



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ  
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ  
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY  
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# IZOLACE DNA V KVALITĚ PRO PCR Z PROBIOTICKÝCH VÝROBKŮ PRO DĚTSKOU VÝŽIVU

ISOLATION OF PCR-READY DNA FROM PROBIOTIC PRODUCTS FOR BABY NUTRITION

DIPLOMOVÁ PRÁCE  
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

Bc. GABRIELA MANTLOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE  
SUPERVISOR

doc. RNDr. ALENA ŠPANOVÁ, CSc.

BRNO 2013



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

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	<b>FCH-DIP0597/2011</b>	Akademický rok: <b>2012/2013</b>
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	<b>Bc. Gabriela Mantlová</b>	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	<b>doc. RNDr. Alena Španová, CSc.</b>	
Konzultanti:		

### Název diplomové práce:

Izolace DNA v kvalitě pro PCR z probiotických výrobků pro dětskou výživu

### 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: 3.5.2013

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

-----  
Bc. Gabriela Mantlová  
Student(ka)

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

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

V Brně, dne 17.1.2012

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlíka, DrSc.  
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Diplomová práce byla zaměřena na izolaci DNA v kvalitě pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR) a následnou identifikaci probiotických bakterií. Pomocí magnetických částic P(HEMA-*co*-GMA) byla izolována DNA v kvalitě pro PCR ze šesti probiotických preparátů vhodných jako doplňky stravy pro děti. Izolovaná DNA byla amplifikována v PCR pomocí rodově a druhově specifických primerů. Byly identifikovány následující mikroorganismy rodů *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Streptococcus*: *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *B. bifidum*, *B. longum* ssp. *longum*, *B. breve*, *B. longum* ssp. *infantis*, *B. animalis* a *S. thermophilus*. Tato identifikace je v souladu s údaji deklarovanými výrobcí.

## ABSTRACT

The aim of thesis is focused on isolation of DNA in quality for polymerase chain reaction (PCR) and the identification of probiotic bacteria. From six probiotic supplements for children were isolated PCR-ready DNAs using magnetic carriers P(HEMA-*co*-GMA). Isolated DNA was amplified by genus-specific and species-specific primers. DNAs of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Streptococcus* genera were identified as: *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *B. bifidum*, *B. longum* ssp. *longum*, *B. breve*, *B. longum* ssp. *infantis*, *B. animalis* and *S. thermophilus*. The identification corresponded with the data declared by the producers.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Probiotika, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, izolace DNA, identifikace DNA, polymerázová řetězová reakce (PCR)

## KEYWORDS

Probiotics, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, DNA isolation, DNA identification, polymerase chain reaction (PCR)

MANTLOVÁ, G. *Izolace DNA v kvalitě pro PCR z probiotických výrobků pro dětskou výživu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 59s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

## **PROHLÁŠENÍ**

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

.....  
Gabriela Mantlová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala především doc. RNDr. Aleně Španové, CSc. a doc. Ing. Bohuslavu Rittichovi, CSc. za čas, odborné vedení a cenné rady, které mi věnovali při zpracování této práce.

# OBSAH

1	ÚVOD .....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	9
2.1	Probiotika .....	9
2.2	Děti a probiotika .....	9
2.3	Funkce probiotik .....	9
2.4	Negativní vliv probiotik .....	10
2.5	Bakterie mléčného kvašení .....	10
2.5.1	Mléčné kvašení .....	10
2.5.2	Taxonomie bakterií mléčného kvašení .....	11
2.5.2.1	Rod Lactobacillus .....	11
2.5.2.2	Rod Bifidobacterium .....	12
2.6	Metoda polymerázové řetězové reakce PCR .....	12
2.6.1	Princip PCR .....	12
2.6.2	Citlivost a využití PCR .....	14
2.6.3	Faktory ovlivňující PCR .....	14
2.6.4	Komponenty pro PCR .....	14
2.7	Spektrofotometrie DNA .....	15
2.8	Agarosová gelová elektroforéza .....	15
3	cíl práce .....	17
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	18
4.1	Přístroje a pomůcky .....	18
4.2	Chemikálie .....	18
4.3	Magnetické mikročástice .....	19
4.4	Živná média .....	19
4.5	Roztoky pro přípravu hrubého lyzátu buněk .....	19
4.6	Roztoky pro fenol-chloroformovou extrakci DNA .....	20
4.7	Roztoky pro izolaci DNA pomocí magnetických mikročástic .....	21
4.8	Komponenty pro PCR .....	21
4.9	Roztoky pro gel a gelovou elektroforézu .....	22
4.10	Vzorky probiotických doplňků stravy .....	22
4.11	Bakteriální kultury .....	26
4.12	Metody .....	26

4.12.1	Oživení bakterií čistých kultur .....	26
4.12.2	Lyze buněk bakterií čistých kultur .....	26
4.12.3	Izolace bakteriální DNA čistých kultur – fenolová extrakce .....	27
4.12.4	Izolace bakteriální DNA ze vzorků – pomocí magnetických nosičů .....	27
4.12.5	Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace izolovaných DNA .....	28
4.12.6	Ampifikace izolované DNA .....	29
4.12.6.1	PCR specifická pro rod <i>Lactobacillus</i> .....	30
4.12.6.2	PCR specifická pro rod <i>Bifidobacterium</i> .....	30
4.12.6.3	PCR specifická pro druh <i>Bifidobacterium animalis</i> .....	31
4.12.6.4	PCR specifická pro druh <i>Bifidobacterium bifidum</i> .....	31
4.12.6.5	PCR specifická pro druh <i>Bifidobacterium breve</i> .....	32
4.12.6.6	PCR specifická pro druh <i>Bifidobacterium longum ssp. infantis</i> .....	32
4.12.6.7	PCR specifická pro druh <i>Bifidobacterium longum ssp. longum</i> .....	33
4.12.6.8	PCR specifická pro druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	33
4.12.6.9	PCR specifická pro druh <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .....	34
4.12.6.10	PCR specifická pro druh <i>Lactobacillus casei</i> .....	34
4.12.6.11	PCR specifická pro druh <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	35
4.12.7	Agarosová gelová elektroforéza .....	35
5	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	36
5.1	Izolace DNA z čistých kmenů jako pozitivní kontrola .....	36
5.2	Izolace DNA z vybraných probiotických preparátů .....	37
5.2.1	Vzorek A – Normospektrum .....	37
5.2.2	Vzorek B – Apo-Baby Probio .....	38
5.2.3	Vzorek C – Biopron Junior .....	38
5.2.4	Vzorek D – Biopron Laktobacily .....	39
5.2.5	Vzorek E – Linex Baby .....	39
5.2.6	Vzorek F – Laktobacílky .....	40
5.3	Identifikace bakterií z izolovaných DNA .....	40
5.3.1	PCR s primery specifickými pro rod <i>Lactobacillus</i> .....	41
5.3.2	PCR s primery specifickými pro rod <i>Bifidobacterium</i> .....	42
5.3.3	PCR s primery specifickými pro druh <i>Bifidobacterium animalis</i> .....	43
5.3.4	PCR s primery specifickými pro druh <i>Bifidobacterium bifidum</i> .....	44
5.3.5	PCR s primery pro druh <i>Bifidobacterium breve</i> .....	45
5.3.6	PCR s primery specifickými pro druh <i>Bifidobacterium longum ssp. infantis</i> .....	46

5.3.7	PCR s primery pro druh <i>Bifidobacterium longum</i> ssp. <i>longum</i> .....	47
5.3.8	PCR s primery specifickými pro druh <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	48
5.3.9	PCR s primery specifickými pro druh <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .....	49
5.3.10	PCR s primery specifickými pro druh <i>Lactobacillus casei</i> .....	50
5.3.11	PCR s primery specifickými pro druh <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	51
6	ZÁVĚR .....	52
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....	57
	SEZNAM PŘÍLOH .....	58
	PŘÍLOHY .....	59

# 1 ÚVOD

Lidé a mikroorganismy spolu žijí odedávna. Některé mikroorganismy jsou pro člověka prospěšné, zatímco jiné způsobují nebezpečná onemocnění. Gastrointestinální trakt (GIT) je jedním ze společných míst, kde mikroorganismy hrají důležitou roli v metabolismu člověka.

Při narození je GIT sterilní, brzy je ovšem kolonizován z externích zdrojů, zejména z urogenitálního traktu matky a postupně se stabilizuje v průběhu následujících 18 měsíců. Kolonizace závisí dále na faktorech, jako je prostředí, způsob krmení dítěte, jeho hygiena. Zanedbatelný není ani rozdíl osídlení GIT dítěte při přirozeném porodu ve srovnání s císařským řezem nebo přítomnost sourozenců či jiných dětí, užívání antibiotik a další faktory (1).

Výživa je jeden z hlavních faktorů pro udržení dostatečné populace střevních mikroorganismů. Velká pozornost je věnována bakteriím mléčného kvašení a bifidobakteriím, a to probiotickým druhům, které mají pozitivní účinek na zdraví člověka. Probiotika mohou zmírňovat laktosovou intoleranci, snižovat hladinu cholesterolu, omezovat výskyt průjmů, stimulovat imunitní systém udržováním rovnováhy zdravé intestinální mikroflóry. Uvedené mikroorganismy jsou součástí různých potravin a doplňků stravy. S nárůstem používání probiotických kultur v potravinářském a farmaceutickém průmyslu se zvyšuje význam kontroly jejich přítomnosti v různých výrobcích. K ověřování přítomnosti a množství cílových bakteriálních buněk (probiotik) se využívají metody analýzy DNA.



