

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ  
FAKULTA CHEMICKÁ  
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

PROBIOTICKÉ GENY POTRAVINÁŘSKY VÝZNAMNÝCH BAKTERIÍ  
MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

PROBIOTIC GENES OF SIGNIFICANT LACTIC ACID BACTERIA IN FOOD

Zkrácená verze PhD Thesis

BRNO 2018

Mgr. Jana Konečná

**Obor:** Potravinářská chemie

**Školitel:** doc. RNDr. Alena Španová, Csc.

**Školitel specialista:** doc. Ing. Bohuslav Rittich, Csc.

**Oponenti:**

**Datum obhajoby:**

## ABSTRAKT

Izolace deoxyribonukleové kyseliny (DNA) je velmi důležitým krokem v molekulární diagnostice mikroorganismů. Pro amplifikaci DNA polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) je nezbytná vysoká kvalita izolované DNA. Izolace DNA pomocí konvenční fenol–chloroformové extrakce a srážení DNA ethanolem je časově náročná a vyžaduje použití toxického fenolu. Magnetické separační techniky využívající magnetické pevné částice jsou jednou z moderních metod, které urychlují izolaci nukleových kyselin. Cílem této práce bylo ověřit použití dvou různých typů magnetických částic pro extrakci DNA na pevné fázi. Množství DNA v separační směsi bylo měřeno za použití ultrafialové spektrofotometrie (UV). Metoda byla testována nejprve na DNA z kuřecích erytrocytů. Pro adsorpci DNA na magnetické částice byl použit fosfátový pufr (pH 7, 7,6 a 8). Ukázalo se, že přibližně polovina DNA byla adsorbována na částice. Eluční podmínky DNA byly také optimalizovány. Poté byla testována bakteriální DNA a metoda použita k izolaci z reálných vzorků potravinových doplňků stravy. Tato DNA eluovaná z částic byla v kvalitě pro PCR.

Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM) je jednoduchá a levná metoda, používaná pro diskriminaci ampliconů po polymerázové řetězové reakci (PCR) v reálném čase. V této práci byla testována HRM-PCR pro rychlou identifikaci kmenů patřících do skupiny *Lactobacillus*. Byly použity tři různé metody izolace DNA: fenolová extrakce, separace pomocí magnetických částic a izolace pomocí komerčního kitu. K amplifikaci genu 16S rRNA bylo testováno 10 párů primerů pro cílové genové fragmenty (LAC1 - LAC2, LAC2 - LAC4, P1V1 - P2V1, Gro F - GroR, 3BA - 338f - Primer 1, V1F - V1R, CHAU - V3F - CHAU - V3R, CHAU - V6F - CHAU - V6R, poxcDNAFw - poxPromRVC, poxcDNAFw - poxPromRVT). Použitím párů primerů GroF/R a LAC2/4 byly úspěšně identifikovány druhy patřící do rodu *Lactobacillus*. Byly zjištěny rozdíly mezi použitými metodami extrakce z křivek tání HRM – PCR analýz.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

*Lactobacillus*, Magnetické částice, Extrakce na pevné fázi, Izolace deoxyribonukleové kyseliny, Polymerázová řetězová reakce, Vysokorozlišovací analýza křivek tání

## **KEY WORDS**

*Lactobacillus*, Magnetic particles, Solid-phase extraction, Deoxyribonucleic acid isolation, Polymerase chain reaction, High-Resolution Melting Analysis

## **MÍSTO ULOŽENÍ PRÁCE**

Areál knihovny FCH VUT v Brně, Purkyňova 118, Brno

# OBSAH

ABSTRAKT.....	2
PŘEHLED ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	4
1.1 Probiotické bakterie mléčného kvašení.....	4
2 GENOM A GENY PROBIOTICKÝCH BAKTERIÍ.....	4
2.1 Geny pro odolnost vůči žlučovým solím a kyselému prostředí .....	5
2.1.1 <i>Konjugovaná kyselina linoleová</i> .....	5
2.1.2 <i>Geny kódující enzymy dekarboxylázy</i> .....	6
2.1.3 <i>Oblasti genů pro identifikaci BMK</i> .....	6
3 MAGNETICKÉ NOSIČE .....	7
3.1 Struktura a velikost magnetických nosičů.....	7
3.1.1 <i>Jádro magnetických nosičů</i> .....	8
3.1.2 <i>Povrchová vrstva magnetických nosičů</i> .....	8
3.2 Vysokorozlišovací analýza křivek tání.....	8
3.2.1 <i>Použití HRM-PCR analýzy</i> .....	9
CÍLE PRÁCE.....	11
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	12
4 MATERIÁL.....	12
4.1 Bakteriální kultury .....	12
4.2 bakteriální DNA a DNA z kuřecích erytrocytů .....	12
4.3 Magnetické nosiče.....	12
4.4 Testované výrobky .....	12
5 METODY .....	13
5.1 Kultivace mikroorganismů.....	13
5.2 Příprava hrubých lyzátů buněk .....	13
5.3 Izolace DNA .....	14
5.3.1 <i>Izolace DNA fenolovou extrakcí a přesrážením etanolem</i> .....	14
5.3.2 <i>Izolace DNA komerčním kitem</i> .....	14
5.3.3 <i>Izolace DNA magnetickými částicemi v prostředí fosfátového pufru</i> .....	14
5.3.4 <i>Izolace DNA magnetickými částicemi v prostředí PEG a NaCl</i> .....	15
5.4 Stanovení koncentrace a čistoty DNA .....	16
5.5 Amplifikace DNA .....	16

5.6	Gelová elektroforéza a detekce produktů pcr .....	17
6	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	18
6.1	Testování podmínek adsorpce na magnetické částice .....	18
6.2	Testování eluce z magnetických částic .....	19
6.3	ZÁVĚR A DISKUZE.....	21
	Testování podmínek adsorpce na magnetické částice .....	21
	Testování eluce DNA z magnetických částic .....	21
6.4	PCR genů pro probiotické vlastnosti .....	22
6.5	Analýza HRM – PCR.....	25
	6.5.1 Identifikace druhů rodu <i>Lactobacillus</i> s využitím primeru pro hypervariabilní oblasti genu <i>16s RNA</i> .....	25
	6.5.2 HRM - PCR s využitím primerů <i>LAC1-LAC2 a LAC4</i> .....	26
	6.5.3 HRM - PCR pro <i>groEL</i> gen s využitím primeru <i>GRO F - GRO R</i> .....	29
6.6	Závěr a diskuze .....	30
	SEZNAM ZKRATEK .....	32
	PŘEHLED LITERATURY .....	33
	ŽIVOTOPIS AUTORA.....	37
	PUBLIKACE A VÝSTUPY V RÁMCI STUDIA .....	38

# PŘEHLED ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

## 1.1 PROBIOTICKÉ BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou heterogenní skupinou mikroorganismů, které mohou fermentovat různé živiny, v první řadě na kyselinu mléčnou. Jedná se především o nesporulující, grampozitivní anaerobní bakterie, které jsou tolerantní vůči kyselinám [1]. V tabulce č. 1 jsou uvedeny některé ze známých druhů probiotických bakterií [2]. Biochemicky BMK dělíme na homofermentativní a heterofermentativní. V prvním případě dochází ke vzniku kyseliny mléčné, zatímco v druhém případě dochází ke vzniku různých vedlejších produktů kvašení, kterými jsou kyselina octová, ethanol, oxid uhličitý a kyselina mravenčí [1]. První a největší skupina složená z bakterií mléčného kvašení obsahuje rody *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Bifidobacterium*. Druhá skupina bakterií zahrnuje rody *Bacillus* a kvasinky *Saccharomyces* [2].

## 2 GENOM A GENY PROBIOTICKÝCH BAKTERIÍ

První úplný genom skupiny BMK byl publikován roku 2001, jednalo se o *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 [3]. Genom byl o velikosti 2,4 Mb a odhalil řadu neočekávaných poznatků: biosyntetické dráhy pro všech 20 aminokyselin, i když ne všechny funkční, úplnou sadu genů pro pozdní kompetenci zodpovídající za příjem cizorodé DNA a jejich případnou rekombinaci, pět kompletních profágů a částečně složky pro aerobní metabolismus. Vzhledem k tomu, že některé z těchto systémů nejsou funkční nebo úplné, genomová analýza rodu *Lactococcus* naznačuje evoluční trend směrem k minimalizaci chromozomu a eliminaci zbytečných systémů během adaptace na nutričně složitě prostředí [4].

Program zaměřený na rozsáhlé sekvenování genomů nepatogenních BMK byl v roce 2002 započat konsorciem pro sekvenování BMK, ke skutečnému průlomu však došlo v letech 2005 a 2006. BMK mají poměrně malé genomy, charakteristická velikost genomu je okolo 2 Mb s přibližně 2000 geny, přičemž počet genů se pohybuje u různých druhů v rozmezí od 1600 do 3000. Tato variace v počtu genů naznačuje, že vývoj BMK zahrnuje aktivní procesy ztráty genu, duplikace a získání delších genů. Současná sbírka genomů BMK je jedinečná datová sada, která zahrnuje několik příbuzných genomů se stoupající mírou rozlišnosti v sekvencích a genomových organizacích [5].

## 2.1 GENY PRO ODOLNOST VŮČI ŽLUČOVÝM SOLÍM A KYSELÉMU PROSTŘEDÍ

Pro využití by probiotika měla být schopna přežít v extrémně kyselých podmínkách žaludku a detergenčních vlastností žlučových kyselin v tenkém střevě. Žlučové kyseliny jsou amfipatické molekuly, které jsou syntetizovány z cholesterolu a hrají důležitou roli při trávení tuků a absorpci vitamínů rozpustných v tucích. Koncentrace žlučových kyselin se pohybuje v rozmezí 0,2 až 2% v tenkém střevě člověka a kolísá na základě množství tuku ve stravě [6]. Žlučové kyseliny mají silnou antimikrobiální účinnost, způsobují poškození buněk narušením membrány a buněčné stěny. Bsh patří do choloylglycinové rodiny proteinů, které jsou klasifikovány jako N-terminální nukleofilní hydrolázy s N-terminálním cysteinovým zbytkem. Žlučové kyseliny jsou konjugáty n-acylamidu buď s glycinem nebo taurinem, syntetizovány z cholesterolu v játrech a vylučovány do tenkého střeva [7]. Mechanismy rezistence gramnegativních bakterií jsou poměrně dobře popsány [6]. Tyto mechanismy zahrnují ochranu vnější membrány a využití efluxních pump k vylučování žlučových solí, které vstupují do buňky. Mechanismy rezistence grampozitivních organismů, které jsou obecně méně odolné vůči žluči než gramnegativní bakterie, jsou méně známy [8].

Byla charakterizována řada probiotik s hydrolázou žlučových solí (*bsh*, bile salt hydrolase). *Bsh* je enzym, který katalyzuje hydrolýzu peptidové vazby solí žlučových kyselin. Tolerance k některým žlučovým solím je pravděpodobně způsobena přítomností *bsh* a transportních proteinů, které jsou navzájem funkčně propojené, aby reagovaly na stres ze žlučových solí [9]. *Bsh* usnadňuje kolonizaci střev prostřednictvím rezistence na konjugované žlučové soli.

### 2.1.1 Konjugovaná kyselina linoleová

Schopností střevních bakterií je produkce zdraví prospěšných bioaktivních mastných kyselin jako je konjugovaná kyselina linolová (CLA). CLA zahrnuje skupinu pozičních a geometrických izomerů kyseliny linolové s konjugovanými dvojnými vazbami. CLA je spojeno s množstvím lokálních a systémových zdravotních účinků *in vitro* a *in vivo* [10]. Tyto zdravotní účinky zahrnují působení antikarcinogenní, proti vzniku aterosklerózy, antidiabetické a proti obezitě. Specifické izomery CLA, jako jsou c9, t11-CLA, t10 a c12-CLA mají specifické fyziologické vlastnosti, kde hraje c9 a t11-CLA nejdůležitější úlohu v antikarcinogenních účincích, zatímco t10 a c12-CLA má převládající vliv na řízení hmotnosti a prevenci aterosklerózy [11].

CLA izomery se přirozeně vyskytují v mase přežvýkavců a různých mléčných potravin pocházejících z přežvýkavců jako vedlejší složky lipidové frakce. CLA se vytvářejí jako meziprodukty během biohydrogenace kyseliny linolové na kyselinu stearovou anaerobními bakteriemi v batoru. Kompletní biohydrogenace kyseliny linolové anaerobní bakterií batoru (jako je *Butyrivibrio fibrisolvens*) je vícestupňový proces [12].

## 2.1.2 Geny kódující enzymy dekarboxylázy

BMK mohou metabolizovat aminokyseliny na sloučeniny obsahující amin, označované jako biogenní aminy (BA). Konzumace potravin obsahujících velké množství těchto aminů, může mít toxické následky. Potraviny, které pravděpodobně obsahují vysoké limity BA, jsou ryby, rybí produkty, fermentované potraviny (maso, mléčné výrobky a zelenina) a nápoje (víno, cider a pivo). V poslední době byly u BMK identifikovány geny různých metabolických cest, které produkují BA. Tyto cesty se zdají být více závislé na kmeni než na druhu, což naznačuje, že horizontální přenos genů může vést k úspěšnému rozdělení BMK [13]. Tvorba BA vyžaduje expresi alespoň dvou genů, jeden kódující dekarboxylázu a druhý transportér podílející se na výměně aminokyselin za aminy. Tyto geny jsou vždy spojeny a v mnoha případech jsou organizovány do klastru se třetím genem zapojeným do regulace [14].

