nedávaly na gelu detekovatelné PCR produkty, nebyla vypočtena žádná koncentrace DNA nebo byla koncentrace DNA velmi nízká.
- Kvantitativní Real Time PCR byla ověřena přítomnost DNA rodu *Lactobacillus* i ve výrobku Jihočeský zákys. V klasické PCR nebyla amplifikace této DNA detekována.

VI. ZÁVĚR

Byl ověřen postup izolace bakteriální DNA z hrubých lyzátů bakteriálních kultur sbírkových probiotických kmenů, *L. amylovorus* CCM 4380^T, *L. zea* CCM 7069^T, *L. plantarum* CCM 7039^T, jak fenolovou extrakcí tak i vysolováním chloridem sodným. Fenolovou extrakcí bylo získáno přibližně dvojnásobné až trojnásobné množství DNA než vysolováním chloridem sodným. Optimální koncentrace chloridu sodného pro izolaci DNA byla 0,55 - 1,65 M. Oběma metodami byla izolována DNA v kvalitě vhodné pro PCR.

V případě izolace bakteriální DNA z hrubých lyzátů výše uvedených bakteriálních kultur probiotických kmenů s využitím různých magnetických nosičů bylo získáno menší množství DNA než v případě fenolové extrakce a vysolování chloridem sodným. DNA byla sice získána v menším množství, ale v kvalitě vhodné pro PCR, pomocí všech pěti druhů testovaných magnetických částic. Nejvyšší koncentrace izolované DNA bylo dosaženo magnetickou separací při použití magnetického nosiče Dynal DNA Direct.

Magnetická separace DNA s využitím stejných magnetických mikročástic byla použita i k izolaci DNA z fermentovaných mléčných výrobků. Kvalita izolované DNA byla ověřena pomocí klasické PCR; PCR produkty rozdílné intenzity byly detekovány u dvou mléčných výrobků, a to Actimel a Revital. Po proběhnutí kvantitativní Real Time PCR byly PCR produkty detekovány i u třetího výrobku, Jihočeského zákysu.

Závěrem lze konstatovat, že všechny tři metody izolace DNA jsou vhodné pro izolaci DNA z bakteriálních kultur pro PCR. Metoda magnetické separace DNA je vhodnou metodou pro izolaci DNA z mléčných výrobků v kvalitě vhodné pro PCR.

SEZNAM LITERATURY

- [1] Gibson, G. R., Rastall, R. A.: *Prebiotics: Development and Application*. John Wiley and Sons, Ltd. 2006.
- [2] Ouwehand, A. C., Salminen, S., Isolauri E.: *Probiotics: an overview of beneficial effects*. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 279-289. 2002.
- [3] Ray, B.: *Fundamental Food Microbiology*. 2nd edition. Boca Raton: CRC Press. 133 - 161. 2001
- [4] Ljungh, A., Torkel, W.: *Lactobacillus Molecular Biology – From Genomics to Probiotics*. Caister Academic Press, Norfolk. 2009.
- [5] Vaughan, E. E., de Vries, M. C., Zoetendal, E. G., Ben-Amor, K., Akkermans, A. D. L., de Vos, W. M.: *The Intestinal LABs*. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 341-352. 2002.
- [6] Rogelj, I., Matijašić, B. B., Majhenič, A. Č., Stojković, S.: *The survival and persistence of Lactobacillus acidophilus LF221 in different ecosystems*. *Int. J. Food Microbiol*, 76:83-91. 2002.
- [7] Stiles, M. E., Holzappel, W. H.: *Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy*. *Int. J. Food Microbiol*, 36: 1-29. 1997.
- [8] Hammes, W. P., Vogel, R. F.: *The genus Lactobacillus*. 1995.
- [9] Vermicon - Phylobase (Database for fast and reliable information about microorganisms and their phylogeny) – oficiální webové stránky dostupné z: <http://62.245.228.5/>
- [10] Tamime, A.: *Probiotic Dairy Products*. Blackwell Publishing, SDT. 2005.
- [11] Reid, G.: *The Scientific basis for Probiotic Strains of Lactobacillus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, No. 9, 65: 3763-3766. 1999.
- [12] Salminen, S., von Wright, A.: *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and functional aspects*. 2nd edition. New York: Marcel Dekker, 1998.
- [13] Alander, M., Satokari, R., Korpela, R., Saxelin, M., Vilpponen-Salmela, T., Mattila-Sandholm T., von Wright, A.: *Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, Lactobacillus rhamnosus GG, after oral consumption*. *Appl. Environ. Microbiol.*1: 351-354. 1999.
- [14] Rosypal, S.: *Úvod do molekulární biologie (I)*. 4. vydání. Brno. 2006.
- [15] Vodrážka, Z.: *Biochemie*. 2. vydání. Praha: ACADEMIA, 2002. 180 s., 1. díl.