## **2 TEORETICKÁ ČÁST**

### **2.1 Probiotika**

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které po požití v určitém množství, uplatňují pro jedince zdravotní benefity nad rámec přirozené základní výživy. Podle této definice, mohou být probiotika konzumována jakou součástí potravin, nebo jako doplňky stravy (2).

Doplňky stravy mají doplnit běžnou stravu a představují koncentrovaný zdroj živin, nebo jiných substancí s výživovým nebo fyziologickým účinkem. Jsou určeny k přímé spotřebě a od běžných potravin se odlišují vysokým obsahem vitaminů, minerálů nebo jiných látek, které mají nutriční nebo fyziologický účinek a byly vyrobeny za účelem doplnění běžné stravy spotřebitele (3).

Právní regulace doplňků stravy je vymezena zákonem č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích, ve znění pozdějších předpisů a vyhláškou č. 446/2004 Sb., kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a na obohacování potravin potravními doplňky, a některými dalšími předpisy. Tato vyhláška také vymezuje podmínky použití doplňků stravy (3).

Léčivé přípravky jsou určeny pro prevenci, léčbu, diagnózu, zmírnění onemocnění, nebo k ovlivnění a úpravě fyziologických funkcí. Doplňky stravy jsou vhodné pro výživu, doplňují běžnou stravu na úroveň, která příznivě ovlivňuje zdravotní stav a nejsou účelově určeny k prevenci, zmírnění nebo léčení chorob (3).

### **2.2 Děti a probiotika**

Probiotické doplňky mohou u dětí snížit počet výskytu průjmů a podpořit zotavení z akutních průjmových onemocnění. Mohou také zabránit rozvoji žaludečních potíží při užívání antibiotik. Pravidelné podávání probiotických doplňků snižuje výskyt koliky u malých dětí (4).

### **2.3 Funkce probiotik**

Probiotické mikroorganismy mohou mít na organismus hostitele následující účinky:

- kontrolují růst nežádoucích (patogenních) střevních mikroorganismů. Probiotika tvoří organické kyseliny, tím dochází k poklesu pH, které není příznivé pro patogeny, a ti svůj růst zastavují,
- spolu s celkově zdravou životosprávou pomáhají v prevenci vzniku karcinomu střev. Poklesem pH a potlačením růstu hnilobných bakterií klesá tvorba rakovinotvorných

látek v samotném střevě. Kromě toho mohou probiotika případné rakovinotvorné látky chemicky rozložit a tím jim zabránit v jejich činnosti,

- kontrolují hladinu cholesterolu v krvi. V dietě při zvýšené hladině cholesterolu v krvi mohou hrát probiotika důležitou roli. Jejich působením dochází k rozkladu žlučových kyselin a uvolněný cholesterol se nemůže zpátky vstřebávat,
- omezení následků redukční diety. Každá redukční dieta je pro organismus nápor,
- součást opatření proti zácpě. Probiotika jsou cestou, jak se zbavit závislosti na projímadlech, které zdraví příliš neprospívají. Důležité je přijímat kromě probiotik dostatek vlákniny, pít hodně tekutin a udržovat přiměřenou pohybovou aktivitu (5).

## **2.4 Negativní vliv probiotik**

Neomezené využití probiotik může mít nežádoucí vedlejší účinky. S největší pravděpodobností by tyto účinky neměly žádný vliv na zdravého jedince, ale měly by být považovány za možné riziko u skupin oslabených jedinců. Riziková je autoimunitní choroba (2).

## **2.5 Bakterie mléčného kvašení**

Nejvýznamnějšími probiotickými mikroorganismy jsou bakterie mléčného kvašení. Tyto bakterie jsou běžně rozšířeny v půdě, zelenině, mase, mléce, lidském těle. Typické bakterie mléčného kvašení jsou charakterizovány jako gram pozitivní tyčinky nebo koky, netvořící spory a jsou kataláza negativní (6).

### **2.5.1 Mléčné kvašení**

Mléčné kvašení zahrnuje metabolismus sacharidů působením bakterií mléčného kvašení. To může být charakterizováno jako homofermentativní, nebo heterofermentativní. Nelze ale o každém mikroorganismu říci, že metabolizuje sacharidy na kyselinu mléčnou výlučně bez všech ostatních produktů (7).

Mléčné kvašení probíhá anaerobně. Při kvašení je pyruvát vzniklý glykolýzou redukován v laktát, tj. anion kyseliny mléčné působením laktátdehydrogenasy s NADH (8).

Při homofermentativním kvašení vzniká jako konečný produkt kyselina mléčná. Jako substrát se uplatňují hlavně hexosy, jejichž fermentace probíhá cestou glykolysy. Sled reakcí této dráhy je až do vzniku kyseliny pyrohroznové stejný jako při etanolovém kvašení. Konečnou fází představuje přeměna kyseliny pyrohroznové na kyselinu mléčnou. Reakci katalyzuje

NAD-laktátdehydrogenasa, která přenáší vodík odnímaný při dehydrogenaci triosofosfátu na kyselinu pyrohroznovou (9).

Heterofermentativní kvašení je charakterizováno tím, že kromě kyseliny mléčné vznikají další konečné produkty. Nejčastěji jde o kyselinu octovou, etanol, vodík a oxid uhličitý. U většiny původců tohoto kvašení chybí základní enzymy glykolytické dráhy. Štěpení hexos probíhá po fosfoketolasové dráze. Pokud jsou substrátem hexosy, jsou zkvašovány za vzniku kyseliny mléčné, etanolu a oxidu uhličitého. Pokud je substrátem pentosa, vzniká kyselina mléčná a octová (9)

Bakterie rodu *Bifidobacterium* mají odlišný mechanismus heterofermentativního kvašení glukosy. Proces probíhá rovněž po fosfoketolasové dráze. Tyto bakterie však postrádají aldosu a glukosu-6-fosfodehydrogenasu, ale obsahuje dvě aktivní fosfoketolasy. Takže vzniklý glycerinaldehyd je cestou glykolysy přeměněn přes kyselinu pyrohroznovou na kyselinu mléčnou a acetyl-fosfát přechází na kyselinu octovou (9).

## **2.5.2 Taxonomie bakterií mléčného kvašení**

Dále budou popsány konkrétní bakterie využívané v praktické části diplomové práce.

### **2.5.2.1 Rod *Lactobacillus***

- Třída: *Bacilli*
- Řád: *Lactobacillales*
- Čeleď: *Lactobacillaceae*
- Rod: *Lactobacillus* (10)
- Druhy: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*

Laktobacily jsou gram pozitivní bakterie, pravidelné tyčky (obvykle delší), občas kokovité, uspořádané v palisádách nebo řetízcích. Nesporulující, fakultativně anaerobní, občas mikroaerofilní. Rod *Lactobacillus* je v přírodě velmi rozšířen. Jeho druhy se vyskytují v mléce, ústech, osídlují gastrointestinální trakt a vaginu savců a jsou na travinách i v půdě. Jde o chemoorganotrofní bakterie vyžadující bohatá komplexní média. Většina druhů je schopná růst i při 45 °C, optimum je 30 – 40 °C a většina zkvašuje laktosu. Podle produktů katabolického metabolismu jsou zastoupeny homofermentativní i heterofermentativní. Pouze vzácně jsou patogenní (11), (12).

### 2.5.2.2 Rod *Bifidobacterium*

- Třída: *Actinobacteria*
- Řád: *Bifidobacteriales*
- Čeleď: *Bifidobacteriaceae*
- Rod: *Bifidobacterium* (10)
- Druhy: *B. bifidum*, *B. longum* ssp. *longum*, *B. breve*, *B. longum* ssp. *infantis*, *B. animalis*

Podle nejnovějších poznatků byly druhy *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium infantis* překlasifikovány na *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* a *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis*. Z tohoto vyplývá, že značení používané výrobcí preparátů již neodpovídá současným poznatkům (13).

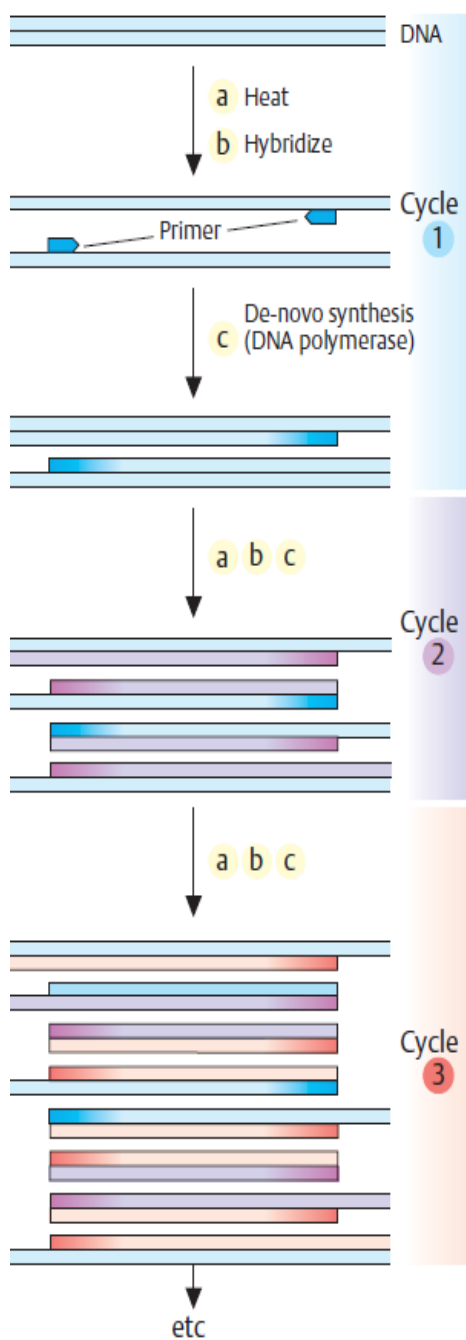
Bifidobakterie jsou gram pozitivní buňky, často nepravidelně obarvené, nepohyblivé, nesporulující, neacidorezistentní, anaerobní, kataláza negativní. Optimální růstová teplota je v rozmezí 37 – 41 °C. Buňky jsou velmi pleomorfní (od kokovitých tvarů přes kyjovité útvary až k dlouhým větveným tyčinkám). Nacházejí se v ústech a ve střevním traktu teplokrevných zvířat. Jsou prospěšnou součástí střevní mikroflóry (11), (12).