## 2.1.3 Oblasti genů pro identifikaci BMK

Klasické mikrobiologické metody ve většině případů dobře fungují, existují však některé blízké příbuzné druhy, například členy skupiny *Lactobacillus casei*, které je tradičními mikrobiologickými metodami velmi obtížné nebo nemožné identifikovat z důvodu jejich podobných fyziologických vlastností a nutričních požadavků [15]. Molekulární biologické techniky nabízejí nové možnosti pro analýzu struktury a složení druhů mikrobiálních společenstev. Zejména byla použita variace sekvence v rRNA pro odvození fylogenetických vztahů mezi mikroorganismy a pro navrhování specifických nukleotidových sond k detekci jednotlivých mikrobiálních taxonů v přírodních stanovištích. Taxonomie BMK na základě srovnávací sekvenční analýzy 16S ribosomální RNA (rRNA) ukázala, že některé taxony generované na základě fenotypových vlastností neodpovídají jejich fylogenetickým vztahům. Molekulární techniky, zejména metody založené na polymerázové řetězové reakci, jsou považovány za důležité pro specifickou charakterizaci a detekci kmenů BMK [16].

Odborné studie ukazují, že DNA sekvence mezi 16S a 23S geny laktobacilů jsou hypervariabilní. Tyto oblasti mezi geny mají délku přibližně 200 bází, pokud chybí tRNA geny. Distribuční sekvence 16S-23S laktobacilů jsou dostatečně specifické pro odvození primerů pro PCR, které mohou být použity k identifikaci druhů *Lactobacillus* [17].

Bakteriální 16S rRNA geny obsahují devět hypervariabilních oblastí (V1-V9), které vykazují značnou sekvenční rozmanitost mezi různými bakteriemi. Druhé specifické sekvence v dané hypervariabilní oblasti představují užitečné cíle pro diagnostické testy a další vědecká vyšetření. Žádná oblast nemůže rozlišit všechny bakterie, proto jsou potřeba systematické studie srovnávající relativní výhodu každé oblasti pro specifické diagnostické cíle [18].

Byla identifikována malá hypervariabilní oblast uvnitř genu *groEL* u rodu *Lactobacillus*. Gen kóduje 60-kDa skupinu I chaperonu GroEL, která vykazuje vysokou konzervovanost sekvenci napříč druhy [19].

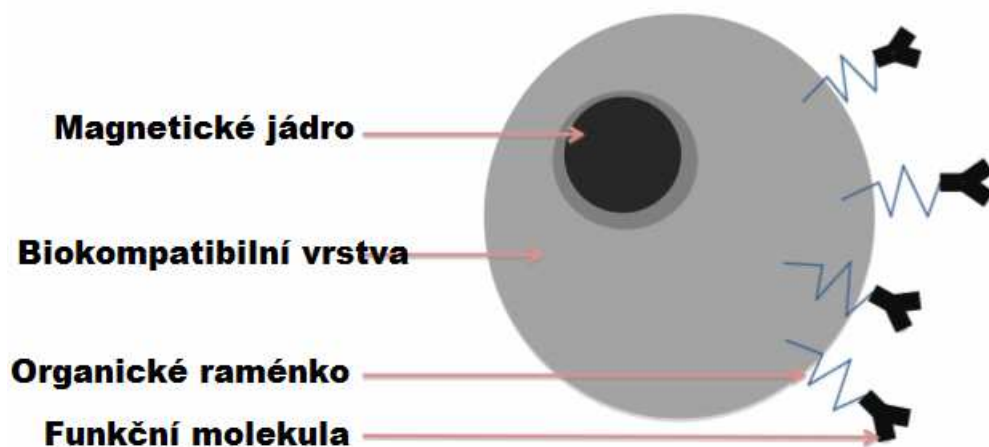
### 3 MAGNETICKÉ NOSIČE

V současné době představují magnetické částice poměrně jednoduchou a rychlou cestu separace bakteriálních buněk a jejich komponent z různých typů vzorků. Magnetické částice a magnetické nosiče enkapsulované s bioaktivními látkami jako jsou syntetické polymery a oxid křemičitý, byly použity v oblastech biotechnologií s vynikajícími výsledky [20]. Paramagnetické vlastnosti těchto částic umožňují snadnou izolaci produktů v roztoku pomocí magnetismu vnějšího magnetického pole. Suspendované magnetické částice označené jako analyty mohou být separovány z velkoobjemových vzorků pomocí magnetu. Izolace a purifikace pomocí magnetických nosičů je snadnější a rychlejší než u jiných metod [21].

#### 3.1 STRUKTURA A VELIKOST MAGNETICKÝCH NOSIČŮ

Magnetické polymerní nosiče se obvykle skládají z magnetického jádra a polymerního pláště (obr. 4), který chrání před agregací částic a nespecifickou vazbou na buňky [22].

Kompozice, velikost, morfologie a povrchová vrstva magnetických nosičů může být přizpůsobena různým aplikacím, které ovlivňují chování nosičů *in vivo* a zlepšují magnetické vlastnosti. Úspěšná aplikace magnetických nosičů v biomedicínské oblasti souvisí s magnetickými vlastnostmi (musí být řízeny vnějším magnetickým polem), jejich rozptylem a stupněm agregace. Díky enkapsulaci magnetických jader pomocí biokompatibilního polymeru během nebo po syntéze, se zvyšuje stabilita částic, zabraňuje se tvorbě agregátů [23].



Obrázek č. 4: Zjednodušené schéma struktury magnetických nosičů [24].

### 3.1.1 Jádru magnetických nosičů

Magnetické vlastnosti jádra silně závisí na chemickém složení, metodě syntézy a velikosti [25]. Magnetické jádro obsahuje malé magnetické nanočástice se středním průměrem typicky méně než 30 nm. Magnetické jádro je důležitou počáteční složkou při přípravě magnetických částic. Mohou být rozděleny do dvou skupin podle chování v magnetickém poli: slabé (paramagnetické a diamagnetické) a silné (feromagnetické). Superparamagnetické chování může být popsáno jako kombinace paramagnetického a feromagnetického. Takové částice nevykazují magnetické vlastnosti v nepřítomnosti vnějšího magnetického pole [26].

### 3.1.2 Povrchová vrstva magnetických nosičů

Povrchová modifikace magnetických částic je nutná ze třech důvodů:

- stabilizuje koloidní disperzi,
- zajišťuje biokompatibilitu a zabraňuje nežádoucím interakcím se složkami média,
- usnadňuje připojení funkčních skupin nezbytných pro aplikace založené na interakcích.

Koloidy modifikované různými chelatačními činidly s nízkou molekulovou hmotností mají podstatně vyšší stabilitu než konvenčně stabilizované magnetické nosiče. Činidla jsou navázána na povrch ionty Fe (III) a Fe (II) (nebo jinými kovovými ionty M (II) ve feritech) vystupujícími jako Lewisova kyselina, která je schopná přijmout další elektronový pár do svého volného vazebného orbitalu. První velká skupina obsahuje látky mající jednu nebo více karboxylových skupin, případně v kombinaci s OH, NH<sub>2</sub> nebo SH skupiny [27].

Povrchová vrstva částic se připravuje z několika materiálů, včetně anorganických i polymerních materiálů. Polymerní potahové materiály lze klasifikovat jako přírodní a syntetické. Polymery na bázi polyvinylpyrrolidonu (PVP), PLGA, PEG atd. jsou typickými příklady syntetických polymerních systémů. Systémy přírodních polymerů zahrnují použití želatiny, dextranu, chitosanu, pullulanu a dalších [28].

## 3.2 VYSOKOROZLIŠOVACÍ ANALÝZA KŘIVEK TÁNÍ

Vysokorozlišovací analýza křivek tání HRM (high resolution melting) produktů PCR, umožňuje identifikaci mikroorganismů, genotypizaci či předsekvenční skenování amplifikačních produktů, analýzu genových polymorfismů a mutací, metylační analýzu, kvantifikaci nebo může být použita jako alternativa ke gelové elektroforéze produktů PCR [29]. Specifické produkty HRM-PCR jsou generovány pro určování konformačních rozdílů pomocí uvolnění fluorescenčního barviva vázající se na dvouřetězcovou DNA. Pozornost je zaměřena na vývoj přesných a levných nástrojů pro HRM analýzu a nových fluorescenčních barviv [30].

Prvním krokem je amplifikace cílové oblasti před analýzou HRM. Pro sledování přechodu dvojřetězcové DNA na jednořetězcovou DNA se používají interkalační barviva [31]. Existují různé typy interkalačních barviv dsDNA mezi ně patří SYBR Green, LC Green PLUS, Eva Green, SYTO9 a ResoLight. SYBR Green je nejběžnějším používaným barvivem. Saturační barviva, jakými jsou SYTO9 nebo LC Green, neinhibují DNA polymerázu i v poměrně vysokých koncentracích, což zajistí úplnější interkalaci amplikonu.

HRM analýza začíná po samotné reakci PCR. Amplikon se postupně zahřívá z přibližně 50° C na zhruba 95° C, postupná denaturace vyplývající z postupného zahřívání vytváří charakteristický profil tání. Když se dsDNA disociuje na jednotlivá vlákna, uvolní se interkalační barvivo a fluoreskuje na nízké úrovni. Změna fluorescence se vykresluje proti teplotě a generuje křivku tání, která je charakteristická pro amplikon. Teplota tání ( $T_m$ ) amplikonu je stanovena ze získaného píku [32][33]. Vzhledem k tomu, že se denaturují různé sekvence, mohou být mezi sebou lehce rozlišitelné, viditelné a porovnatelné. Při správném nastavení je HRM dostatečně citlivá, aby bylo možné detekovat jednu změnu báze mezi jinak identickými nukleotidovými sekvencemi [33].

### **3.2.1 Použití HRM-PCR analýzy**

HRM-PCR je jednoduchá, rychlá, levná a výkonná metoda. Jedná se o nedestruktivní metodu s možností následného využití amplikonů. Práce ukázaly spolehlivou identifikaci čistých kmenů BMK pomocí klastrové analýzy teplotních profilů křivek tání na základě jejich podobnosti [34]. HRM analýza je používána jako rychlý přístup k identifikaci dominantních mezofilních a termofilních aerobních bakterií v různých mléčných výrobcích na základě srovnání analýz teplotních profilů se známými referenčními bakteriemi [35]. Pomocí analýzy HRM můžeme detekovat malé změny v DNA sekvencích, proto je tato metoda vhodná pro stanovení malých rozdílů mezi bakteriemi. HRM analýza je navíc vysoce reprodukovatelná [36].

Metoda HRM se používá převážně pro identifikaci na úrovni druhů, ale také jednotlivých kmenů. Iacumin a kol., 2015 se zaměřují na identifikaci kmenů patřících do skupiny *Lactobacillus casei* a jejich klasifikaci do *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* a *Lactobacillus rhamnosus*. Rychlé a přesné diagnostické testy jsou důležité pro kontrolu jakosti sýra a pro pochopení procesu zrání sýra. Díky analýze HRM bylo prokázáno a charakterizováno 94 izolátů ze sýrů typu Gouda. HRM profily variabilních oblastí V1 a V3 genů 16S rRNA izolátů byly porovnány s HRM profily 13 referenčních kmenů [34].

Metoda HRM analýzy se používá pro identifikaci a screening druhů *Listeria*. Studie Jin a jeho kolegů (2012) identifikovaly druhy *Listeria* se specificitou 100%, vztaženo k běžným metodám. Metoda byla aplikována na uměle kontaminované vzorky potravin (džus, mléko, sýry a maso)

připravené přímo jejich naředěním s druhy *Listeria*. Ve 28 vzorcích byly druhy *Listeria* správně identifikovány. Identifikace druhů se však nepodařila ve dvou vzorcích šťávy [37].

Jiné studie popisují využití HRM analýzy v analýze geneticky modifikovaných organismů a detekci alergenů v potravinách [38].

## CÍLE PRÁCE

Cílem předkládané dizertační práce s názvem „Probiotické geny potravinářsky významných bakterií mléčného kvašení“ bylo testování nosičů pro izolaci DNA v kvalitě pro PCR. Pozornost byla dále zaměřena identifikace kmenů v potravinářských výrobcích včetně analýzy HRM-PCR.

Hlavní cíle práce:

- Optimalizace podmínek metody adsorpce a následné eluce DNA pro magnetické nosiče a výběr vhodného postupu pro další využití v molekulárně diagnostických metodách.
- Využití magnetických nosičů pro izolaci DNA a průkaz bakterií mléčného kvašení a jiných mikroorganismů ve výrobcích, včetně průkazu probiotických genů.
- Testování a využití metody HRM-PCR pro identifikaci bakterií mléčného kvašení v komplexních vzorcích potravin.

# EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 4 MATERIÁL

### 4.1 BAKTERIÁLNÍ KULTURY

V práci byl použit bakteriální kmen *Lactobacillus gasseri* K7 ze Sbírký mikroorganismů, Chair of Dairy Science, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Slovinsko a bakteriální kmeny *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833<sup>T</sup>, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CCM 7190<sup>T</sup>, *Lactobacillus casei* 7088<sup>T</sup>, *Lactobacillus casei* 4798, *Lactobacillus parasacei* CCM 1753<sup>T</sup>, *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup>, *Lactobacillus rhamnosus* 1825<sup>T</sup> a *Streptococcus thermophilus* CCM 4757 získané z České sbírky mikroorganismů, Brno, ČR (Czech Collection of Microorganisms (CCM)).

### 4.2 BAKTERIÁLNÍ DNA A DNA Z KUŘECÍCH ERYTROCYTŮ

Pro optimalizaci metody izolace DNA pomocí magnetických nosičů byla použita DNA z kuřecích erytrocytů (Budapest, Hungary). Purifikovaná bakteriální DNA kmenů *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve* o různé koncentraci a vhodné čistotě byla získána od doc. A. Španové, CSc.

### 4.3 MAGNETICKÉ NOSIČE

Magnetické polymerní mikronosiče P(HEMA-co-GMA)-NH<sub>2</sub> byly připraveny Ing. H. Mackovou, Ph.D na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR v Praze. Magnetické částice F79/L3 poly-LYSINE byly připraveny Ing. M. Babičem, Ph.D. na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR v Praze. Magnetické mikronosiče Fkol 77ox byly připraveny Ing. D. Horákem, Ph.D na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR v Praze.