- [16] Dubernet, S., Desmasures, N., Guéguen, M.: *A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level*. FEMS Microbiol. Lett. 214: 271-275. 2002.
- [17] Louie M., Louie L., Simor A.E.: *The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases*. CMAJ. 163(3): 301-309. 2000
- [18] Barry, T., Glennon, C. M., Dunica, L. K., Gannon, F.: *The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria*. PCR Methods Appl., 1, 51-6. 1991
- [19] Wilson, I. G.: *Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification*. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3741-3751. 1997.
- [20] Španová, A., Rittich, B., Karpíšková, R., Čechová, L., Škapová, D.: *PCR identification of Salmonella cells in food and stool simplex after immunomagnetic separation*. Bioseparation 00:1-6. 2001.
- [21] Bickley, J., Short, J.K., Mc Dowell, D.G., Parkes, H.C.: *Polymerase Chain reaction (PCR) detection of Listeria monocytogenes in diluted milk and reversal of PCR inhibition cause by calcium ions*. Lett. Appl. Microbiol. 22: 153-158. 1996.
- [22] Sigma-Aldrich (qPCR Technical Guide) – oficiální webové stránky dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/>
- [23] 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., 30: 1751-1772. 2007.
- [24] Šafařík, I., Šafaříková, M.: *Use of magnetic techniques for the isolation of cells*. J. Chromatogr. B 722: 33-53. 1999.
- [25] Rittich, B., Španová, A., Horák, D., Beneš, M. J., Klesnilová, L., Petrová, K., Rybníkář, A.: *Isolation of microbial DNA by newly designed magnetic particles*. Colloid and Surfaces B: Biointerfaces, 52: 143-148. 2006.
- [26] Rudolf, I.: *Testování aktivity Dnázy I imobilizované na magnetických nosičích při degradaci různých druhů DNA*. Diplomová práce, Pff MU Brno, 75s. 2001.
- [27] Horák, D., Rittich, B., Španová, A., Beneš, M. J.: *Magnetic microparticulate carriers with immobilized selective ligands in DNA diagnostics*. Polymer, 46:1245-1255. 2005.
- [28] Vasilevskaya, V. V., Khokhlov, A. R., Matsuzawa, Y., Yoshikawa, K.: *Collapse of single DNA molecule in poly(ethyleneglycol) solutions*. J. Chem. Phys., Vol. 102, No. 16. 1995.
- [29] Kleideiter, G., Nordmeier, E.: *Poly(ethyleneglycol)-induced DNA condensation in aqueous/methanol containing low-molecular-weight electrolyte solutions, Part I. Theoretical considerations*. Polymer 40, 4013-4023. 1999.

[30] Němcová, E.: *Separace a modifikace (fragmentace) bakteriálních nukleových kyselin s využitím nových typů nosičů*. Diplomová práce, PřF MU Brno. 2007.

[31] Greisen, K., Loeffelholz, M., Purohit, A., Leong, D.: *PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid*. J Clin Microbiol.;32:335–351. 1994

SEZNAM ZKRATEK

A ₆₀₀	absorbance o vlnové délce 600 nm
CFU	colony forming unit (kolonie tvořící jednotku)
Ct	hodnota prahového cyklu
dNTPs	2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfáty
dATP	2'-deoxyadenosin-5'-trifosfát
dCTP	2'-deoxycytidin-5'-trifosfát
dGTP	2'-deoxyguanosin-5'-trifosfát
dTTP	2'-deoxythymidin-5'-trifosfát
dsDNA	dvouřetězcová deoxyribonukleová kyselina
GMA	glycidyl methakrylátu
HEMA	2-hydroxyethyl methakrylátu
HL	hrubý lyzát buněk
IgG	imunoglobulin G
PCR	polymerasová řetězová reakce
PEG	poly(ethylenglykol)
PTS	fosfoenolpyruvát-dependentní fosfotransferasový systém
P(HEMA- <i>co</i> -GMA)	poly(2-hydroxyethyl methakrylát- <i>co</i> -glycidyl methakrylát)
PMMA	poly(methyl methakrylát)
P-β-gal	fosfo- β-D-galaktosidasa
qPCR	kvantitativní polymerasová řetězová reakce v reálném čase
rRNA	ribosomová ribonukleová kyselina
SDS	dodecylsulfát sodný