## 2.6 Metoda polymerázové řetězové reakce PCR

Zavedení polymerasové řetězové reakce (PCR) v roce 1985 Kary B. Mullisem, zaznamenalo pro molekulární biologii stejný přínos jako objev restrikčních endonukleas nebo zavedení sekvencování DNA. Výhodou PCR je zejména to, že umožňuje získat požadovanou a specifickou sekvenci genomové DNA bez jejího předchozího klonování ve vektorech (14).

### 2.6.1 Princip PCR

Princip je založen na replikaci nukleových kyselin, která je základním molekulárním procesem všech živých organismů. Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5' → 3' prostřednictvím DNA polymerasy. Amplifikovaný úsek nukleových kyselin je vymezen připojením dvou primerů, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'-konce směřují proti sobě. Po přidání DNA polymerasy a nukleotidů potom probíhá syntéza nových vláken na obou matricových řetězcích protisměrně. PCR je proces, při kterém se v závislosti na teplotě střídají tři kroky, během nichž probíhají tři odlišné děje s odlišnými nároky na teplotu (14).



**Obrázek 1: průběh polymerázové řetězové reakce**  
(15)

- **Cyklus 1: denaturace dvouřetězcové DNA.** Optimální teplota je 94 – 95 °C. Teplotu určuje obsah guaninu a cytosinu. Pro amplifikaci templátové DNA s vyšším než 55 % zastoupením bází guaninu a cytosinu je nutno tuto teplotu zvýšit. V prvním cyklu PCR bývá doba denaturace prodloužena až na 10 minut pro zvýšení pravděpodobnosti úplného oddělení řetězců molekul DNA (16).
- **Cyklus 2: hybridizace primerů – annealing.** Jde o připojení primerů k jednotlivým řetězcům DNA. Určená teplota v tomto kroku je klíčová. Moc vysoká teplota brání napojení primerů k dané sekvenci na DNA. Moc nízká teplota zase vede ke snížení specificity a k amplifikaci nežádoucích fragmentů DNA. Teplota v tomto kroku je stanovena teplotou tání primerů. I když lze teplotu tohoto kroku vypočítat danými postupy, optimalizace se provádí experimentálně (16).
- **Cyklus 3: elongace.** Jde o syntézu nového řetězce DNA. Ta probíhá při teplotě, která je optimální pro syntetické působení DNA polymerasy. V případě *Taq* DNA polymerasy se tato teplota pohybuje v rozmezí 72 – 78 °C. Doba tohoto kroku je dána rychlostí, jakou se nový řetězec syntetizuje. Čas v tomto kroku se prodlužuje až trojnásobně pro zajištění dosyntetizování všech řetězců (16).

### 2.6.2 Citlivost a využití PCR

PCR je velice citlivá metoda, která umožňuje detekci jediné kopie DNA ve vzorku tím, že tuto sekvenci namnoží do té míry, že ji můžeme po separaci gelovou elektroforézou a obarvení snadno detegovat (17).

### 2.6.3 Faktory ovlivňující PCR

PCR je plně automatizovaný proces, který využívá termostabilní DNA polymerasu. DNA polymerasa katalyzuje prodlužování primerů při laboratorní teplotě, což může být příčinou chyb a vzniku nespecifických produktů. Specifičnost, citlivost a výtěžek reakce významně ovlivňuje modifikace PCR označovaná jako hot-start PCR. Při PCR s horkým startem jsou určité složky reakční směsi odděleny od ostatních, dokud teplota nepřekročí optimální teplotu pro připojení primerů. DNA polymeráza je v této nekompletní reakční směsi nefunkční, a proto nedochází k prodlužování nespecificky navázaných primerů, dokud není dosažena teplota tání primerů (14).

### 2.6.4 Komponenty pro PCR

K syntéze DNA se používají termostabilní polymerasy izolované z termofilních mikroorganismů. *Taq* DNA polymerasa z *Thermus aquaticus* odolává teplotám, při nichž DNA denaturuje. To umožňuje, aby syntéza DNA probíhala opakovaně formou cyklů (14).

Reakční směs, obvykle v rozmezí 25 – 100  $\mu$ l, se skládá z následujících složek:

- DNA templát – makromolekula DNA, podle které se komplementárně syntetizují nové řetězce DNA. Obsahuje cílová místa pro primery. Typická množství bakteriální a plasmidové DNA přidávané do reakce jsou 10 a 1 ng a 10 pg,
- oligonukleotidové primery – bývají synteticky připraveny a jsou komplementární k templátové DNA, která má být amplifikována. Primery jsou sekvenčně specifické a nesmí obsahovat falešná vazebná místa na templátu. Typické primery mají 18 – 30 nukleotidů a obsahují 40 – 60 % GC bází. Teplota tání primerů bývá v rozmezí 55 – 80 °C. Primery by měly být mezi sebou komplementární, zejména na 3'- konci, kde párování dvou nebo tří bází může vést ke vzniku dimerů primerů, zejména při nadbytku primerů. Potřebná koncentrace každého primeru pro jednu reakci je 0,1 – 0,5  $\mu$ M,

- DNA polymerasa – syntetizuje novou DNA ve směru 5' → 3' podle sekvence nukleotidů v komplementárním řetězci DNA od 5' konce k primeru. Ke katalýze se používají termostabilní polymerasy,
- dNTP – 3'-deoxynukleosid-5'-trifosfáty (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) jsou stavební kmeny pro syntézu nové DNA. Optimální koncentrace je 200 μM, toleranční rozpětí je 20 -400 μM. Vysoké koncentrace dNTP (od 4 mM a výše) působí inhibičně, protože vyvazují hořčičnaté ionty,
- Mg<sup>2+</sup> ionty – jsou nezbytné pro aktivitu DNA polymerasy. Koncentrace hořčičnatých iontů musí být optimalizována pro každou kombinaci primerů a DNA templátu. Obvykle se používá koncentrace 1,5 mM. Toleranční rozpětí je 0,5 – 8 mM. Vyšší koncentrace iontů snižuje specifitu PCR. U primerů bohatých na G a C báze je ale použití vyšší koncentrace Mg<sup>2+</sup> vhodnější,
- pufr pro PCR – vytváří optimální prostředí pro DNA polymerasu. Standardní reakční pufr obsahuje 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 – 8,8), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>. Případně může ještě obsahovat acetamid, albumin, želatinu nebo Tween 20,
- voda pro PCR – používá se na doplnění směsi pro PCR na požadovaný objem. Nejvhodnější je voda o odporu 18 mΩ, nebo voda pro injekce ČSL 4 (18).

## 2.7 Spektrofotometrie DNA

Spektrofotometrická metoda se využívá v případě, že je koncentrace DNA vyšší než 25 mg·l<sup>-1</sup> a vzorek neobsahuje významné množství nečistot (19).

Nukleové kyseliny absorbují UV záření s maximem absorbance v oblasti vlnové délky okolo 260 nm. Z hodnot absorbance lze koncentraci vzorku vypočítat podle empirických vztahů. Stupeň čistoty nukleových kyselin se stanovuje z poměru absorbance při 260 a 280 nm. Při znečištění vzorku proteiny, jejichž absorpční maximum leží okolo 280 nm, bude vypočtený poměr výrazně nižší než u vzorků obsahujících pouze nukleové kyseliny a hodnoty stanovené koncentrace nukleových kyselin budou nepřesné (20).

## 2.8 Agarosová gelová elektroforéza

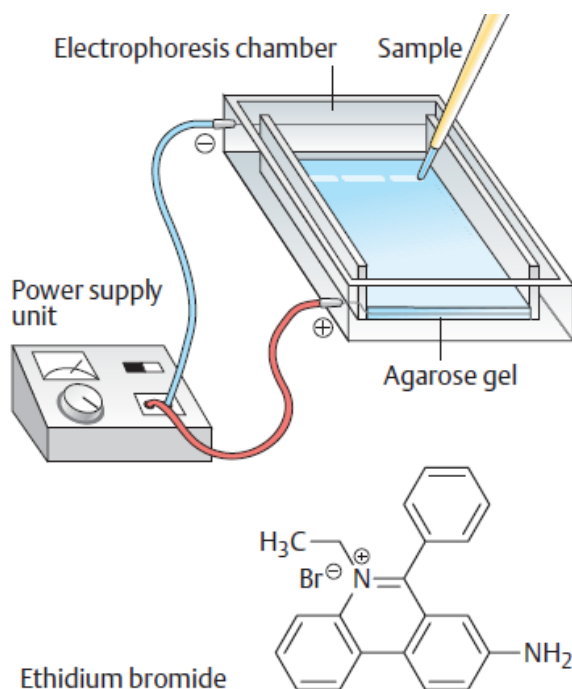
Elektroforéza patří v molekulární biologii k nejpoužívanějším separačním technikám při izolaci a analýze nukleových kyselin a proteinů. Principem elektroforetické separace je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou záporně nabitě fosfátové skupiny (20).