### 4.4 TESTOVÁNÉ VÝROBKY

Testované doplňky stravy (probiotické tablety) použité k izolaci DNA byly zakoupeny v komerční síti. Charakteristika testovaných výrobků je uvedena v Tabulce 1.

Tabulka 1: Charakteristika použitých výrobků

Název	Výrobce	Deklarované mikroorganismy	Deklarované cfu na 1 tobolku/tabletu výrobků	Pomocné látky	Forma
<b>Linex® Forte</b>	Sandoz s.r.o.	<i>L.acidophilus</i> (LA-5), <i>B.animalis subsp. lactis</i> (BB12)	2 x 10 <sup>9</sup>	dextrosa, inulin, mikrokrystalická celulóza (E 460), bramborový škrob,	Tobolka

				oligosacharidy, stearan hořčnatý (E 470b)	
<b>Pangamin Bifi plus</b>	Pangamin	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. lactis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	mléko, inulin, pupalkový olej,	Tableta
<b>Lactobacily Forte</b>	Walmark a.s.	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>B. infantis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>B. longum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>B. breve</i>	$10 \times 10^9$	maltodextrin, fruktooligosacharidy, želatina, látka protispěková: stearat hořčnatý, kyselina askorbová.	Tobolka
<b>Lactomax</b>	Blue Care	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. bifidus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. caucasicus</i> , <i>L. rhamnosus</i>	$10 \times 10^9$	niacin, vitamin B6, riboflavin, thiamin	Tobolka

## 5 METODY

### 5.1 KULTIVACE MIKROORGANISMŮ

Zmražené bakteriální kmeny rodu *Lactobacillus* byly sterilně otevřeny a naočkovány do 10 ml tekutého MRS media (de Mann, Rogosa, Sharpe) (Sigma-Aldrich, USA) sterilizovaného v autoklávu při 121°C po dobu 20 minut. Kultivace probíhala při 37°C po dobu 48 hodin ve zkumavkách. Narostlé kmeny byly přeočkovány (1 % inokulum) a kultivovány při 37°C po dobu 24 hodin ve zkumavkách.

## 5.2 PŘÍPRAVA HRUBÝCH LYZÁTŮ BUNĚK

Hrubé lyzáty buněk byly připraveny z 1 ml bakteriální kultury připravené kultivací na MRS mediu při teplotě 37°C/24 hodin nebo z potravinových doplňků stravy (probiotické tablety). 1 ml bakteriální kultury byl centrifugován při 14000 g/3 minuty. Sediment byl resuspendován v 1 ml roztoku A (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0). Suspenze byla promíchána a centrifugována při 14000 g/3 minuty. Po centrifugaci byl supernatant slit a k sedimentu bylo přidáno 500 µl roztoku B (lysozym 3 mg/ml; 10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA, pH 8,0). Hrubé lyzáty potravinových doplňků stravy byly připraveny z probiotických tobolek/tablet. 1 tobolka byla opatrně rozříznuta skalpelem a její obsah byl převeden do sterilní zkumavky. Byl přidán 1 ml roztoku B (lysozym 5 mg/ml, 10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA; pH 8,0) a důkladně promíchán.

Takto připravené vzorky bakteriálních kultur a doplňků stravy byly ponechány při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny, poté bylo přidáno 25 µl 10 % SDS a 5 µl proteinasy K (100 µg/ml). Vzorky byly inkubovány při teplotě 55 °C přes noc (18 hodin).

## 5.3 IZOLACE DNA

### 5.3.1 Izolace DNA fenolovou extrakcí a přesrážením etanolem

K hrubému lyzátu buněk (500 µl) byl přidán fenol (předestilovaný, pH 7,8) o stejném objemu, směs byla míchána po dobu 4 minut kývavým pohybem. Po centrifugaci (10 000 g/3 min) byla odebrána vodní fáze obsahující DNA. K této vodní fázi byla přidána směs chloroformcis-isoamylalkoholu (CIZ, 24:1) o objemu 700 µl. Směs byla míchána po dobu 4 minut kývavým pohybem a centrifugována (10 000 g/3min). Po centrifugaci byla odebrána vodní fáze do čisté mikrozkušavky. Ke vzorku DNA byla přidána 1/10 objemu 3 M octanu sodného po promíchání byl přidán 2,5 násobek objemu 96 % ethanolu. Směs byla důkladně promíchána a srážena při -20 °C po dobu 30 minut [39]. Po srážení etanolem byla směs centrifugována (14 000 g/15 min). Sediment byl vysušen a poté byla DNA rozpuštěna v 50 µl TE pufru (pH 7,8).

### 5.3.2 Izolace DNA komerčním kitem

Izolace DNA z narostlé bakteriální kultury a reálných vzorků (potravinové doplňky stravy) byla provedena pomocí komerčního izolačního kitu QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Německo) podle doporučení výrobcem.

### 5.3.3 Izolace DNA magnetickými částicemi v prostředí fosfátového pufru

Separční směs o výsledném objemu 100 µl byla připravená smícháním všech komponent

podle tabulky číslo 2. Po napipetování fosfátového pufru (0.067 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.067 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) o daném pH (7,7.6,8) byla změřená spektrofotometricky koncentrace nukleových kyselin. Doba inkubace separační směsi byla testována (10,30,45,60 minut). Po inkubaci byly magnetické nosiče s navázanou DNA odseparovány magnetem. Nosiče s navázanou DNA byly 2x promyty v 300  $\mu\text{l}$  70% etanolu a opatrně vysušeny. Magnetické částice s navázanou DNA byly resuspendovány v 50  $\mu\text{l}$  TE pufru (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 1 mM EDTA, pH 8,0). Následně byla změřena spektrofotometricky koncentrace eluované DNA.

Tabulka č.2: Komponenty separační směsi.

<b>Komponenta</b>	<b>Objem (<math>\mu\text{l}</math>)</b>
1M fosfátový pufr	20
Matrice DNA	30
Magnetické částice (2, 0.1mg/ml)	50
<b>Celkem</b>	100

#### 5.3.3.1 Testování podmínek adsorpce DNA na magnetické nosiče

Podmínky adsorpce (pH fosfátového pufru, doba inkubace) byly testovány. Množství adsorbované DNA bylo měřeno spektrofotometricky.

#### **Testování pH fosfátového pufru**

Separační směs se skládala z fosfátového pufru, DNA a magnetických částic. Bylo testováno pH fosfátového pufru vhodného pro adsorpci na magnetické částice. Byl testován fosfátový pufr o pH 7, 7.6, a 8. Následně byla měřená koncentrace DNA v supernatantu po odpipetování z magnetického separátoru.

#### **Testování doby inkubace**

Po smíchání všech komponent separační směsi byla testována doba inkubace. Doba inkubace byla 15, 30, 45 a 60 minut.

#### 5.3.3.2 Testování podmínek eluce DNA z magnetických nosičů

Podmínky eluce (pH elučního pufru, teplota, doba eluce, přídavek NaCl (1M, 2M), přídavek KCl (10mM)) byly testovány. Kvalita a množství izolované DNA byla ověřena pomocí agarosové gelové elektroforézy (0,8% agarosový gel), spektrofotometricky a pomocí PCR.

#### **Testování elučního pufru**

Eluce probíhala do TE pufru o pH 9, poté bylo testováno zvýšení pH na hodnotu 10. Podmínky eluce byly následně upraveny přidáním NaCl (1M, 2M) do TE pufru (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 1 mM EDTA, pH 8,0). Také byla testována eluce po přidavku KCl (10mM) do elučního

pufry v rozpětí pH od 5 do 12.

### **Testování teploty a doby eluce DNA z magnetických nosičů**

Eluce DNA z magnetických nosičů (2 mg/ml) byla provedena při různých teplotách (laboratorní teplota, 55,70 a 90°C) a v různých časech (10, 30, 60 minut a 18 hodin). Eluce probíhala do 50 µl TE pufry (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 1 mM EDTA, pH 8,0). Poté byla měřená koncentrace DNA spektrofotometricky po odseparování magnetických nosičů.

### **5.3.4 Izolace DNA magnetickými částicemi v prostředí PEG a NaCl**

Izolace pomocí magnetických částic byla provedena z hrubého lyzátu buněk v prostředí 16% polyetylglykolu 6000 (PEG) a 2M NaCl. Do sterilních mikrozkušavek byla připravena separační směs, přičemž bylo nutné dodržet pořadí jednotlivých komponent. Komponenty separační směsi jsou zaznamenány v Tabulce 3.

Tabulka č. 3: Složení separační směsi pro izolaci DNA magnetickými částicemi

<b>Komponenta</b>	<b>Objem (µl)</b>
sterilní voda	50
5M NaCl	400
hrubý lyzát buněk	100
40% PEG 6000	400
Magnetické částice (2, 0.1 mg/ml)	50
<b>Celkem</b>	1000

Připravená směs byla inkubována 10 minut při laboratorní teplotě. Po dobu 10 minut byly částice s navázanou DNA separovány pomocí magnetického separátoru. Zkušavky byly ponechány v magnetickém pásu a supernatant byl opatrně odpipetován. Následně byl ze separátoru odstraněn magnetický pás. Zkušavka obsahující nosič s navázanou DNA byla 2x promyta 70% etanolem v objemu 1 ml. Částice byly separovány magnetem 2 minuty při laboratorní teplotě a roztok etanolu byl opatrně slit. Zkušavky byly ponechány v horizontální poloze a krátce usušeny při laboratorní teplotě. Magnetické částice s navázanou DNA byly resuspendovány v 50 µl TE pufry (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 1 mM EDTA, pH 8,0).

#### *5.3.4.1 Testování podmínek eluce DNA z magnetických nosičů*

Byly testovány různé typy elučnic pufry. Magnetické částice s navázanou DNA byly resuspendovány v 50 µl TE pufry pH 7,8 (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 1 mM EDTA, pH 8,0), v TE pufry (10mM KCl) o pH 9 a ve fosfátovém pufry o pH 8. Eluce probíhala po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Eluce do TE pufry s přidavkem KCl (10mM) probíhala při teplotě 90°C 600 rpm 15 minut. Kvalita a množství izolované DNA byla ověřena spektrofotometricky a pomocí

PCR.

## **5.4 STANOVENÍ KONCENTRACE A ČISTOTY DNA**

Koncentrace a čistota izolované DNA byla stanovena měřením na Nanodropu ND-2000/2000c (Thermo Scientific, USA). Byly měřeny hodnoty absorbancí při vlnových délkách 230 nm (absorpční maximum fenolu), 260 nm (absorpční maximum nukleových kyselin), 280 nm (absorpční maximum proteinů) a 320 nm (korekce pozadí). Čistota DNA byla stanovena poměrem absorbancí 260 nm/280 nm [40].

## **5.5 AMPLIFIKACE DNA**

Amplifikace DNA pomocí polymerázové řetězové reakce proběhla po smíchání komerčně dostupných komponent PCR o celkovém objemu 25  $\mu$ l. Pro konvenční PCR byl využit cycler MJ Research Programme Cycler PTC-100 (Watertown, USA). Pro PCR v reálném čase byl použit thermo cycler Rotogene 6000 (Corbett Research, Australie) a pro analýzu HRM-PCR byly použity cyclery Eco™ Real-Time PCR System (Illumina, USA) a LightCycler® Nano (Roche Life Science, USA). Použité primery byly syntetizovány firmou Generi Biotech (Hradec Králové, ČR) a Elisabeth Pharmacon (Brno, ČR). V případě potřeby byl amplifikační produkt uchováván při teplotě -20 °C. Vyhodnocení výsledků PCR - HRM analýzy bylo provedeno pomocí softwaru LightCycler® Nano Software 1.1.

## **5.6 GELOVÁ ELEKTROFORÉZA A DETEKCE PRODUKTŮ PCR**

Ověření kvality izolované DNA a detekce amplifikovaného PCR produktu byla provedena pomocí agarosové gelové elektroforézy. Velikost detekovaného produktu PCR byla ověřena za využití DNA standardu (100 bp) (Malamité, Moravské Prusy, ČR). Odpovídající navážka agarosy (0,8% agarosový gel pro detekci DNA, 1,8% agarosový gel pro detekci PCR produktů) byla rozpuštěna ve 100 ml 0,5 x koncentrovaného TBE pufru a suspenze byla důkladně rozvařena v mikrovlnné troubě za opakovaného promíchávání. Roztok byl ochlazen na teplotu zhruba 60 °C a poté byl nalit do čisté vaničky (s hřebínkem) položené na rovné ploše. Po zatuhnutí (30 minut) byl na gel nanášen vzorek DNA smíchaný se Stop puftrem (6 x koncentrovaný) v poměru 5:1. Vzorky byly nanášeny do komůrek vzniklých po vyjmutí hřebínku. Gel byl opatrně převrstven 0,5 x koncentrovaným TBE puftrem. Elektroforéza probíhala při napětí o velikosti 60 V po dobu 90 minut. Gel byl barven v roztoku ethidiumbromidu (0,5  $\mu$ g/ml) po dobu 30 minut. Obarvený gel byl opláchnut v destilované vodě a prohlížen na transiluminátoru v UV světle (305 nm).

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledky jsou tematicky rozděleny a diskutovány v rámci jednotlivých kapitol. Jednotlivé dílčí závěry byly publikovány na konferencích formou posterů nebo přednášek.

### 6.1 TESTOVÁNÍ PODMÍNEK ADSORPCE NA MAGNETICKÉ ČÁSTICE

Testování podmínek adsorpce probíhalo na modelové DNA z kuřecích erytrocytů. Testování bylo zaměřené na použití rozdílných hodnot pH fosfátového pufru a doby adsorpce, tedy navázání DNA na magnetické částice. Naměřené hodnoty koncentrací DNA jsou zaznamenány v tabulce 9.