Elektroforetické gely používané pro separaci nukleových kyselin jsou nejčastěji tvořeny polyakrylamidem nebo agarosou. Agarosové gely jsou vhodné pro separaci molekul nukleových kyselin od velikosti několika set bp až po zhruba 50 kb (20).

Agarosa je polysacharid izolovaný z mořských řas. Za zvýšené teploty se rozpouští ve vodě. Vzniklý hustý koloidní roztok se nalévá do ploché formy, kde po chlazení vytvoří vhodný gel pro elektroforézu (19).

Rychlost pohybu molekul DNA v gelu, označovaná jako elektroforetická pohyblivost, je nepřímo úměrná logaritmu jejich velikosti. Velikost fragmentu DNA o neznámé velikosti lze proto stanovit srovnáním jeho elektroforetické pohyblivosti s elektroforetickou pohyblivostí fragmentů o známé velikosti, označovaných jako standardy velikosti. Těmi bývají většinou restriční fragmenty plazmidových molekul, jejichž přesná velikost byla stanovena sekvencováním (20).

Po proběhnutí elektroforézy je třeba identifikovat polohy rozdělených molekul, které nejsou pouhým okem viditelné. Molekuly DNA lze snadno zviditelnit vhodným fluorescenčním barvivem. Nejčastěji se používá ethidiumbromid, který se vmezeřuje mezi sousední páry bází v DNA a vytváří s ní komplex, který po osvětlení ultrafialovým světlem fluoreskuje. Molekuly DNA o stejné velikosti jsou pak patrné jako proužky, jejichž intenzita je úměrná koncentraci DNA (20).



**Obrázek 2: průběh elektroforézy (15)**



### 3 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo izolovat DNA z probiotických výrobků pro dětskou výživu v kvalitě vhodné pro PCR. Izolovaná DNA byla použita k rodové a druhové identifikaci deklarovaných mikroorganismů.

Součástí práce také bylo:

- Příprava hrubých lyzátů buněk z vybraných výrobků
- Izolace DNA z vybraných výrobků pomocí magnetických mikročásteček P(HEMA-*co*-GMA)
- Izolace kontrolních bakterií pomocí fenolové extrakce
- Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolovaných DNA
- Identifikace rodů a druhů bakterií deklarovaných ve výrobcích pomocí specifických PCR
- Porovnání výsledků s údaji výrobců

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Přístroje a pomůcky

- Centrifuga (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)
- Centrifuga MINI Spin 13 400 min<sup>-1</sup> (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Laboratorní váhy (Kern a Sohn, Německo)
- Magnetický separátor InvitrogenDynaL AS (DynaLBiotech, Oslo, Norsko)
- Fotoaparát (Canon powershot A470)
- Mikropipety Discovery HTL s objemy 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl, (Discovery HTL, Varšava, Polsko)
- Mikrovlná trouba SMW 5020 (Sencor, ČR)
- Minicentrifuga C1301 (Labnetinternational, Inc., USA)
- Minicycler PTC 150 (MJ Research, Watertown, USA)
- NanoPhotometr (Implan, Německo)
- Termocycler PTC-200 (BIO-RAD Lab., USA)
- Termostat – mini incubator (Labnet, USA)
- Transluminátor TVR 3121 (Spectroline, Paramount, USA)
- Zařízení pro elektroforézu Easy-Část, model B1 (OwlScientific, USA)
- Zdroj elektrického napětí Lighting volt Power Supply, model OSP-300 (OwlScientific, USA)
- Běžné laboratorní sklo, plastové nádoby a pomůcky

### 4.2 Chemikálie

- Agarosa pro elektroforézu (Serva Electrophoresis, Německo)
- Destilovaná voda (FCH VUT Brno, Brno, ČR)
- DNA velikostní standard (žebříček 100 bp) (MALAMITÉ, Moravské Prusy, Česká republika). Obsahuje fragmenty 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1 000, 1 200 a 1 500 bp.
- Dodecylsulfát sodný, SDS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethanol p. a. (Penta, Chrudim, Česká republika)
- Ethidium bromid, EtBr (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Fenol (Erba Lachema, Brno, Česká republika)

- Chloroform (Penta, Chrudim, Česká republika)
- Isoamylalkohol (3-methyl-1-butanol) (Erba Lachema, Brno, Česká republika)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, Česká republika)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová, EDTA (Serva Electrophoresis, Německo)
- Lysozym (Serva Electrophoresis, Německo)
- Octan sodný (Erba Lachema, Brno, Česká republika)
- Polyethylenglykol 6 000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Proteinasa K (Serva, Heidelberg, Německo)
- RNasa A (Serva, Heidelberg, Německo)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Tris-báze (Serva Electrophoresis, Německo)

Další chemikálie použité v práci byly v čistotě p. a.

#### 4.3 Magnetické mikročástice

- Magnetické neporézní poly(glycidyl-methakrylátové) částice P(HEMA-co-GMA) funkcionalizované karboxylovými skupinami (-COOH) byly připraveny Ing. Danielem Horákem, CSc. na, Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, Praha, Česká republika.

#### 4.4 Živná média

- Tekuté živné médium MRS

52 g média MRS Broth (de Man, Rogosa a Sharp) bylo rozpuštěno v 1 000 ml destilované vody. pH média bylo upraveno pomocí 1M roztoku NaOH na hodnotu 6,5. Médium bylo sterilizováno v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

- Pevné živné médium MRS

Pevné živné médium MRS bylo připraveno smícháním tekutého MRS média s 15 g agarosy. Médium bylo sterilizováno v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

#### 4.5 Roztoky pro přípravu hrubého lyzátu buněk

- 0,5 M EDTA

0,5 M roztok EDTA byl připraven rozpuštěním 161,8 g kyseliny ethylendiamintetraoctové v 800 ml destilované vody. pH roztoku bylo upraveno

1 M NaOH na hodnotu 8,0. Roztok byl doplněn na objem 1 000 ml a sterilizován autoklávováním (teplota 121 °C po dobu 20 minut).

- 1 M Tris-HCl

1 M roztok Tris-HCl byl připraven rozpuštěním 12,1 g tris(hydroxymethyl)aminomethanu v 70 ml destilované vody. pH bylo upraveno koncentrovanou HCl na hodnotu 7,8. Roztok byl poté doplněn na objem 100 ml a sterilizován v autoklávu (teplota 121 °C po dobu 20 minut).

- Roztok A

Roztok A byl připraven smícháním 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,8), 1 ml EDTA (pH 8,0) a 98 ml destilované vody.

- Roztok B

Roztok B byl připraven smícháním roztoku A a lysozymu v množství 3 mg·ml<sup>-1</sup>.

- SDS (20 %)

20% SDS byl připraven rozpuštěním 20 g SDS v 80 ml sterilní destilované vody při teplotě 68 °C. pH bylo koncentrovanou HCl upraveno na hodnotu 7,0. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 100 ml.

- Roztok proteinasy K

Navážka 10 mg proteinasy K byla rozpuštěna v 1 ml sterilní destilované vody. Roztok byl uchováván při -20 °C. Před použitím byl roztok zředěn na koncentraci 100 µg·ml<sup>-1</sup>

#### **4.6 Roztoky pro fenol-chloroformovou extrakci DNA**

- TE pufr

TE pufr byl připraven sterilním smícháním 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,8), 200 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 98 ml sterilní destilované vody.

- Fenol (pH 7,8)

Fenol pro extrakci DNA byl připraven z předdestilovaného fenolu, který byl nasycen TE pufr. pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 7,8.

- CIZ

Roztok CIZ byl připraven smícháním chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1.

- Octan sodný (3 M)

3 M octan sodný byl připraven rozpuštěním 408,1 g trihydrátu octanu sodného v 800 ml destilované vody. pH roztoku bylo upraveno ledovou kyselinou octovou na hodnotu 5,2. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 1000 ml a sterilizován autoklávováním při 121 °C po dobu 20 minut.

#### **4.7 Roztoky pro izolaci DNA pomocí magnetických mikročastic**

- NaCl

5 M NaCl byl připraven rozpuštěním 58,4 g NaCl ve 150 ml destilované vody. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 200 ml a sterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut.

- PEG 6000

40% PEG 6000 byl připraven rozpuštěním 40 g polyethylenglykolu 6 000 v 60 ml sterilní destilované vody a roztok byl doplněn sterilní destilovanou vodou na objem 100 ml.

- 70% ethanol

70% ethanol byl připraven smícháním 70 ml 96% ethanolu a 26 ml sterilní destilované vody.

#### **4.8 Komponenty pro PCR**

- PCR voda (voda pro injekce) (Braun, Melsugen, Německo)
- 10× PCR Blue Buffer (PCR reakční pufr kompletní, obsahující MgCl<sub>2</sub>) (Top-Bio, Praha, Česká republika)
- PCR DTP Mix (10 mM) (Top-Bio, Praha, Česká republika)
- Oligonukleotidové primery (GENERI BIOTECH, Hradec Králové, Česká republika)
- *Taq* DNA Polymerasa 1.1 (1 U·μl<sup>-1</sup>) (Top-Bio, Praha, Česká republika)

## 4.9 Roztoky pro gel a gelovou elektroforézu

- **TBE pufr**

5× koncentrovaný TBE pufr byl připraven smícháním 54 g Tris-báze, 27,5 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> a 20 ml 0,5 M EDTA o pH 8,0. Vzniklý roztok byl doplněn sterilní destilovanou vodou na objem 1 000 ml. Roztok se před použitím ředí destilovanou vodou 10×.

- **Nanášecí pufr**

Použity byly pufrы Gel Loading Dey, Blue (New England Biolabs, Ipswich, USA) a Yellow Load (Top-Bio)

- **Agarosový gel**

1,8% agarosový gel byl připraven rozpuštěním 0,9 g agarosy v 50 ml 0,5× koncentrovaného TBE pufru.

- **Ethidium bromid**

Roztok ethidium bromidu o koncentraci 1 µg·ml<sup>-1</sup> byl připraven zředěním 100 µl ethidium bromidu o koncentraci 5 mg·ml<sup>-1</sup> v 500 ml destilované vody.

## 4.10 Vzorky probiotických doplňků stravy

Tabulka 1: označení vzorků probiotických preparátů

Název probiotického přípravku	Označení vzorku
Normospektrum (Нормоспектрум)	A
Apo-baby probio	B
Biopron Junio	C
Biopron LAKTOBACILY baby BIFI+	D
Linex baby	E
Lakrobacílky	F

### Normospectrum (Нормоспектрум)

- Výrobce: SPF Amfita (Rusko)
- Složení: probiotika, vitaminy a minerály (E, B1, riboflavin, B6, B12, kyselina listová, kyselina pantotenová, niacinamid, biotin, C, zinek, selen) vláknina (inulin, mikrokrystalická celulóza)
- Probiotika: *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* ssp. *longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*
- Pro děti od 3 do 14 let (21).



Obrázek 3: vzorek Normospektrum

### Apo-baby probio

- Výrobce: CELL BIOTECH EUROPE A/S (Dánsko)
- Složení: probiotika, dextrosa, maltodextrin, kukuřičný škrob, vitamin C, oxid křemičitý
- Probiotika: *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis*, *Streptococcus thermophilus*
- Pro děti od tří měsíců věku (22).



Obrázek 4: vzorek Apo-Baby Probio

## BiopronJUNIOR

- Výrobce: VALOSUN (ČR)
- Složení: probiotika, fruktooligosacharidy, inulin, vanilkové aroma, bramborový škrob
- Probiotika: *Lactobacillus acidophylus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis*
- Pro děti od jednoho měsíce věku (23).



Obrázek 5: vzorek Biopron Junior

## Biopron LAKTOBACILY Baby BIFI+

- Výrobce: VALOSUN (ČR)
- Složení: probiotika, fruktooligosacharidy, želatina, barvivo E171
- Probiotika: *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* ssp. *longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*
- Pro děti již od narození (24).



Obrázek 6: vzorek Biopron Laktobacily Baby Bifi+



## Linex Baby

- Výrobce: SANDOZ (Slovinsko)
- Složení: probiotika, maltodextrin
- Probiotika: *Bifidobacterium animalis*
- Vhodný i pro kojence (25).



Obrázek 7: Vzorek Linex Baby

## Laktobacílky

- Výrobce: Swiss Herbal Remedies Ltd. (Kanada)
- Složení: probiotika, sacharosa, sorbitol, kyselina askorbová, přírodní třešňová příchut', maltodextrin, přírodní barvivo
- Probiotika: *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum* ssp. *longum*, *Lactobacillus acidophilus*
- Vhodné pro děti od tří let (26).



Obrázek 8: vzorek Laktobacílky

## 4.11 Bakteriální kultury

- *Bifidobacterium animalis* CCM 4988<sup>T</sup>
- *Bifidobacterium bifidum* CCM 3762
- *Bifidobacterium breve* CCM 3763
- *Bifidobacterium infantis* CCM 17930
- *Bifidobacterium longum* CCM 4990
- *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833<sup>T</sup>
- *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825
- *Lactobacillus casei* CCM 7088<sup>T</sup>
- *Streptococcus thermophilus* CCM 4757

Výše uvedené mikroorganismy (získáno z České sbírky mikroorganismů, CCM, Brno, Česká republika)

## 4.12 Metody

### 4.12.1 Oživení bakterií čistých kultur

Lyofilizované kultury bakteriálních buněk, využitých jako pozitivní kontrola, byly rehydratované a naočkované se do tekutého MRS (de Man, Rogosa a Sharp) média cysteinem. Kultivace probíhala za aerobních podmínek 24 hodin při 37 °C. Poté byly přeočkovány do tekutého média (1 – 3% inokulace) a po kultivaci byla z buněk izolovaná DNA.

Následně byla provedena kontrola čistoty bakteriální kultury křížovým roztěrem na plotnu s MRS agarem. Kultivace byla provedena přes noc cca 16 hodin při 37 °C. Po kultivaci byla zkontrolována morfologie narostlých kolonií (vzhled, velikost, zbarvení, apod.)

### 4.12.2 Lyze buněk bakterií čistých kultur

Do Ependorfovy zkumavky byl nepipetován 1 ml buněčné kultury a následovala centrifugace 5 minut při 15 000 ot./min. Po centrifugaci byl supernatan opatrně vylit a sediment byl ponechán dostatečně okapat. Následovala resuspendace sedimentu v 1 ml lyzačního pufru I složeného z 10 mM Tris-HCl o pH 7,8 a 5 mM EDTA o pH 8,0. Resuspendace probíhala tak, že nejdříve bylo přidáno 100 µl pufru, který byl se sedimentem promíchán, a poté byl přidán zbytek 900 µl a suspenze opět promíchána. Tato směs se centrifugovala 5 minut při 15 000 ot./min. Supernatan byl vylit a k sedimentu přidáno 500 µl lyzačního pufru II, který navíc od lyzačního pufru I obsahuje 3 ml·l<sup>-1</sup> lysozymu. Takto připravené vzorky se za občasného míchání inkubovaly hodinu při laboratorní teplotě. Po uplynulé době bylo k suspenzi přidáno

a následně promícháno 12,5  $\mu\text{l}$  20% SDS a 5  $\mu\text{l}$  proteinasy K (100  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Opět byla provedená inkubace, tentokrát při 55  $^{\circ}\text{C}$ , po dobu asi 3 hodiny do projasnění vzorku.

Posledním krokem bylo přidání 10  $\mu\text{l}$  RNasy A (100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a směs se po promíchání inkubovala 30 minut při 37  $^{\circ}\text{C}$ . Vznikl hrubý lyzát, který byl do dalšího kroku uchováván při -20  $^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.12.3 Izolace bakteriální DNA čistých kultur – fenolová extrakce**

K 500  $\mu\text{l}$  hrubého lyzátu bakteriálních kultur v Eppendorfových zkumavkách bylo přidáno 500  $\mu\text{l}$  fenolu. Směs byla kývavým pohybem opatrně pomíchávána po dobu 4 minut. Následovala centrifugace při 15 000 ot./min. po dobu 5 minut. Do čisté Eppendorfovy zkumavky byla pomocí mikropipety opatrně odebrána horní vodní fáze obsahující DNA. Tato zkumavka byla doplněna TE pufrům na objem 500  $\mu\text{l}$  a bylo přidáno 700  $\mu\text{l}$  CIZ. Směs se kývavým pohybem promíchávala 4 minuty. Opět následovala centrifugace při stejných otáčkách i stejném čase. Následně bylo z horní fáze odebráno 400  $\mu\text{l}$  vodní fáze a bylo přidáno 20  $\mu\text{l}$  3 M octanu sodného. Po promíchání se do zkumavky přidal 1 ml 96% etanolu vychlazeného na -20  $^{\circ}\text{C}$  a zkumavka byla vložena na 20 min do mrazničky při -20  $^{\circ}\text{C}$  se ponechalo DNA vysrážet. Následovala centrifugace 15 000 ot./min. po dobu 15 minut. Opatrně byl slit supernatant a sediment ve zkumavce byl promyt 70 % ethanolem. Po následné centrifugaci při stejných otáčkách a čase 10 minut byl sediment vysušen v exsikátoru po dobu 15 minut. DNA bylo jako poslední krok rozpuštěno v 500  $\mu\text{l}$  TE pufru a pro další práci uchováváno při 4  $^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.12.4 Izolace bakteriální DNA ze vzorků – pomocí magnetických nosičů**

Byl navážen 1 g vzorku a rozpuštěn v 5 ml sterilní vody. Následovala centrifugace při nejvyšších otáčkách a potřebnou dobu k daným farmaceutickým preparátům. Supernatan byl slit a sediment pětkrát promyt 1 ml sterilní vody. Po poslední centrifugaci byl k sedimentu přidán 1 ml lyzačního roztoku a inkubace byla provedena po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Následně bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  20 % SDS a 5  $\mu\text{l}$  proteinasy K (1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Inkubace byla při 55  $^{\circ}\text{C}$  3 hodiny. Takto vzniklý hrubý lyzát byl uchováván k další práci při teplotě -20  $^{\circ}\text{C}$ .

Do nové Eppendorfovy zkumavky se připravila směs pro izolaci DNA z hrubých lyzátů pomocí magnetických částic P(HEMA-co-GMA).

**Tabulka 2: Složení PCR směsi**

<b>Krok</b>	<b>Složka</b>	<b>V [μl]</b>
1.	Sterilní voda	100
2.	NaCl (5 M)	200
3.	DNA (hrubý lyzát)	50
4.	PEG 6000 (40 %)	100
5.	Magnetický nosič (0,2 mg·ml <sup>-1</sup> )	50
<b>Celkem</b>		500

Všechny komponenty byly smíchány a inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 15 minut. Dále byly Eppendorfovy zkumavky vloženy do magnetického separátoru a opět při laboratorní teplotě ponechány 15 minut. Po této době byl opatrně odebrán ze zkumavek supernatan. Zkumavky byly vyndány z magnetického separátoru, přidalo se 500 μl 70 % ethanolu, zkumavky byly promíchány a opět vráceny do magnetického separátoru a po dvou minutách stání byl ethanol opatrně odebrán. V exsikátoru byl z otevřených zkumavek odpařený zbytkový ethanol. Posledním krokem byla 30 minutová eluce DNA z magnetických částic do 50 μl TE pufru a nakonec odseparování magnetických částic na magnetickém separátoru.