#### Testování pH fosfátového pufru a doby inkubace

Byla připravená separační směs podle tabulky 2 v kapitole metody 5.3.3. Jako matrice byla použita DNA z kuřecích erytrocytů. Byly testovány polymerní mikročástice P(HEMA-co-GMA)-NH<sub>2</sub> (2 mg/ml) a nanočástice F79/L3-PLL (2 mg/ml). Inkubace probíhala po dobu 15, 30, 45 a 60 minut. Byl použit fosfátový pufr o různých hodnotách pH (7, 7.6 a 8). Uvedené koncentrace DNA byly měřeny spektrofotometricky a jsou uvedeny v ng/μl.

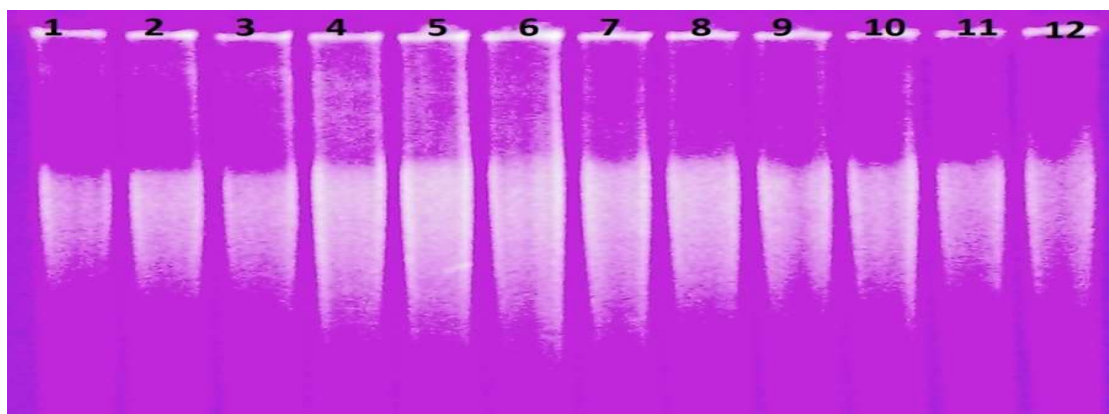
Tabulka 4: Testování adsorpce DNA (ng/μl) z kuřecích erytrocytů na magnetické částice

Částice (2mg/ml)	Doba inkubace (min)	pH 7		pH 7,6		pH 8	
		A	B	A	B	A	B
F79/L3-PLL	15	95,7 ± 0,3	44,0 ± 0,2	104,3 ± 0,1	44,2 ± 0,2	105,5 ± 0,3	44,2 ± 0,2
	30	101,7 ± 0,3	45,3 ± 0,3	95,2 ± 0,3	42,6 ± 0,2	103,5 ± 0,2	43,0 ± 0,1
	45	98,6 ± 0,3	44,7 ± 0,2	101,1 ± 0,1	43,5 ± 0,3	106,6 ± 0,1	46,8 ± 0,3
	60	100,4 ± 0,3	45,5 ± 0,3	98,6 ± 0,1	47,9 ± 0,1	104,5 ± 0,2	45,2 ± 0,4
P(HEMA-co-GMA)-NH <sub>2</sub>	15	95,0 ± 0,2	46,8 ± 0,1	97,7 ± 0,1	46,9 ± 0,2	100,5 ± 0,2	44,3 ± 0,3
	30	106,4 ± 0,1	47,3 ± 0,1	102,7 ± 0,2	45,4 ± 0,2	98,6 ± 0,1	42,4 ± 0,5
	45	97,6 ± 0,6	46,7 ± 0,2	99,5 ± 0,4	44,0 ± 0,2	99,5 ± 0,3	44,1 ± 0,3
	60	96,3 ± 0,1	43,2 ± 0,2	100,5 ± 0,3	42,6 ± 0,2	102,6 ± 0,1	43,5 ± 0,3

A: Koncentrace DNA kuřecích erytrocytů v čase nula bez magnetických částic B: Koncentrace DNA v supernatantu po adsorpci

Bylo testováno množství DNA navázané na magnetické částice pomocí sledování koncentrace DNA v supernatantů po inkubační době. Pozornost byla zaměřená na pH použitého fosfátového pufru k navázání na magnetické částice. Optimalizace byla prováděna za účelem zjištění vhodných podmínek pro izolaci genomové DNA z čistých bakteriálních kultur převážně bakterií mléčného kvašení a ve vybraných probiotických potravinových doplňcích stravy běžně dostupné v komerční síti. Množství DNA ve výchozí separační směsi (bez magnetických částic) se podle spektrofotometrického měření pohybovalo v rozmezí ± 95 – 106 ng/μl. Medián množství DNA ve výchozí separační směsi z uvedených výsledku je 100,5 ng/μl. Měření množství DNA

v supernatantech po oddělení magnetických částic s nasorbovanou DNA z kuřecích erytrocytů ukazuje, že v supernatantech zůstává značné množství nenavázané DNA. Střední množství této nenavázané DNA je 44,3 ng/μl což odpovídá 44%. Použitím různých hodnot pH (7, 7.6 a 8) použitého fosfátového pufru v separační směsi se nepodařilo zvýšit adsorpci na testované magnetické částice. Doba navázání DNA na magnetické nosiče byla testována ve zvolených intervalech 15, 30, 45 a 60 minut a ukázalo se, že tato doba neovlivňuje množství DNA navázané na magnetické částice, proto pro další použití byl vybrán nejkratší testovaný čas (15 min.). Neadsorbovaná DNA z kuřecích erytrocytů byla vizualizovaná pomocí gelové agarósové (0,8%) elektroforézy (obr. 2). Na gel bylo nanášeno 30 μl vzorků.



Obrázek č. 2: Gelová agarósová elektroforéza – koncentrace DNA v supernatantech po odseparování magnetických nosičů s navázanou DNA.

Běh číslo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Koncentrace (ng/μl)	44,0	43,3	44,2	42,6	44,2	43,0	46,8	47,3	46,9	45,4	44,3	42,4

Gelovou elektroforézou supernatantů bylo potvrzeno, že v separační směsi po oddělení magnetických částic s navázanou DNA zůstává značné množství DNA. Tento jev se nepodařilo ovlivnit ani zvýšením pH fosfátového pufru použitého k adsorpci na magnetické částice. Pro další analýzy byl vybrán fosfátový pufr o pH 7,6 a doba inkubace 15 minut.

## 6.2 TESTOVÁNÍ ELUCE Z MAGNETICKÝCH ČÁSTIC

Testování podmínek eluce probíhalo na modelové DNA z kuřecích erytrocytů. Testování bylo zaměřené na použití rozdílných hodnot pH (9, 10) elučního TE pufru a doby potřebné pro eluci (vyvázání DNA z magnetických částic). Dále byla pozornost zaměřená na teplotu vhodnou pro eluci. Naměřené hodnoty koncentraci DNA po eluci jsou zaznamenány v tabulce 5.

### Testování pH TE pufru, teploty a doby eluce

Byla připravená separační směs podle tabulky 2 v kapitole metody 5.3.3., po předešlém testování byl vybrán fosfátový pufr o pH 7,6. Jako matrice byla použita DNA z kuřecích erytrocytů. Byly testovány polymerní mikročástice P(HEMA-co-GMA)-NH<sub>2</sub> (2 mg/ml) a

nanočástice F79/L3-PLL (2 mg/ml). Testován byl TE pufr o pH 9 a 10. Eluce probíhala za laboratorní teploty (22°C), a zvýšených teplot 55, 70 a 90 °C. Dále byl pozorován vliv doby na eluci (15, 30 a 60 minut a po dobu 18 hodin). Uvedené koncentrace DNA byly měřeny spektrofotometricky.

Tabulka 5: Testování eluce DNA (ng/μl) kuřecích erytrocytů z magnetických částic

Částice (2mg/ml)	Doba eluce (min)	pH 9				pH 10			
		22°C	55°C	70°C	90°C	22°C	55°C	70°C	90°C
F79/L3-PLL	15	3,4±0,05	14,4±0,09	20,5±0,04	21,3±0,04	2,5±0,04	10,4±0,10	18,9±0,08	19,2±0,0
	30	3,6±0,05	15,2±0,08	21,2±0,10	21,3±0,04	2,9±0,05	11,0±0,05	18,9±0,04	19,2±0,0
	60	3,6±0,08	15,6±0,04	23,4±0,04	24,0±0,08	3,1±0,05	10,9±0,05	19,6±0,08	20,7±0,0
	18h	4,3±0,08	19,4±0,04	23,2±0,04	25,6±0,09	3,4±0,09	12,4±0,10	19,8±0,08	21,5±0,0
P(HEMA-co-GMA)-NH <sub>2</sub>	15	1,4±0,04	6,3±0,08	9,4±0,04	11,0±0,10	1,2±0,04	3,5±0,08	8,8±0,08	8,9±0,04
	30	1,3±0,08	8,8±0,04	11,0±0,08	14,2±0,08	1,3±0,00	4,2±0,09	8,7±0,00	9,0±0,08
	60	1,5±0,04	7,7±0,08	12,1±0,04	15,2±0,25	1,3±0,05	3,8±0,10	9,1±0,08	8,9±0,15
	18h	1,5±0,08	9,1±0,10	12,3±0,04	19,9±0,08	1,5±0,05	5,3±0,08	9,2±0,04	9,5±0,04

Bylo testováno množství DNA eluované z magnetických částic. Koncentrace byla měřena spektrofotometricky, jako blank byl použit TE pufr. Pozornost byla zaměřená na pH (9,10) TE pufru a doby nutné k eluci DNA z magnetických částic. Pozornost byla dále zaměřená na teplotu během eluce. Eluce probíhala za laboratorní teploty (22 °C) a zvýšených teplot 55 °C, 70 °C a 90 °C. Optimalizace byla prováděna na modelové DNA z kuřecích erytrocytů, získané výsledky slouží pro aplikaci izolace DNA z probiotických bakterií mléčného kvašení a k použití takto izolované DNA pro další molekulárně biologické metody, jakými jsou PCR a její modifikace. Byly testovány dva druhy magnetických částic mikročástice P(HEMA-co-GMA)-NH<sub>2</sub> (2 mg/ml) a nanočástice F79/L3-PLL (2 mg/ml). V obou případech došlo k eluci dostatečného množství DNA pro následné molekulárně diagnostické metody. Podle hodnot koncentrace DNA se jeví lepšími pro izolaci DNA nanočástice F79/L3-PLL, pomocí těchto částic byla eluovaná DNA ve vyšších koncentracích. Rozdíly v jednotlivých měřeních byly závislé na zvolené době eluce, a to sice ve většině případů takto: čím delší doba eluce, tím vyšší hodnoty koncentrací DNA. Mezi hodnotami koncentrace DNA po 60 minutové eluci a 18 hodinové eluci nebyly zjištěny velké rozdíly, byla tedy vybrána jako nejvhodnější doba eluce 60 minut. Podobně docházelo k zvyšování hodnot koncentrací DNA při použití zvýšených teplot.

Nevýhodou eluce za zvýšených teplot však byla hodnota kvality a čistoty takto eluované DNA (tabulka 11, 12), během zvýšených teplot docházelo k rozpouštění dalších látek, a proto byla čistota eluované DNA snížena. Porovnáním hodnot koncentrací pro výběr pH TE pufru můžeme vyhodnotit pH 9 jako lepší v porovnání s hodnotou pH 10. Pro aplikaci na kmeny bakterií

mléčného kvašení byl vybrán jako nejvhodnější TE pufr o hodnotě pH 9, teplota eluce 22 °C a doba eluce 60 minut.

### 6.3 ZÁVĚR A DISKUZE

#### Testování podmínek adsorpce na magnetické částice

Byly testovány podmínky adsorpce na magnetické částice dvojího typu: mikročástice P(HEMA-co-GMA)-NH<sub>2</sub> (2 mg/ml) a nanočástice F79/L3-PLL (2 mg/ml). Testované podmínky zahrnovaly dobu, po které se DNA naváže na magnetické částice a hodnotu pH fosfátového pufru použitého v separační směsi. Testování adsorpce probíhalo na modelové DNA z kuřecích erytrocytů. Byla sledována koncentrace DNA v separační směsi před adsorpcí na magnetické částice s navázanou DNA. Střední množství této nenavázané DNA je 44,3 ng/μl, což odpovídá 44%. Tedy zhruba polovina z původního množství použité DNA zůstává v supernatantech, což dokazuje i provedená agarosová gelová elektroforéza těchto supernatantů (obr. 2). Použití různých hodnot pH (7, 7.6 a 8) fosfátového pufru v separační směsi neovlivnilo množství DNA, která se navázala na magnetické částice. Pro další využití byl vybrán fosfátový pufr pH 7,6. Doba navázání DNA na magnetické nosiče byla testována ve zvolených intervalech 15, 30, 45 a 60 minut a ukázalo se, že tato doba neovlivňuje množství DNA navázané na magnetické částice, proto pro další použití byl vybrán nejkratší testovaný čas (15 min.).

#### Testování eluce DNA z magnetických částic

Po testování podmínek pro adsorpci DNA na magnetické částice byly testovány podmínky eluce. Testování bylo zaměřené na použití rozdílných hodnot pH (9, 10) elučního TE pufru a doby potřebné pro eluci, tedy vyvázání DNA z magnetických částic. Dále byla pozornost zaměřená na teplotu vhodnou pro eluci.