#### **4.12.5 Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace izolovaných DNA**

Na spektrofotometrickém přístroji NanoPhotometr byla proměřena čistota izolované DNA jak z čistých kultur používaných jako pozitivní kontrola, tak i DNA izolovaná z probiotických preparátů.

Prvním krokem bylo nastavení spektrofotometru na požadované měření, a to nukleových kyselin ds DNA/ss DNA. Měření bylo nejdříve vynulováno na TE pufr který byl využit pro uchování izolovaných DNA. Následovala volba vhodného LID víčka v závislosti na předpokládané koncentraci izolované DNA. Volba byla provedena dle Tabulky 3.

**Tabulka 3: Výběr víčka LID**

<b>Víčko</b>	<b>LID 5</b>	<b>LID 10</b>	<b>LID 50</b>	<b>LID 100</b>
<b>Optická dráha [nm]</b>	2	1	0,2	0,1
<b>Objem vzorku [<math>\mu</math>l]</b>	6 – 10	3 – 5	0,7 – 4	0,7 – 3
<b>Měřitelný rozsah DNA [<math>\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}</math>]</b>	7 – 350	14 – 700	250 – 4000	500 - 8000

Koncentrace a hodnoty absorbancí byly změřeny podle přiloženého návodu, zaznamenávány, a výsledky použity pro volbu množství použité pro provedení PCR.

#### **4.12.6 Ampifikace izolované DNA**

Podle níže uvedených programů byla provedena PCR pro bakterie vyskytující se dle deklarace výrobce v probiotických preparátech a pro čisté kultury jako pozitivní vzorek.

Pro všechny směsi PCR byl připravován mastermix násobený počtem potřebného množství. Směs vždy obsahovala násobky daných komponent – Tabulka 4.

**Tabulka 4: složení směsi mastermix pro PCR**

<b>Komponenta</b>	<b>Objem [<math>\mu</math>l]</b>
<b>Voda pro PCR</b>	19,0
<b>Reakční pufr kompletní (10x koncentrovaný)</b>	2,5
<b>Směs dNTP [10 mM]</b>	0,5
<b>Primer 1 [<math>10\text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}</math>]</b>	0,5
<b>Primer 2 [<math>10\text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}</math>]</b>	0,5
<b>Taq DNA polymerasa [<math>1\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}</math>]</b>	1,0
<b>Celkem</b>	24,0

Do Eppendorfových zkumavek byl mastermix rozplňován po 24  $\mu$ l a naposledy byl přidáván 1  $\mu$ l matrice dané DNA upravená na koncentraci 10  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ . Pokud byla koncentrace DNA nižší, matrice DNA se neupravovala. Před vložením do termocykleru se Eppendorfovy zkumavky lehce centrifugovaly, aby nedošlo ke ztrátám v důsledku ulpívání mikrokapiček na stěnách zkumavky.

#### 4.12.6.1 PCR specifická pro rod *Lactobacillus*

Byly použity specifické primery: (27)

- LbLMA 1-rev            5' CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC 3'
- R16-1                    5' CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA 3'

Velikost produktu PCR 250 bp PCR specifická pro rod *Lactobacillus* proběhla v 30 cyklech. První cyklus zahřívání na teplotu 94 °C byl prodloužen na dobu 5 minut; poslední krok zahřívání na 72 °C byl prodloužen na 7 minut.

Nastavený program je uveden v Tabulce 5.

**Tabulka 5: program pro rod *Lactobacillus***

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]
Denaturace DNA	94	60
Hybridizace primerů	55	60
Syntéza řetězce DNA	72	120

#### 4.12.6.2 PCR specifická pro rod *Bifidobacterium*

Byly použity specifické primery: (28)

- Pbi F1                    5' CCG GAA TAG CTC 3'
- Pbi R2                    5' GAC VAT GCA CCA CCT GTG A 3'

Velikost produktu PCR byla 914 bp. PCR specifická pro rod *Bifidobacterium* proběhla v 30 cyklech. První cyklus zahřívání na teplotu 94 °C byl prodloužen na dobu 5 minut; poslední krok zahřívání na 72 °C byl prodloužen na 10 minut.

Nastavený program je uveden v Tabulce 6.

**Tabulka 6: program pro rod *Bifidobacterium***

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]
Denaturace DNA	94	60
Hybridizace primerů	50	60
Syntéza řetězce DNA	72	120

#### 4.12.6.3 PCR specifická pro druh *Bifidobacterium animalis*

Byly použity specifické primery: (29)

- Pbi F1                    5' GCA CCA CCT GTG AAC CG 3'
- Ban F2                    5' AAC CTG CCC TGT 3'

Velikost produktu PCR byla 925 bp. PCR specifická pro rod *Bifidobacterium animalis* proběhla v 35 cyklech. První cyklus zahřívání na teplotu 94 °C byl prodloužen na dobu 5 minut; poslední krok zahřívání na 72 °C byl prodloužen na 5 minut.

Nastavený program je uveden v Tabulce 7.

**Tabulka 7: program pro druh *Bifidobacterium animalis***

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]
Denaturace DNA	94	30
Hybridizace primerů	55	30
Syntéza řetězce DNA	72	60

#### 4.12.6.4 PCR specifická pro druh *Bifidobacterium bifidum*

Byly použity specifické primery: (30)

- BiBIF -1                    5' CCA CAT GAT CGC ATG TGA TT 3'
- BiBIF-2                    5' CCG AAG GCT TGC TCC CAA 3'

Velikost produktu PCR byla 278 bp. PCR specifická pro druh *Bifidobacterium bifidum* proběhla v 35 cyklech. První cyklus zahřívání na teplotu 94 °C byl prodloužen na dobu 5 minut; poslední krok zahřívání na 72 °C byl prodloužen na 5 minut.

Nastavený program je uveden v Tabulce 8.

**Tabulka 8: program pro druh *Bifidobacterium bifidum***

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]
Denaturace DNA	94	20
Hybridizace primerů	55	20
Syntéza řetězce DNA	72	30

#### 4.12.6.5 PCR specifická pro druh *Bifidobacterium breve*

Byly použity specifické primery: (31)

- BiBRE -1                    5' CCA GAT GCT CCA TCA CA 3'
- BiBRE-2                    5' ACA AAG TGC CTT GCT CCC 3'

Velikost produktu PCR byla 288 bp. PCR specifická pro druh *Bifidobacterium breve* proběhla v 35 cyklech. První cyklus zahřívání na teplotu 94 °C byl prodloužen na dobu 5 minut; poslední krok zahřívání na 72 °C byl prodloužen na 5 minut.

Nastavený program je uveden v Tabulce 9.

**Tabulka 9: program pro druh *Bifidobacterium breve***

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]
Denaturace DNA	94	20
Hybridizace primerů	55	20
Syntéza řetězce DNA	72	30

#### 4.12.6.6 PCR specifická pro druh *Bifidobacterium longum ssp. infantis*

Byly použity specifické primery: (30)

- BiINF -1                    5' TTC CAG TTG ATC GCA TGG T 3'
- BiINF-2                    5' GGA AAC AAA ATC TCT GGG AT 3'

Velikost produktu PCR byla 828 bp. PCR specifická pro druh *Bifidobacterium longum ssp. infantis* proběhla v 35 cyklech. První cyklus zahřívání na teplotu 94 °C byl prodloužen na dobu 5 minut; poslední krok zahřívání na 72 °C byl prodloužen na 5 minut.

Nastavený program je uveden v Tabulce 10.

**Tabulka 10: program pro druh *Bifidobacterium longum ssp. infantis***

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]
Denaturace DNA	94	20
Hybridizace primerů	55	20
Syntéza řetězce DNA	72	30



#### 4.12.6.7 PCR specifická pro druh *Bifidobacterium longum* ssp. *longum*

Byly použity specifické primery: (30)

- BiLON -1                    5' TTC CAG TTG ATC GCA TGG TC 3'
- BiLON-2                    5' CGA AGG CTT GCT CCC AG 3'

Velikost produktu PCR byla 831 bp. PCR specifická pro druh *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* proběhla v 35 cyklech. První cyklus zahřívání na teplotu 94 °C byl prodloužen na dobu 5 minut; poslední krok zahřívání na 72 °C byl prodloužen na 5 minut.

Nastavený program je uveden v Tabulce 11.

**Tabulka 11: program pro druh *Bifidobacterium longum* ssp. *longum***

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]
Denaturace DNA	94	20
Hybridizace primerů	55	20
Syntéza řetězce DNA	72	30

#### 4.12.6.8 PCR specifická pro druh *Lactobacillus acidophilus*

Byly použity specifické primery: (32)

- Aci16SI                    5' AGC TGA ACC CCA AGA TTC AC 3'
- 16SII                    5' ACT ACC AGC GTA TCT AAT CC 3'

Velikost produktu PCR byla 800 bp. PCR specifická pro druh *Lactobacillus acidophilus* proběhla v nastavených 30 cyklech. První cyklus zahřívání na teplotu 94 °C bylo prodlouženo na dobu 5 minut; poslední krok zahřívání na 72 °C byl prodloužen na 5 minut.

Nastavený program ukazuje Tabulka 12.

**Tabulka 12: program pro druh *Lactobacillus acidophilus***

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]
Denaturace DNA	94	30
Hybridizace primerů	58	30
Syntéza řetězce DNA	72	60

#### 4.12.6.9 PCR specifická pro druh *Lactobacillus rhamnosus*

Byly použity specifické primery: (32)

- PrI                            5' CAG ACT GAA AGT CTG ACG G 3'
- RhaII                        5' GCC ATG CGA ATT TCT ATT ATT 3'

Velikost produktu PCR byla 410 a 200 bp. Druhově specifická PCR pro *Lactobacillus rhamnosus* proběhla v 30 cyklech. První cyklus zahřívání na teplotu 94 °C byl prodloužen na dobu 5 minut; poslední krok zahřívání na 72 °C byl prodloužen na 5 minut.

Nastavený program je uveden v Tabulce 13.

**Tabulka 13: program pro druh *Lactobacillus rhamnosus***

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]
Denaturace DNA	94	30
Hybridizace primerů	58	30
Syntéza řetězce DNA	72	60

#### 4.12.6.10 PCR specifická pro druh *Lactobacillus casei*

Byly použity specifické primery: (32)

- PrI                            5' CAG ACT GAA AGT CTG ACG G3'
- CasII                        5' GCG ATG CGA ATT TCT TTT TC3'

Velikost produktu PCR byla 400 a 200 bp. Druhově specifická PCR pro *Lactobacillus casei* proběhla v 30 cyklech. První cyklus zahřívání na teplotu 94 °C byl prodloužen na dobu 5 minut; poslední krok, zahřívání na 72 °C byl prodloužen na 5 minut.

Nastavený program je uveden v Tabulce 14.

**Tabulka 14: program pro druh rodu *Lactobacillu s casei***

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]
Denaturace DNA	94	30
Hybridizace primerů	55	30
Syntéza řetězce DNA	72	60

#### 4.12.6.11 PCR specifická pro druh *Streptococcus thermophilus*

Byly použity specifické primery: (33)

- S.therm-1                    5' CAC TAT GCT CAG AAT ACA 3'
- S.therm-2                    5' CGA ACA GCA TTG ATG TTA 3'

Velikost produktu PCR byla 968 bp. Nastavený program je uveden v Tabulce 15.

**Tabulka 15: program rodu *Streptococcus thermophilus***

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]
Denaturace DNA	95	60
Hybridizace primerů	58	60
Syntéza řetězce DNA	72	60

#### 4.12.7 Agarosová gelová elektroforéza

Pro detekci PCR produktu byl připraven 1,8 % agarosový gel, a to tak, že se navážka 1,8 g agarózy rozpustila ve 100 ml 0,5x koncentrovaného TBE. Za občasného míchání byla směs rozvařena v mikrovlnné troubě. Mezitím, co byl gel ochlazen přibližně na teplotu 60 °C, byla připravena vanička s hřebínkem a umístěna na vodorovné podložce. Do ní byl nalit gel, který se nechal půl hodiny chladnout (tuhnout). Po dostatečném ztuhnutí byl opatrně vyjmut hřebínek.

Do nachystaných mikrozkupek s 25 µl produktu PCR bylo přidáno 5 µl nanášecího pufru. Všechny objemy vzniklé směsi byly naneseny do komůrek gelu. Kromě vzorků s PCR produkty byl na gel také nanesen DNA standard s žebříčkem 100 bp (100 – 1500 bp), pozitivní a negativní kontrola.

Takto připravený gel byl vložen do elektroforetické vany tak, aby DNA migrovala od katody k anodě. Na gel ve vaně byl nalit 0,5x koncentrovaný TBE pufr, aby byl gel dostatečně převrstven. Elektroforéza byla následně spuštěna. Zdroj napětí byl nastaven na 80 voltů.

Asi po dvou hodinách průběhu elektroforézy se zdroj napětí vypnul a migrace se zastavila. Nanášecí pufr dosahoval přibližně do 2/3 agarosového gelu.

Detekce byla provedena obarvením gelu v lázni s roztokem ethidiumbromidem ( $0,5\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) zhruba po dobu 30 až 45 minut. Po dostatečném čase barvení byl gel opláchnut ve vodě a prohlédnut pod UV transiluminátorem (vlnová délka 305nm). Gely byly vyfotografovány.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Izolace DNA z čistých kmenů jako pozitivní kontrola

Podle kapitoly 4.12.1 byly připraveny bakterie čistých kultur z kmenů *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis*, *Bifidobacterium longum* ssp. *longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* a *Streptococcus thermophilus*, ze kterých byla pomocí fenolové extrakce dle kapitoly 4.12.3 izolována DNA v kvalitě a množství použitelné pro PCR.

Kvalita a množství DNA byly stanoveny spektrofotometricky (viz Tabulka 16).

**Tabulka 16: hodnoty koncentrace a čistoty bakteriálních kmenů**

Bakteriální kmen		c [ng·μl <sup>-1</sup> ]	A <sub>230nm</sub>	A <sub>260nm</sub>	A <sub>nm</sub>	A <sub>320nm</sub>	A <sub>260nm/280nm</sub>
<i>Bifidobacterium animalis</i>	CCM 4988 <sup>T</sup>	56,50	0,01	0,09	0,04	0,00	2,13
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	CCM 3762	93,00	0,02	0,17	0,07	0,00	2,14
<i>Bifidobacterim breve</i>	CCM 3763	91,00	0,01	0,16	0,07	0,00	2,09
<i>Bifidobacterium infantis</i>	CCM 17930	63,50	0,00	0,11	0,05	0,00	2,08
<i>Bifidobacterium longum</i>	CCM 4990	210,00	0,14	0,41	0,19	0,00	2,11
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CCM 48335	107,00	0,03	0,19	0,08	0,00	2,17
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CCM 1825	63,50	0,00	0,11	0,05	0,00	2,08
<i>Lactobacillus casei</i>	CCM 7088 <sup>T</sup>	75,00	0,01	0,13	0,05	0,00	2,21
<i>Streptococcus thermophilus</i>	CCM 4757	134,50	0,00	0,14	0,09	0,00	2,00

DNA byla izolovaná v dostatečné koncentraci k použití pro PCR jako kontrolní kmeny. Koncentrace se pohybovaly v rozmezí 56,50- 210,00 ng·μl<sup>-1</sup>.

## 5.2 Izolace DNA z vybraných probiotických preparátů

Podle kapitoly 4.12.4 byla ze vzorků Normospektrum, Apo-baby probio, Biopron junior, Biopron laktobacilky, Linex baby a Laktobacilky izolována DNA pomocí magnetických mikročastic. Izolace u každého vzorku byla provedena vždy pětkrát s identickým postupem.

### 5.2.1 Vzorek A – Normospektrum

V Tabulce 17 jsou uvedeny hodnoty absorbancí DNA izolovaných ze vzorku Normospektrum.

**Tabulka 17: spektrofotometrické stanovení vzorku Normospektrum**

	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>	<b>A4</b>	<b>A5</b>
<b>Koncentrace/ Absorbance</b>					
<b>c [ng/μl]</b>	1,00	1,35	5,25	6,25	5,25
<b>A<sub>230nm</sub></b>	0,01	0,03	0,03	0,05	0,04
<b>A<sub>260nm</sub></b>	0,01	0,01	0,01	0,03	0,02
<b>A<sub>280nm</sub></b>	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02
<b>A<sub>320nm</sub></b>	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00

I když byl postup izolace u pěti pokusů identický, hodnoty koncentrací DNA se vzhledem k velmi nízkým hodnotám absorbancí lišily. DNA byla však izolována v dostatečném množství pro PCR.

Pro PCR stanovení byla vybrána DNA ze vzorku A4.

### 5.2.2 Vzorek B –Apo-Baby Probio

Tabulka 18 ukazuje hodnoty izolovaných DNA ze vzorků Apo-Baby Probio

**Tabulka 18: spektrofotometrické stanovení vzorku Apo-Baby Probio**

	<b>B1</b>	<b>B2</b>	<b>B3</b>	<b>B4</b>	<b>B5</b>
<b>Koncentrace/ Absorbance</b>					
<b>c [ng/μl]</b>	17,30	11,50	11,50	9,00	9,25
<b>A<sub>230nm</sub></b>	0,06	0,04	0,06	0,04	0,04
<b>A<sub>260nm</sub></b>	0,07	0,05	0,05	0,04	0,04
<b>A<sub>280nm</sub></b>	0,04	0,01	0,03	0,03	0,03
<b>A<sub>320nm</sub></b>	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01

Kromě vzorku B2 se podařilo DNA izolovat i ve velmi dobré čistotě, pro PCR stanovení byla vybrána DNA ze vzorku B3.

### 5.2.3 Vzorek C – Biopron Junior

Tabulka 19 ukazuje hodnoty izolovaných DNA ze vzorku Biopron Junior.

**Tabulka 19: spektrofotometrické stanovení vzorku Biopron Junior**

	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>	<b>C5</b>
<b>Koncentrace/ Absorbance</b>					
<b>c [ng/μl]</b>	4,25	12,30	2,12	2,75	1,00
<b>A<sub>230nm</sub></b>	0,03	0,07	0,01	0,02	0,00
<b>A<sub>260nm</sub></b>	0,02	0,05	0,01	0,01	0,00
<b>A<sub>280nm</sub></b>	0,02	0,04	0,01	0,01	0,00
<b>A<sub>320nm</sub></b>	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00

I přes stejný postup izolace se rozdílly množství velice lišily. Vzhledem k relativně čisté DNA pro PCR byl vybrán vzorek C2.

#### 5.2.4 Vzorek D – Biopron Laktobacily

Tabulka 20 ukazuje hodnoty izolovaných DNA ze vzorku Biopron Laktobacily.