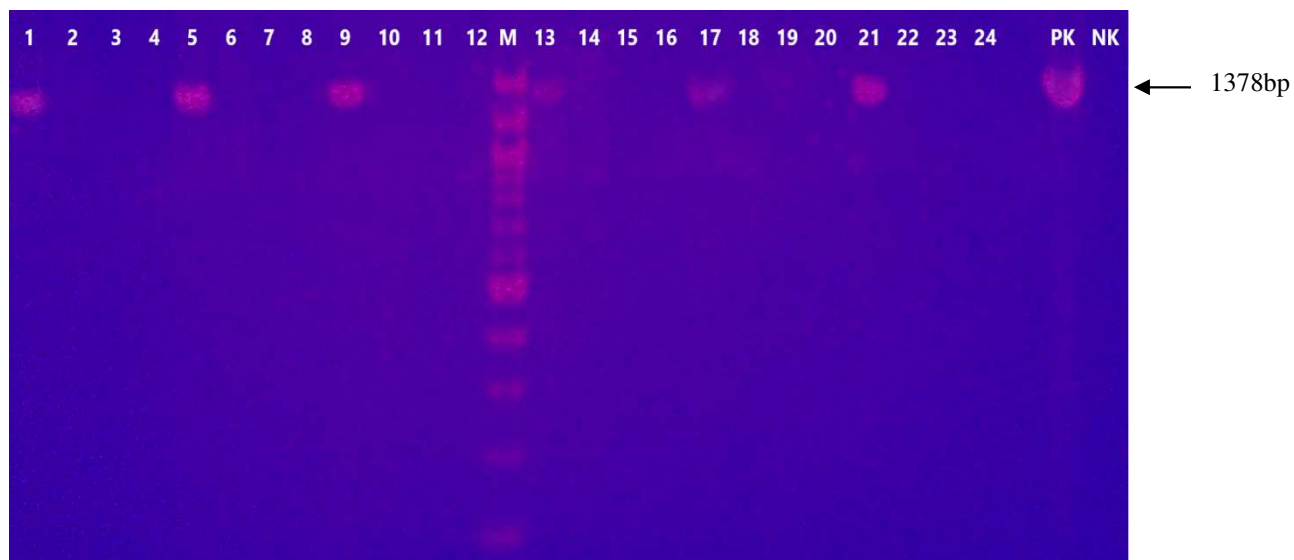
Byly stanoveny podmínky eluce z magnetických částic na 60 minut při 22 °C a použití TE pufru o pH 9. Z uvedených výsledků však můžeme vidět, že vyšších hodnot koncentrací bylo dosaženo použitím zvýšených teplot. Při těchto teplotách však docházelo k rozpouštění dalších látek a čistota DNA byla tímto snížena. Další nevýhodou konkrétně u teploty 90 °C byla částečná denaturace DNA, bylo tedy nutné ponechat vzorky renaturovat alespoň 12 hodin, což negativně ovlivňuje celkovou časovou náročnost metody, která cílí na jednoduchost a rychlost. Z tohoto důvodu byl také zvolen čas eluce 60 minut. Během eluce 18hodinové se výsledky zásadně nelišily.

### 6.4 PCR GENŮ PRO PROBIOTICKÉ VLASTNOSTI

Po identifikaci jednotlivých druhů probiotických bakterií byla provedena PCR k analýze genů kódujících probiotické vlastnosti jednotlivých bakterií.

*Gen lai druhu L. acidophilus*

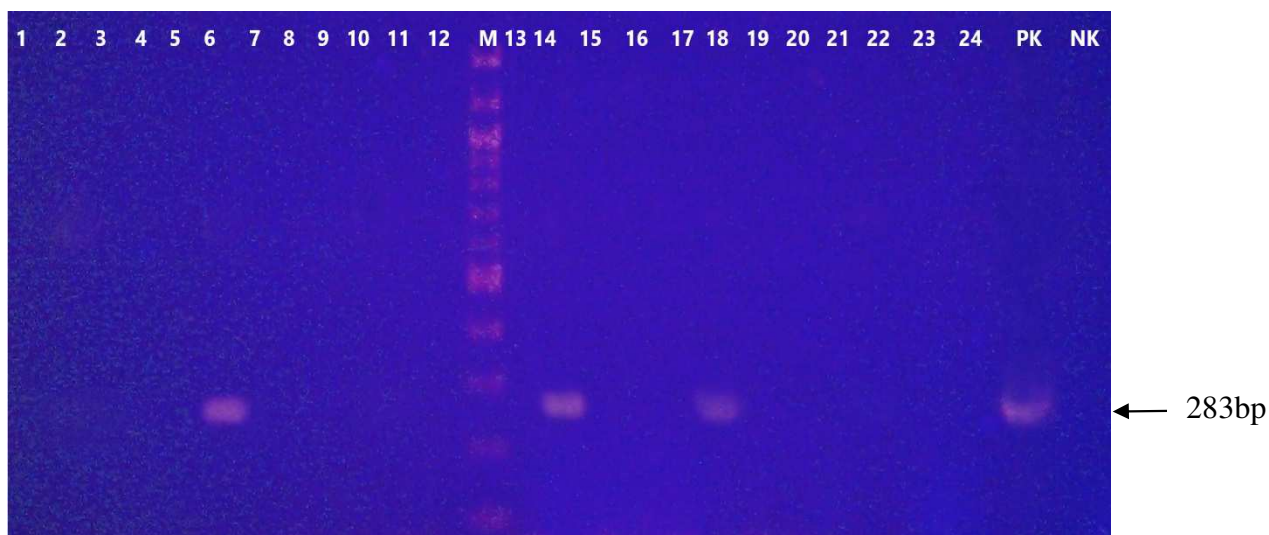
Specifický produkt PCR pro gen *lai* druhu *L. acidophilus* byl detekován u výrobku Linex forte. Ostatní výrobky podle výrobce obsahují také druh *L. acidophilus*, výsledky pro druhovou identifikaci potvrdily přítomnost *L. acidophilus*. Touto analýzou se nepodařilo potvrdit obsah tohoto druhu a jeho specifický gen *lai*. Byly použity primery LaLIF4 a LaLIR4, specifické produkty PCR byly o velikosti 1378 bp [41]. Výsledky jsou zaznamenány na obr. 3.



Obrázek 3: Gelová elektroforéza produktu PCR (1378 bp) specifického pro gen *lai* druhu *L. acidophilus*. (Linex forte - PEG/NaCl – běhy č.1,5,9, Fosfátový pufr – běhy č. 13, 17, 21; Pangamin – PEG/NaCl – běhy č.3,7,11, Fosfátový pufr – běhy č. 15, 19, 23; Lactobacily forte - PEG/NaCl – běhy č.2,6,10, Fosfátový pufr – běhy č. 15, 18, 22; Lactomax – PEG/NaCl – běhy č. 4,8,12, Fosfátový pufr – běhy č. 16, 20, 24; Standard (marker) - M; pozitivní kontrola – PK ;negativní kontrola – NK)

### Gen *bsh* druhu *L. casei*

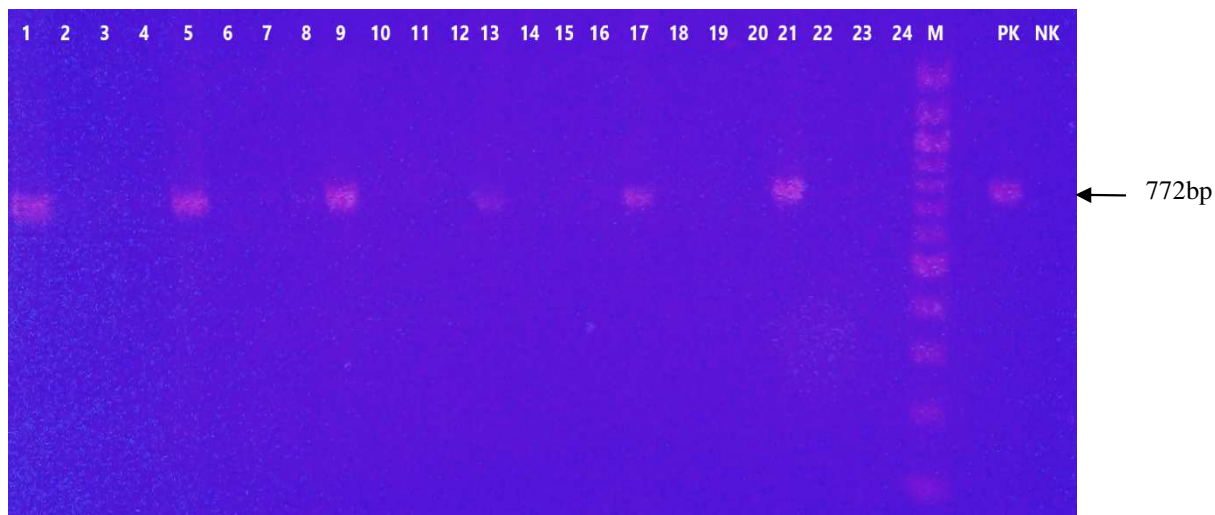
Primery LcBSHF1 a LcBSHR1 *bsh* genu druhu *L.casei* byly použity pro vyhledávání *bsh* genu u testovaných výrobků. Specifický produkt byl o velikosti 283 bp [41]. Touto analýzou byl prokázán gen *bsh* u výrobku Lactobacily forte. Tento výsledek potvrzuje také druhově specifická PCR, kde u výrobku Lactobacily forte došlo k nejintenzivnější detekci ampliconů (obr. 4).



Obrázek 4: Gelová elektroforéza produktu PCR (283 bp) specifického pro gen *bsh* druhu *L. casei*. (Linex forte - PEG/NaCl – běhy č.1,5,9, Fosfátový pufr – běhy č. 13, 17, 21; Pangamin – PEG/NaCl – běhy č.3,7,11, Fosfátový pufr – běhy č. 15, 19, 23; Lactobacily forte - PEG/NaCl – běhy č.2,6,10, Fosfátový pufr – běhy č. 15, 18, 22; Lactomax – PEG/NaCl – běhy č. 4,8,12, Fosfátový pufr – běhy č. 16, 20, 24; Standard (marker) - M; pozitivní kontrola – PK ;negativní kontrola – NK)

### Gen *bsh* druhu *B. animalis*

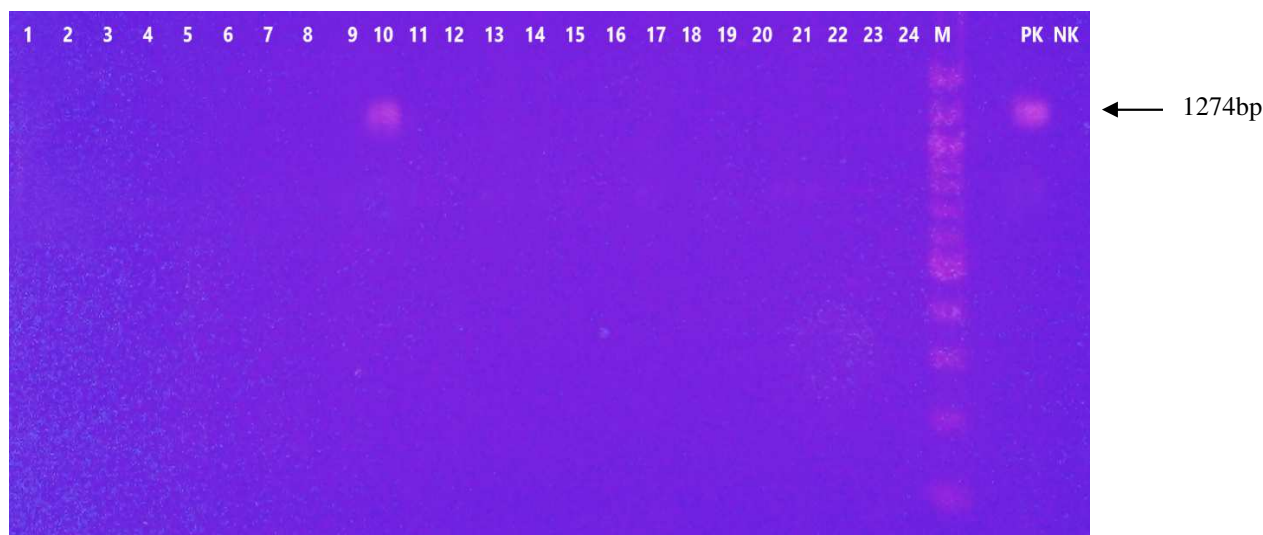
Pro průkaz genu *bsh* druhu *B. animalis* byly použity primery BaBSHFW a BaBSHRW o velikosti produktů PCR 772 bp [41]. Tento gen byl prokázán jen u výrobku Linex forte. Výsledky analýzy PCR vizualizovaném na agarósovém gelu jsou záznameny na obr. 5.



Obrázek 5: Gelová elektroforéza produktu PCR (772 bp) specifického pro gen *bsh* druhu *B. animalis*. (Linex forte - PEG/NaCl – běhy č.1,5,9, Fosfátový pufr – běhy č. 13, 17, 21; Pangamin – PEG/NaCl – běhy č.3,7,11, Fosfátový pufr – běhy č. 15, 19, 23; Lactobacily forte - PEG/NaCl – běhy č.2,6,10, Fosfátový pufr – běhy č. 15, 18, 22; Lactomax – PEG/NaCl – běhy č. 4,8,12, Fosfátový pufr – běhy č. 16, 20, 24; Standard (marker) - M; pozitivní kontrola – PK ;negativní kontrola – NK)

### Gen *odc* druhu *L. rhamnosus*

Průkaz přítomnosti druhu *L. rhamnosus* s obsahem genu *odc*, byly použity specifické primery LrODCFW a LrODCRW o velikosti 1274 bp [41]. K průkazu tohoto genu došlo jen u jednoho vzorku konkrétně u výrobku Lactobacily forte (obr. 6). Pro tento vzorek byla k adsorpci na magnetické částice použita směs s obsahem PEG a NaCl a při eluci fosfátový pufr.



Obrázek 6: Gelová elektroforéza produktu PCR (1274 bp) specifického pro gen *odc* druhu *L. rhamnosus*. (Linex forte - PEG/NaCl – běhy č.1,5,9, Fosfátový pufr – běhy č. 13, 17, 21; Pangamin – PEG/NaCl – běhy č.3,7,11, Fosfátový pufr – běhy č. 15, 19, 23; Lactobacily forte - PEG/NaCl – běhy č.2,6,10, Fosfátový pufr – běhy č. 15, 18, 22; Lactomax – PEG/NaCl – běhy č. 4,8,12, Fosfátový pufr – běhy č. 16, 20, 24; Standard (marker) - M; pozitivní kontrola – PK ;negativní kontrola – NK)

### Celkový souhrn analýzy PCR genů pro probiotické vlastnosti

Analýzou PCR byly sledovány geny pro probiotické vlastnosti bakterií mléčného kvašení v potravinových doplňcích stravy (Linex forte, Pangamin, Lactobacily forte a Lactomax). Výsledky jsou zaznamenány v souhrnné tabulce č. 16. Výsledky se plně shodují v případě genu *bsh* pro druh *L. casei*. Podle druhové identifikace byl *L. casei* nalezen jen ve výrobku Lactobacily forte, tento výrobek tedy obsahuje *L. casei* i s genem pro odolnost vůči žlučovým solím a kyselému prostředí. U bifidobakterií byl tento gen nalezen ve výrobku Linex forte, tento výrobek tedy obsahuje deklarované BMK s geny pro probiotické vlastnosti. Gen pro ornitin dekarboxylázu (*odc*) druhu *L. rhamnosus* byl nalezen jen u výrobku Lactobacily forte, přítomnost *L. rhamnosus* byla identifikována i u výrobku Lactomax.

## 6.5 ANALÝZA HRM – PCR

Za účelem rozlišení bakteriálních druhů rodu *Lactobacillus* byla použita metoda HRM – PCR s využitím různých druhů primerů (tab. 5). Pozornost byla zaměřená na referenční vzorky a dva

druhy potravinových doplňků stravy Linex forte a Lactobacilly forte. Jako referenční vzorky byly použity kmeny *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833<sup>T</sup>, *Lactobacillus casei* CCM 7088<sup>T</sup>, *Lactobacillus casei* CCM 4798, *Lactobacillus parasacei* CCM 1753<sup>T</sup>, *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup> a *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup>. DNA referenčních kmenů i potravinových doplňků byla izolována různými metodami (fenolová extrakce, komerční kit, magnetické částice - F79/L3-PLL a Fkol 77ox). Koncentrace a kvalita izolované DNA jsou zaznamenány v tabulce 6.

Tabulka 6: Koncentrace (c) a čistota (A<sub>260/280</sub>) DNA (ng/μl) izolované z potravinových doplňků stravy a referenčních vzorků.

	F79/L3-PLL		Fkol 77ox		Komerční kit		Fenolová extrakce	
	c (ng/μl)	A <sub>260/280</sub>	c (ng/μl)	A <sub>260/280</sub>	c (ng/μl)	A <sub>260/280</sub>	c (ng/μl)	A <sub>260/280</sub>
<i>L. casei</i> 7088 <sup>T</sup>	6,7	1,56	3,7	1,86	26,7	1,9	471,3	2,07
<i>L. plantarum</i> 7039 <sup>T</sup>	9	1,85	2,7	1,7	47,9	1,94	534,9	2,08
<i>L. rhamnosus</i> 1825 <sup>T</sup>	18,5	1,56	5,9	1,54	23,2	1,92	773	2,06
<i>L. casei</i> 4798	8,4	1,74	4,1	1,75	28,5	1,96	686,5	2,04
<i>L. parasacei</i> 1753 <sup>T</sup>	5,6	1,6	3,8	1,88	31,1	1,96	788,9	2,11
<i>L. acidophilus</i> 4833 <sup>T</sup>	10,3	1,84	6,3	1,66	45	1,99	290,8	2,07
Linex	2,5	1,36	2,9	1,99	17,5	1,98	4498,5	2,06
Lactobacilly	10,1	1,61	9,3	1,76	42,3	1,97	3931,2	2,09

Před samotnou analýzou HRM – PCR byly vzorky DNA o koncentraci vyšší než 20 ng/μl vyředěny na výslednou koncentraci 10 ng/μl. Pro analýzu byl použit komerčně dostupný master mix SYTO9 smíchaný s PCR vodou, příslušnými primery a DNA maticí.

### 6.5.1 Identifikace druhů rodu *Lactobacillus* s využitím primeru pro hypervariabilní oblasti genu 16s RNA

Pro identifikaci bakterií mléčného kvašení rodu *Lactobacillus* byly testovány primery pro hypervariabilní oblasti genu 16s RNA. Pro stanovení HRM analýzy k identifikaci bakteriálních druhů by produkty PCR měly mít největší rozdíly mezi jednotlivými druhy a měly by být konzervativní pro kmeny uvnitř stejného druhu. 16s RNA gen je nejvhodnější pro toto využití. Některé příbuzné druhy vykazovaly 98% nebo více homologií v sekvencích genu 16s RNA [35].

### 6.5.2 HRM - PCR s využitím primerů LAC1-LAC2 a LAC4

Za použití metody HRM – PCR a při kombinaci primerů LAC1 – LAC2 [34] a primerů LAC2 – LAC4 [42] navržených pro rozlišení bakterií mléčného kvašení zaměřených na studium hypervariabilní oblasti genu 16s RNA V3 byly zjištěny teploty tání charakteristické pro jednotlivé vzorky a jsou zaznamenány v tabulkách 7 a 8. Křivky tání jednotlivých vzorků pro různé metody

použité pro izolaci DNA jsou uvedeny na obrázku 7 A, B, C, D, E, F, G, H.

Tabulka 7: Teploty tání charakteristické pro jednotlivé vzorky pro HRM -PCR s využitím primerů LAC1 – LAC2.

	F79/L3-PLL	Fkol 77ox	Komerční kit	Fenolová extrakce
	T <sub>m</sub> (°C)			
<i>L. casei</i> 7088 <sup>T</sup>	75,23	75,23	84,85	75,23
<i>L. plantarum</i> 7039 <sup>T</sup>	75,23	75,23	84,53	76,50
<i>L. rhamnosus</i> 1825 <sup>T</sup>	75,23	75,23	84,85	75,58
<i>L. casei</i> 4798	75,23	75,23	84,85	77,14
<i>L. paracasei</i> 1753 <sup>T</sup>	75,23	75,23	84,85	76,72
<i>L. acidophilus</i> 4833 <sup>T</sup>	75,40	75,23	84,85	78,55
Linex	75,23	75,23	75,83	75,23
Lactobacily	75,23	75,23	75,23	76,61

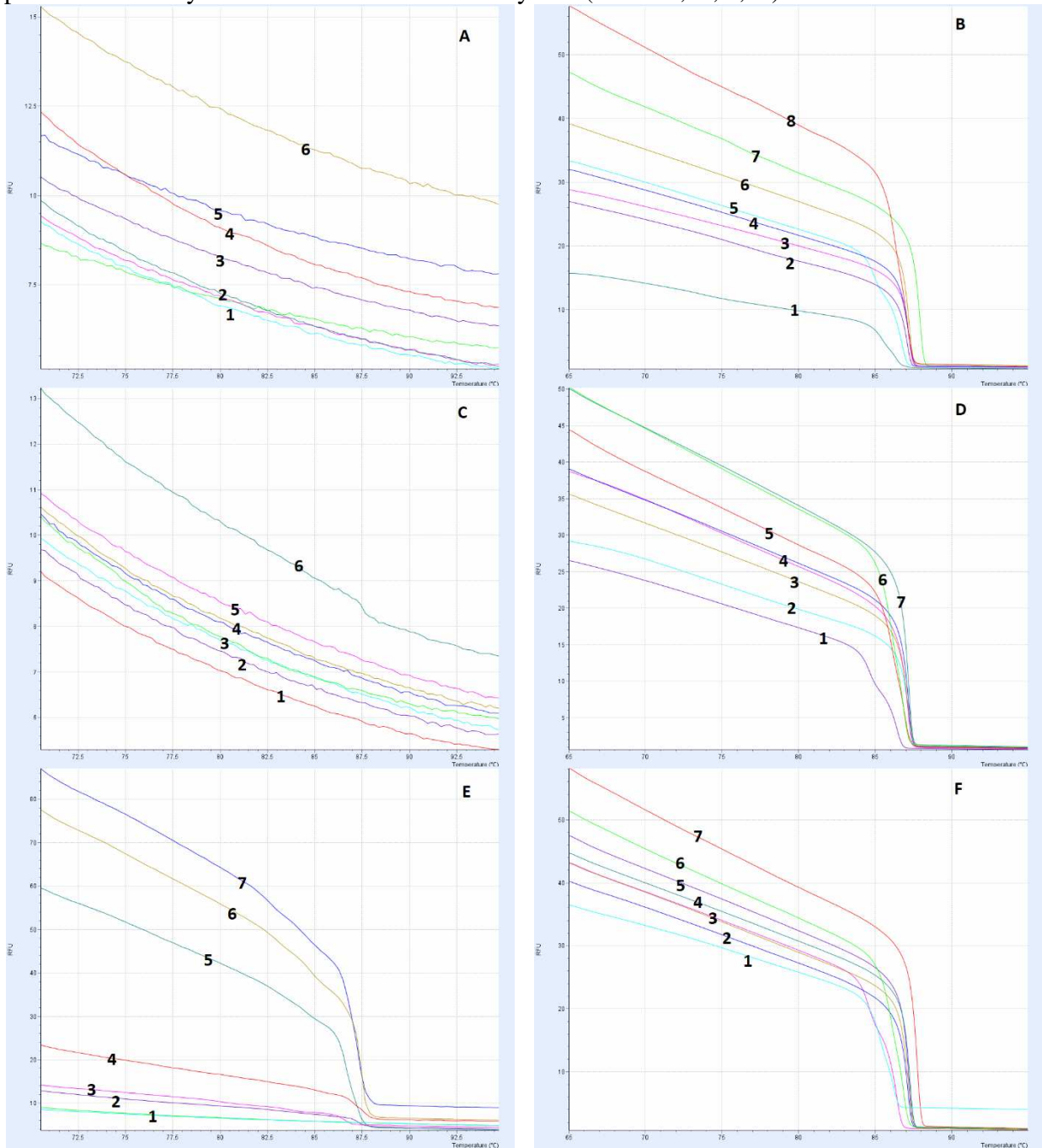
Naměřené teploty tání jsou v případě použití kombinace primerů LAC1 – LAC2 nevypovídajícím údajem. Pouze v případech kmenů *L. paracasei* 1753<sup>T</sup>, *L. casei* 4798, *L. rhamnosus* 1825<sup>T</sup> a *L. acidophilus* 4833<sup>T</sup> došlo k vytvoření charakteristické křivky tání, a to jen v případě kdy byl použit komerční kit k izolaci DNA. Ostatní teploty tání jsou shodné s negativní kontrolou a nevytvořily křivku tání.

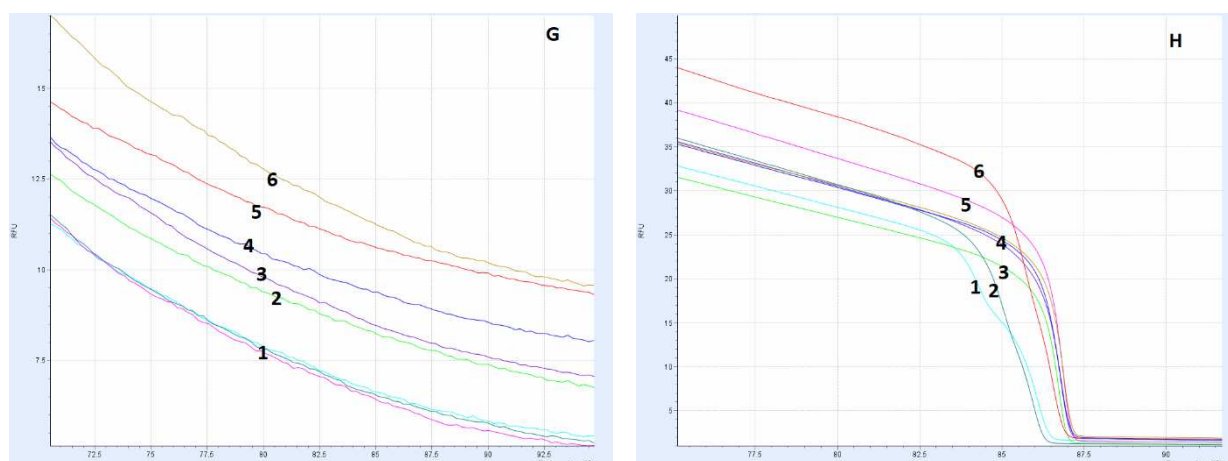
Tabulka 8: Teploty tání charakteristické pro jednotlivé vzorky pro HRM -PCR s využitím primerů LAC2 – LAC4.

	F79/L3-PLL	Fkol 77ox	Komerční kit	Fenolová extrakce
	T <sub>m</sub> (°C)			
<i>L. casei</i> 7088 <sup>T</sup>	87,72	86,98	87,02	86,54
<i>L. plantarum</i> 7039 <sup>T</sup>	86,33	85,95	86,05	85,68
<i>L. rhamnosus</i> 1825 <sup>T</sup>	86,85	86,89	86,92	86,58
<i>L. casei</i> 4798	87,01	86,98	86,98	86,67
<i>L. paracasei</i> 1753 <sup>T</sup>	86,98	86,94	87,09	86,58
<i>L. acidophilus</i> 4833 <sup>T</sup>	87,03	87,00	87,57	86,69
Linex	85,73	86,37	86,34	86,36
Lactobacily	86,59	86,30	85,61	86,04

Z uvedených hodnot pro teploty tání jednotlivých vzorků se nejméně shodují teploty pro *L. casei* 7088<sup>T</sup>, u tohoto vzorku se teploty tání liší v závislosti na použité metodě izolace DNA. Mezi

teplotami tání pro izolace pomocí magnetických částic F79/L3 PLL a fenolovou extrakci je největší rozdíl, a to víc než 1 °C. Ostatní hodnoty teplot tání se od sebe výrazně neliší, ve všech případech došlo k vytvoření charakteristické křivky tání (obr. 7 B, D, F, H).





Obrázek 7: Křivky tání jednotlivých vzorků pro PCR-HRM s využitím primerů LAC1 – LAC2 a primerů LAC2 – LAC4. (A, B – izolace DNA pomocí magnetických částic F79/L3-PLL, C, D – izolace DNA pomocí magnetických částic Fkol 77ox, E, F – izolace DNA pomocí komerčního kitu, G, H – izolace DNA pomocí fenolové extrakce)

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	<i>L. plantarum</i>	<i>L. casei</i> 7088 <i>L. casei</i> 4798 Linex	<i>L. rhamnosus</i>	Lactobacily	<i>L. paracasei</i>	<i>L. acidophilus</i>	-	-
B	Linex	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. casei</i> 4798	<i>L. paracasei</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i> 7088	Lactobacily
C	Linex	<i>L. plantarum</i>	<i>L. casei</i> 7088 Lactobacily	<i>L. casei</i> 4798 <i>L. paracasei</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. acidophilus</i>	-	-
D	<i>L. plantarum</i>	<i>L. casei</i> 7088	<i>L. paracasei</i>	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. casei</i> 4798	Linex	Lactobacily	<i>L. acidophilus</i>	-
E	Lactobacily Linex	<i>L. casei</i> 7088	<i>L. plantarum</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. casei</i> 4798	<i>L. rhamnosus</i>	-
F	Lactobacily	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. plantarum</i> <i>L. casei</i> 4798	<i>L. paracasei</i>	<i>L. casei</i> 7088	Linex	<i>L. acidophilus</i>	-
G	Linex <i>L. casei</i> 4798 <i>L. plantarum</i>	<i>L. casei</i> 7088	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. paracasei</i>	Lactobacily	<i>L. acidophilus</i>	-	-
H	<i>L. plantarum</i>	Linex	<i>L. casei</i> 7088	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. paracasei</i> <i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i> 4798	Lactobacily	-	-

V případě použití primerů LAC1 – LAC2 došlo k vytvoření charakteristických křivek tání jen u vzorků *L. paracasei* 1753<sup>T</sup>, *L. casei* 4798 a *L. rhamnosus* 1825<sup>T</sup>, a to jen v případě použití komerčního kitu k izolaci DNA. V ostatních případech nedošlo k vytvoření charakteristických křivek tání a vzorky jsou shodné s negativní kontrolou. Z těchto výsledků vyplývá, že tento typ primeru je nevhodný pro analýzu vzorku bakterií mléčného kvašení. Z uvedených křivek tání na obrázku 7 B, D, F, H je patrné, že se podařilo oddělit všechny studované vzorky. K nejřetelnějšímu rozdělení došlo v případě použití magnetických částic F79/L3 PLL. V porovnání těchto dvou studovaných párů primerů je účinnější využití primerů LAC2 – LAC4.

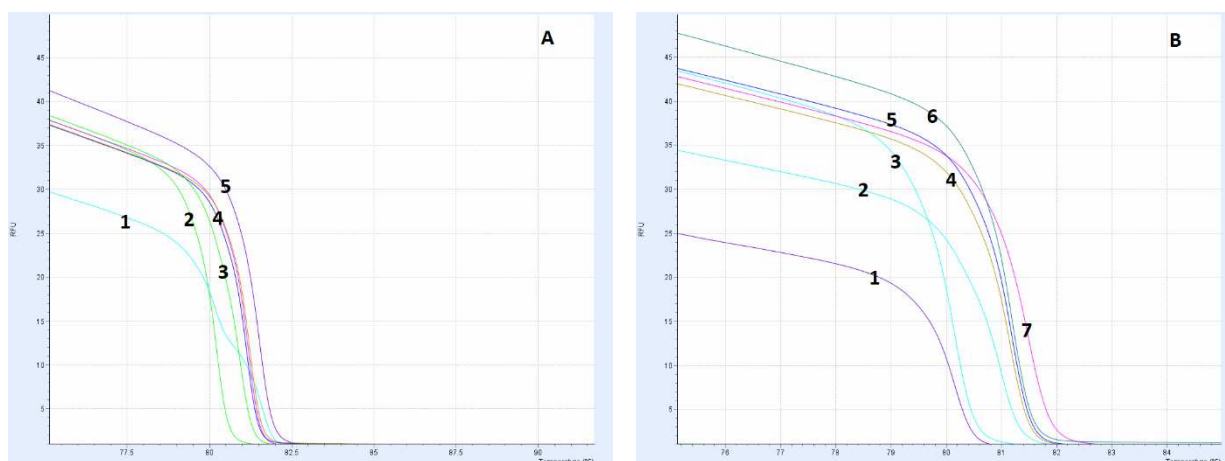
### 6.5.3 HRM - PCR pro *groEL* gen s využitím primeru GRO F - GRO R

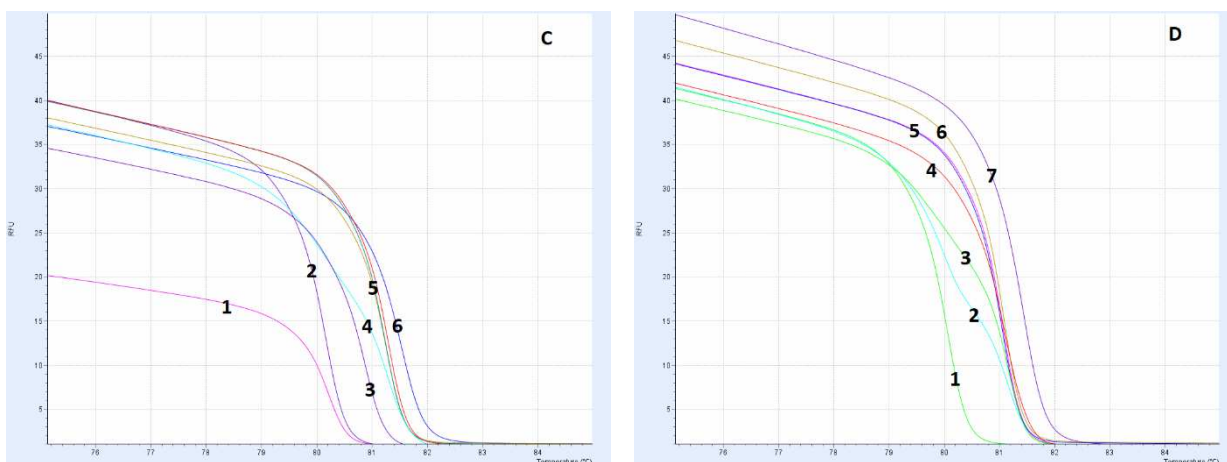
Za použití této metody a primerů GRO F - GRO R [19] navržených pro rozlišení bakteriálních druhů rodu *Lactobacillus*, hlavně velmi blízké příbuzných druhů *Lactobacillus* jako jsou *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* a *Lactobacillus rhamnosus*, byly zjištěné teploty tání charakteristické pro jednotlivé vzorky a jsou zaznamenány v tabulce 9. Křivky tání jednotlivých vzorků pro různé metody použité pro izolaci DNA jsou uvedeny na obrázku 8 A, B, C a D.

Tabulka 9: Teploty tání charakteristické pro jednotlivé vzorky pro HRM -PCR s využitím primerů GRO F – GRO R.

	F79/L3-PLL	Fkol 77ox	Komerční kit	Fenolová extrakce
	T <sub>m</sub> (°C)			
<i>L. casei</i> 7088 <sup>T</sup>	80,02	79,96	80,00	79,90
<i>L. plantarum</i> 7039 <sup>T</sup>	80,79	79,97	80,05	80,46
<i>L. rhamnosus</i> 1825 <sup>T</sup>	81,34	81,31	81,35	81,28
<i>L. casei</i> 4798	81,01	81,01	81,08	80,91
<i>L. paracasei</i> 1753 <sup>T</sup>	80,94	80,96	81,07	80,88
<i>L. acidophilus</i> 4833 <sup>T</sup>	81,06	81,02	81,13	80,93
Linex	75,01	75,00	80,92	80,94
Lactobacily	80,67	80,73	80,66	80,87

Z uvedených hodnot pro teploty tání jednotlivých vzorků se nejméně shodují teploty pro probiotický výrobek Linex forte, u tohoto vzorku se teploty tání liší v závislosti na použité metodě izolace DNA. Mezi teplotami tání pro izolace pomocí magnetických částic a fenolové extrakce byl naměřen největší rozdíl, a to téměř 6 °C. Ostatní hodnoty teplot tání se od sebe výrazně neliší, ve všech případech došlo k vytvoření charakteristické křivky tání (obr. 8 A, B, C, D).





Obrázek 8: Křivky tání jednotlivých vzorků pro PCR-HRM s využitím primerů GRO F- GRO R. (A – izolace DNA pomocí magnetických částic F79/L3-PLL, B – izolace DNA pomocí magnetických částic Fkol 77ox, C – izolace DNA pomocí komerčního kitu, D – izolace DNA pomocí fenolové extrakce)

	1	2	3	4	5	6	7
A	<i>L. plantarum</i>	<i>L.casei</i> 7088	Lactobacily	<i>L.casei</i> 4798 <i>L. paracasei</i> <i>L.acidophilus</i>	<i>L.rhamnosus</i>	-	-
B	<i>L. plantarum</i>	Lactobacily	<i>L.casei</i> 7088	<i>L. paracasei</i>	<i>L.casei</i> 4798	<i>L.acidophilus</i>	<i>L.rhamnosus</i>
C	<i>L. plantarum</i>	<i>L.casei</i> 7088	Lactobacily	Linex	<i>L.casei</i> 4798 <i>L. paracasei</i> <i>L.acidophilus</i>	<i>L.rhamnosus</i>	-
D	<i>L.casei</i> 7088	<i>L. plantarum</i>	Lactobacily	Linex	<i>L.casei</i> 4798 <i>L. paracasei</i>	<i>L.acidophilus</i>	<i>L.rhamnosus</i>

Produkt amplifikace PCR primerů GRO F/ GRO R, jehož velikost je přibližně 150 bp dlouhý fragment bakteriální 16S RNA, umožnil surovou diskriminaci bakterií křivek tání a porovnání jednotlivých metod izolace DNA mezi sebou díky sekvenční variabilitě fragmentů. Jak je znázorněno na obr. 8, tvar křivek tání umožnil identifikaci jen některých druhů bakterií mlečného kvašení. Jen v případě použití magnetických částic Fkol 77ox došlo k rozdělení všech studovaných vzorků. V ostatních případech se nepodařilo rozdělit kmeny *L.casei* 4798, *L.paracasei* 1753<sup>T</sup> a *L. acidophilus* 4833<sup>T</sup>.

## 6.6 ZÁVĚR A DISKUZE

Za účelem rozlišení bakteriálních druhů rodu *Lactobacillus* byla použita metoda HRM – PCR s využitím primerů pro různé oblasti hypervarabilních regionu genu 16S RNA. Pozornost byla zaměřena na referenční vzorky druhů rodu *Lactobacillus* a dva druhy potravinových doplňků stravy Linex forte a Lactobacilly forte. Jako referenční vzorky byly použity kmeny *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833<sup>T</sup>, *Lactobacillus casei* CCM 7088<sup>T</sup>, *Lactobacillus casei* CCM 4798, *Lactobacillus paracasei* CCM 1753<sup>T</sup>, *Lactobacillus plantarum* CCM 7039<sup>T</sup> a *Lactobacillus*

*rhamnosus* CCM 1825<sup>T</sup>. DNA referenčních kmenů i potravinových doplňků byla izolována různými metodami (fenolová extrakce, komerční kit, magnetické částice - F79/L3-PLL, Fkol 77ox). Bylo měřeno 10 párů primerů, tato měření jsou rozčleněny do 7 podkapitol. Nejlepších výsledků bylo dosaženo použitím primerů LAC2 – LAC4 [42] a GRO F – GRO R [19]. Bylo zjištěno, že metoda izolace DNA může ovlivnit výsledné křivky tání pro jednotlivé vzorky. Nelze však vybrat metodu pro izolaci DNA, která by byla nejvhodnější pro následnou analýzu HRM – PCR. Metoda HRM – PCR se hodí jako doplňková metoda pro jiné metody určené k identifikaci bakterií mléčného kvašení. Pomocí této metody se nepodařilo identifikovat přesný obsah druhů bakterií mléčného kvašení v potravinových doplňcích stravy Linex forte a Lactobacily.

## SEZNAM ZKRATEK

BMK	Bakterie mléčného kvašení
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
RNA	Ribonukleová kyselina
dNTPs	Deoxynukleosidtrifosfáty
PCR	Polymerázová řetězová reakce
HRM	Vysokorozlišovací analýza křivek tání
GIT	Gastrointestinální trakt
GRAS	(Generally Recognized As Safe) všeobecně považovány za bezpečné
FDA	Úřad pro kontrolu léčiv
BSH	Hydroláza žlučových solí
MRI	Magnetická rezonance
P(HEMA – co- GMA)	Poly(hydroxyethylmethakrylát-co-glycidylmethakrylát)
PLL	poly (Lysin)
PEG	Polyethalenglykol
PCL	Polykaprolakton
PLGA	Kopolymer kyseliny mléčné a glykolové
PVP	Polyvinylpyrrolidon
BPO	Dibenzoylperoxid
PDI	Index polydisperzity
T <sub>m</sub>	Teplota tání
EMBL	Evropská laboratoř molekulární biologie
EBI	Evropský institut bioinformatiky
NCBI	Národní centrum pro biotechnologické informační databáze
DDBJ	Databáze DNA Japonska
MRS	de Mann, Rogosa a Sharpe medium
SDS	(sodium dodecyl sulphate) dodecylsulfát sodný

## PŘEHLED LITERATURY

- [1] K. L. B. Nole, E. Yim, and J. E. Keri, “Probiotics and prebiotics in dermatology,” *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 71, no. 4, pp. 814–821, 2014.
- [2] M. K. Tripathi and S. K. Giri, “Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage,” *J. Funct. Foods*, vol. 9, no. 1, pp. 225–241, 2014.
- [3] A. Bolotin *et al.*, “The Complete Genome Sequence of the Lactic Acid Bacterium,” *Genome Res.*, pp. 731–753, 2001.
- [4] T. Klaenhammer and S. Dairy, “Discovering lactic acid bacteria by genomics,” *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 82, no. March, pp. 29–58, 2002.
- [5] K. S. Makarova and E. V. Koonin, “Evolutionary genomics of lactic acid bacteria,” *J. Bacteriol.*, vol. 189, no. 4, pp. 1199–1208, 2007.
- [6] J. S. Gunn, “Mechanisms of bacterial resistance and response to bile,” *Microbes Infect.*, vol. 2, no. 8, pp. 907–913, 2000.
- [7] S. Jayashree, S. Pooja, M. Pushpanathan, J. Rajendhran, and P. Gunasekaran, “Identification and characterization of bile salt hydrolase genes from the genome of *Lactobacillus fermentum* MTCC 8711,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 174, no. 2, pp. 855–866, 2014.
- [8] K. Whitehead, J. Versalovic, S. Roos, and R. A. Britton, “Genomic and genetic characterization of the bile stress response of probiotic *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, no. 6, pp. 1812–1819, 2008.
- [9] G. B. Kim and B. H. Lee, “Genetic analysis of a bile salt hydrolase in *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* KL612,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 105, no. 3, pp. 778–790, 2008.
- [10] B. Yang *et al.*, “Synthesis of conjugated linoleic acid by the linoleate isomerase complex in food-derived lactobacilli,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 117, no. 2, pp. 430–439, 2014.
- [11] B. Yang *et al.*, “Characterization of the triple-component linoleic acid isomerase in *Lactobacillus plantarum* ZS2058 by genetic manipulation,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 123, no. 5, pp. 1263–1273, 2017.
- [12] E. F. O’Shea, P. D. Cotter, C. Stanton, R. P. Ross, and C. Hill, “Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: Bacteriocins and conjugated linoleic acid,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 152, no. 3, pp. 189–205, 2012.
- [13] G. Spano *et al.*, “Biogenic amines in fermented foods,” *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 64, pp. S95–S100, 2010.
- [14] D. M. Linares, M. C. Martín, V. Ladero, M. A. Alvarez, and M. Fernández, “Biogenic

- amines in dairy products,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 51, no. 7, pp. 691–703, 2011.
- [15] O. P. Szén, A. Kiss, Z. Naár, and K. Pál, “Evaluation of high-resolution melting and other molecular methods in discrimination of *Lactobacillus* isolates,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 117, no. 4, pp. 1113–1121, 2014.
- [16] G. Muyzer, E. De Waal, and A. Uitterlinden, “Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 59, no. 3, pp. 695–700, 1993.
- [17] G. W. Tannock, A. Tilsala-Timisjarvi, S. Rodtong, J. Ng, K. Munro, and T. Alatossava, “Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage and youghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 65, no. 9, pp. 4264–4267, 1999.
- [18] S. Chakravorty, D. Helb, M. Burday, N. Connell, and D. Alland, “A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 69, no. 2, pp. 330–339, 2007.
- [19] R. Koirala, V. Taverniti, S. Balzaretto, G. Ricci, M. G. Fortina, and S. Guglielmetti, “Melting curve analysis of a groEL PCR fragment for the rapid genotyping of strains belonging to the *Lactobacillus casei* group of species,” *Microbiol. Res.*, vol. 173, pp. 50–58, 2015.
- [20] Y. Okamoto, F. Kitagawa, and K. Otsuka, “Online concentration and affinity separation of biomolecules using multifunctional particles in capillary electrophoresis under magnetic field,” *Anal. Chem.*, vol. 79, no. 8, pp. 3041–3047, 2007.
- [21] K. Aguilar-Arteaga, J. A. Rodriguez, and E. Barrado, “Magnetic solids in analytical chemistry: A review,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 674, no. 2, pp. 157–165, 2010.
- [22] D. Horák and N. Benedyk, “Magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres prepared by dispersion polymerization in the presence of electrostatically stabilized ferrofluids,” *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 42, no. 22, pp. 5827–5837, 2004.
- [23] M. K. Lima-Tenório, E. A. Gomez Pineda, N. M. Ahmad, H. Fessi, and A. Elaissari, “Magnetic nanoparticles: In vivo cancer diagnosis and therapy,” *Int. J. Pharm.*, vol. 493, no. 1–2, pp. 313–327, 2015.
- [24] S. C. McBain, H. H. P. Yiu, and J. Dobson, “Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 3, no. 2, pp. 169–180, 2008.
- [25] Z. Karimi, L. Karimi, and H. Shokrollahi, “Nano-magnetic particles used in biomedicine: Core and coating materials,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 5, pp. 2465–2475, 2013.
- [26] B. Rittich and A. Španová, “SPE and purification of DNA using magnetic particles,” *J. Sep. Sci.*, vol. 36, no. 15, pp. 2472–2485, 2013.

- [27] D. Horák, M. Babič, H. Macková, and M. J. Beneš, “Preparation and properties of magnetic nano- and microsized particles for biological and environmental separations,” *J. Sep. Sci.*, vol. 30, no. 11, pp. 1751–1772, 2007.
- [28] A. K. Gupta and M. Gupta, “Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 18, pp. 3995–4021, 2005.
- [29] R. H. A. M. Vossen, E. Aten, A. Roos, and J. T. Den Dunnen, “High-resolution melting analysis (HRMA) - More than just sequence variant screening,” *Hum. Mutat.*, vol. 30, no. 6, pp. 860–866, 2009.
- [30] J. Gonzalez-Bosquet *et al.*, “Detection of somatic mutations by high-resolution DNA melting (HRM) analysis in multiple cancers,” *PLoS One*, vol. 6, no. 1, 2011.
- [31] F. Jilberto, C. Araneda, and M. A. Larraín, “High resolution melting analysis for identification of commercially-important *Mytilus* species,” *Food Chem.*, vol. 229, pp. 716–720, 2017.
- [32] M. Tamburro and G. Ripabelli, “High Resolution Melting as a rapid, reliable, accurate and cost-effective emerging tool for genotyping pathogenic bacteria and enhancing molecular epidemiological surveillance: a comprehensive review of the literature,” *Ann Ig*, vol. 29, pp. 293–316, 2017.
- [33] W. Sun, J. Li, C. Xiong, B. Zhao, and S. Chen, “The Potential Power of Bar-HRM Technology in Herbal Medicine Identification,” *Front. Plant Sci.*, vol. 7, no. March, pp. 1–10, 2016.
- [34] D. Porcellato, H. Grønnevik, K. Rudi, J. Narvhus, and S. B. Skeie, “Rapid lactic acid bacteria identification in dairy products by high-resolution melt analysis of DGGE bands,” *Let. Appl. Microbiol.*, vol. 54, no. 4, pp. 344–351, 2012.
- [35] K. Chauhan *et al.*, “Rapid identification of dairy mesophilic and thermophilic sporeforming bacteria using DNA high resolution melt analysis of variable 16S rDNA regions,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 165, no. 2, pp. 175–183, 2013.
- [36] F. T. Tabit, “Advantages and limitations of potential methods for the analysis of bacteria in milk: a review,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 53, no. 1, pp. 42–49, 2016.
- [37] D. Jin *et al.*, “Rapid molecular identification of *Listeria* species by use of real-time PCR and high-resolution melting analysis,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 330, no. 1, pp. 72–80, 2012.
- [38] B. Druml and M. Cichna-Markl, “High resolution melting (HRM) analysis of DNA - Its role and potential in food analysis,” *Food Chem.*, vol. 158, pp. 245–254, 2014.
- [39] F. Sambrook, Joseph and W. Russell David, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

- [40] P. R. Desjardins and D. S. Conklin, "Microvolume quantitation of nucleic acids," *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, no. SUPPL.93, pp. 1–4, 2011.
- [41] L. Grillová, "Diplomová Práce," p. 88, 2012.
- [42] S. Ogiy, Y. Chen, R. Pasvolsky, Z. G. Weinberg, and M. Shemesh, "High resolution melt analysis to confirm the establishment of *Lactobacillus plantarum* and *Enterococcus faecium* from silage inoculants during ensiling of wheat," *Grassl. Sci.*, vol. 62, no. 1, pp. 29–36, 2016.

# ŽIVOTOPIS AUTORA

## Osobní informace

Jméno: Jana Konečná  
Trvalé bydliště: Sokola – Tůmy 64/13, 737 01 Český Těšín  
Datum narození: 8. 9. 1989

## Vzdělání

2014 – současnost Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, program Chemie a technologie potravin, obor Potravinářská chemie a biotechnologie, Doktorské studium, téma disertační práce: *Probiotické geny potravinářsky významných bakterií mléčného kvašení*

2012 – 2014 Ostravská univerzita, Přírodovědecká fakulta, katedra biologie a ekologie, obor Experimentální biologie, dosažený titul Mgr., téma diplomové práce: *Charakterizace kmenů hub pro biodegradaci plastů na pevných a tekutých médiích*

2009 – 2012 Ostravská univerzita, Přírodovědecká fakulta, katedra biologie a ekologie, obor Experimentální biologie, dosažený titul Bc., téma bakalářské práce: *Biodegradční výkonnost houby *Dichomitus squalens* v jednorázové kultuře v minerálním mediu.*

2005 – 2009 Gymnázium, Třinec, příspěvková organizace, maturitní zkouška: český jazyk, anglický jazyk, chemie, biologie

## Pracovní zkušenosti

8/2016 Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Centrum materiálového výzkumu, vědecko-technický pracovník - laboratoř anorganických materiálů

2/2016 – 5/2016 Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, - výuka praktik

10/2017 – doposud Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Centrum materiálového výzkumu, vědecko-technický pracovník - laboratoř anorganických materiálů

## Zahraniční stáž

1/2017 – 9/2017 Universidad de Huelva; Departamento de Química "Profesor José Carlos Vílchez Martín", áreas Bioquímica y Biología Molecular, Huelva, Spain  
Náplň práce: Optimalizace magnetických nosičů pro izolaci *archea* a *microalgae*.

## Pedagogická činnost

2014/2015 letní semestr - Praktikum z biotechnologie  
2015/2016 letní semestr – Praktikum z biotechnologie  
2016/2017 zimní semestr – Praktikum z molekulární biotechnologie

## PUBLIKACE A VÝSTUPY V RÁMCI STUDIA

Publikace v impaktovaných časopisech

1. KONEČNÁ, J.; ROMANOVSKÁ, D.; TRACHTOVÁ, Š. OPTIMALIZATION OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID EXTRACTION USING VARIOUS TYPES OF MAGNETIC PARTICLES. – v recenzním řízení

Konferenční příspěvky v podobě recenzovaných full textu

1. KONEČNÁ, J.; ŠPANOVÁ, A.; HORÁK, D.; RITTICH, B. SOLID – PHASE DNA EXTRACTION USING VARIOUS TYPES OF MAGNETIC MICROPARTICLES. *Czech Chemical Society Symposium Series*, 2015, roč. 13, č. 2, s. 85-87. ISSN: 2336- 7210.
2. KONEČNÁ, J.; CHVALKOVSKÁ, E.; KNÁPKOVÁ, M.; ŠPANOVÁ, A.; RITTICH, B.; BRÁZDA, V. High resolution melting analysis for identification of strains belonging to the *Lactobacillus casei* group. In *Študentská vedecká konferencia PriF UK 2018 Zborník recenzovaných príspevkov*. 2018. s. 302-307. ISBN: 978-80-223-4517-0.

Plné texty příspěvků a abstraktů z konferencí

1. KONEČNÁ, J.; CHVALKOVSKÁ, E.; KNÁPKOVÁ, M.; ŠPANOVÁ, A.; RITTICH, B.; BRÁZDA, V. High resolution melting analysis for identification of strains belonging to the *Lactobacillus casei* group. In *Študentská vedecká konferencia PriF UK 2018 Zborník recenzovaných príspevkov*. 2018. s. 302-307. ISBN: 978-80-223-4517-0. - poster
2. KONEČNÁ J.; HORÁK D.; ŠPANOVÁ A.; VILLEGAS P.; LEON R. *Comparison and optimalization of DNA extraction methods using new magnetic particles for analysis of Haloarcula*. Libro de resúmenes – Congreso nacional de biotecnología – Biotech 2017. S. 255. – poster
3. KONEČNÁ, J.; TRACHTOVÁ, Š.; ŠPANOVÁ, A.; RITTICH, B. *Optimalization of HRM-PCR method for identification lactic acid bacteria from complex samples*. Book of Abstracts - 8th Central European Conference “Chemistry towards Biology“. 2016. s. 111-111. ISBN: 978-80-7305-777- 0. - poster
4. KONEČNÁ, J.; ŠPANOVÁ, A.; HORÁK, D.; RITTICH, B. Comparison of magnetic nano- and microparticles application for DNA isolation from real samples. In *Študentská odborná konferencia Chemie je život 2015, Sborník příspěvků*. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, 2015. s. 257-262. ISBN: 978-80-214-5290- 9. – prezentace v anglickém jazyce

5. KONEČNÁ, J.; ŠPANOVÁ, A.; HORÁK, D.; RITTICH, B. *SOLID - PHASE DNA EXTRACTION USING VARIOUS TYPES OF MAGNETIC MICROPARTICLES*. Chemistry & Life 2015 - Book of Abstracts. 1. Brno: Brno University of Technology, 2015. s. 99-99. ISBN: 978-80-214-5228- 2. - poster
6. VAŠÍČEK, R.; VAŇÁSEK, J.; KONEČNÁ, J.; TRACHTOVÁ, Š.; ŠPANOVÁ, A.; RITTICH, B. *Detection of Lactobacillus acidophilus species in the probiotic meat product*. Chemistry & Life 2015 – Book of Abstracts. 1. Brno, Czech Republic: Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, 2015. s. 103-103. ISBN: 978-214-5228-2. – poster