**Tabulka 20: spektrofotometrické stanovení vzorku Biopron Laktobacily**

	<b>D1</b>	<b>D2</b>	<b>D3</b>	<b>D4</b>	<b>D5</b>
<b>Koncentrace/ Absorbance</b>					
<b>c [ng/μl]</b>	26,80	23,50	21,50	21,80	27,30
<b>A<sub>230nm</sub></b>	0,22	0,20	0,18	0,19	0,27
<b>A<sub>260nm</sub></b>	0,17	0,14	0,13	0,14	0,17
<b>A<sub>280nm</sub></b>	0,13	0,11	0,11	0,11	0,13
<b>A<sub>320nm</sub></b>	0,06	0,05	0,05	0,05	0,066

I když čistota vyizolované DNA nebyla moc kvalitní, její množství bylo docela vysoké. Pro PCR byl zvolen vzorek D3.

#### 5.2.5 Vzorek E – Linex Baby

Tabulka 21 ukazuje hodnoty izolovaných DNA ze vzorku Linex Baby.

**Tabulka 21: spektrofotometrické stanovení vzorku Linex Baby**

	<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>E3</b>	<b>E4</b>	<b>E5</b>
<b>Koncentrace/ Absorbance</b>					
<b>c [ng/μl]</b>	6,00	1,05	1,00	2,50	6,50
<b>A<sub>230nm</sub></b>	0,08	0,00	0,01	0,05	0,10
<b>A<sub>260nm</sub></b>	0,02	0,00	0,00	0,01	0,02
<b>A<sub>280nm</sub></b>	0,03	0,00	0,00	0,02	0,03
<b>A<sub>320nm</sub></b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

S tímto vzorkem se obecně nejhůře pracovalo. Tomu by se dali přisoudit i nižší izolované koncentrace a jejich rozdíly. Pro PCR byl vybrán vzorek E5.

### 5.2.6 Vzorek F – Laktobacílky

Tabulka 22 ukazuje hodnoty izolovaných DNA ze vzorku Laktobacílky.

**Tabulka 22: spektrofotometrické stanovení vzorku Laktobacílky**

	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>	<b>F4</b>	<b>F5</b>
<b>Koncentrace/ Absorbance</b>					
<b>c [ng/μl]</b>	63,50	53,50	56,00	62,00	84,40
<b>A<sub>230nm</sub></b>	0,62	0,34	0,48	0,57	0,88
<b>A<sub>260nm</sub></b>	0,35	0,22	0,30	0,34	0,48
<b>A<sub>280nm</sub></b>	0,28	0,23	0,23	0,27	0,39
<b>A<sub>320nm</sub></b>	0,09	0,07	0,07	0,09	0,14

Množství DNA izolované z tohoto vzorku bylo nejvyšší v porovnání s ostatními. Pro PCR byl vybrán vzorek F2.

### 5.3 Identifikace bakterií z izolovaných DNA

Podle kapitoly 4.12.6 byla připravena směs mastermix pro PCR. Vzorky v koncentraci vyšší než přibližně 10 ng·μl<sup>-1</sup> byly upraveny ředěním do požadované koncentrace. Vzorky o koncentraci nižší než 10 ng·μl<sup>-1</sup> byly použity tak, jak byly izolovány.

Pro každý rod a následný druh bakterií byl použit program odpovídající požadavkům dle kapitol 4.12.6.1 až 4.12.6.11

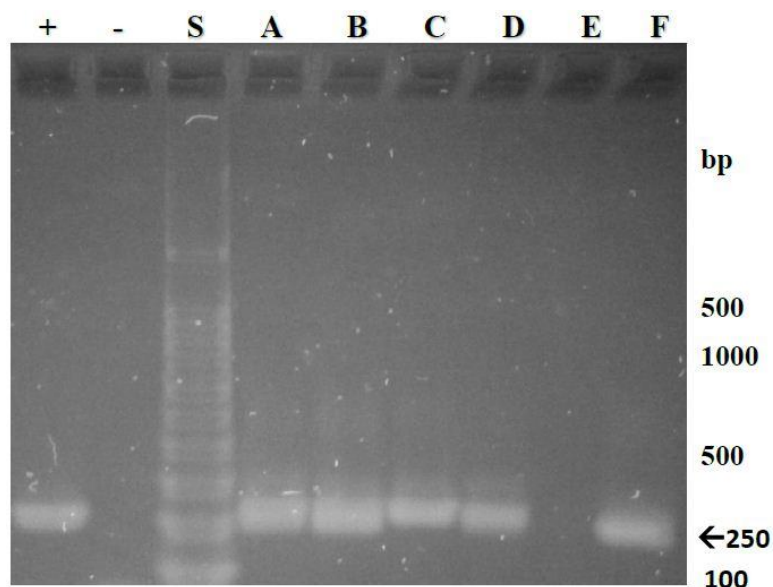
Po provedení PCR byla amplifikovaná DNA separována pomocí agarosové gelové elektroforézy podle kapitoly 4.12.7. Velikost ampliconů byla poté použita k identifikaci mikroorganismů.

Fotografie gelů jsou uvedeny v kapitolách 5.3.1 až 5.3.11 Vybrané bakterie byly zkoušeny podle složení, které uvádí výrobce.



### 5.3.1 PCR s primery specifickými pro rod *Lactobacillus*

Výsledky agarosové gelové elektroforézy amplikonů specifických pro rod *Lactobacillus* jsou uvedeny na Obrázku 9.



Obrázek 9: agarosová gelová elektroforéza amplikonů specifických pro rod *Lactobacillus*

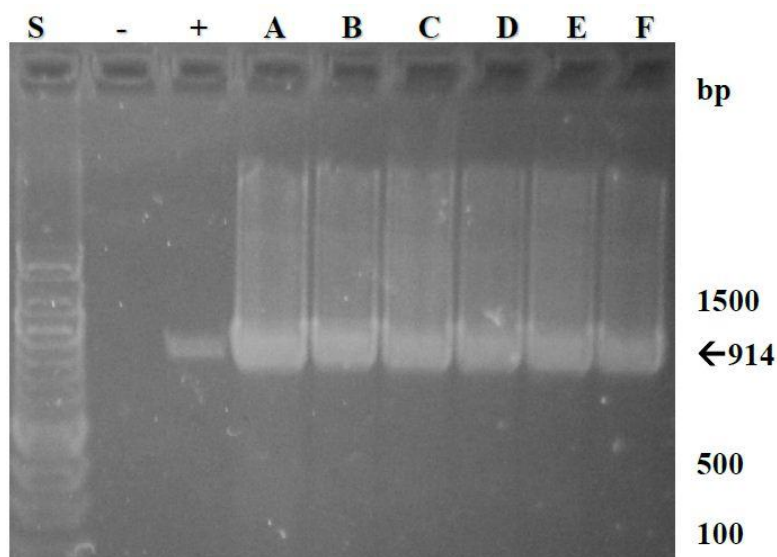
Běh	DNA	Detekce produktu
+	Pozitivní kontrola	++
-	Negativní kontrola	-
S	Standard DNA	100 bp žebříček
A	Normospektrum	++
B	Apo-Baby Probio	++
C	Biopron Junior	++
D	Biopron Laktobacily	++
E	Linex Baby	-
F	Laktobacílky	++

Produkty PCR specifické pro rod *Lactobacillus* o velikosti 250 bp byly detegovány ve stejné intenzitě.

Specifický amplikon byl získán u pěti ze šesti probiotických preparátů. Izolovaná a identifikovaná DNA odpovídá parametrům, které uvádí výrobci preparátů.

### 5.3.2 PCR s primery specifickými pro rod *Bifidobacterium*

Výsledky agarosové gelové elektroforézy ampliconů specifických pro rod *Bifidobacterium* jsou uvedeny na Obrázku 10.



Obrázek 10: agarosová gelová elektroforéza ampliconů specifických pro rod *Bifidobacterium*

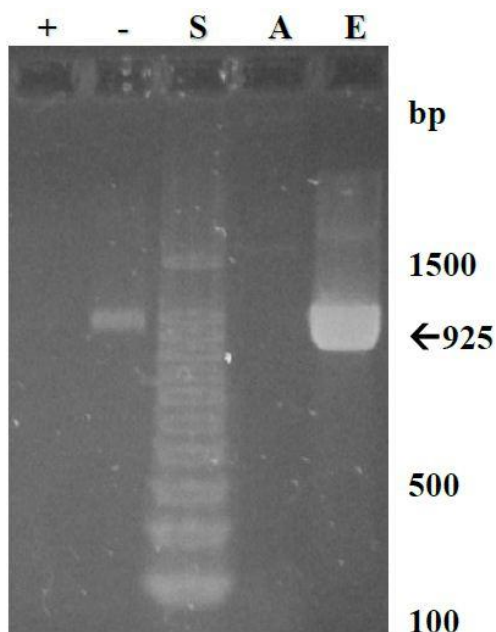
Běh	DNA	Detekce produktu
S	Standard DNA	100 bp žebříček
-	Negativní kontrola	-
+	Pozitivní kontrola	+
A	Normospektrum	++
B	Apo-Baby Probio	++
C	Biopron Junior	++
D	Biopron Laktobacily	++
E	Linex Baby	++
F	Laktobacílky	++

Produkty PCR specifické pro rod *Bifidobacterium* o velikosti 914 bp byly detegovány přibližně ve stejné intenzitě. Slabší byla detekce pozitivní kontroly.

U všech stanovovaných vzorků byla potvrzena přítomnost bifidobakterií. Izolovaná a identifikovaná DNA odpovídá parametrům, které uvádí výrobci preparátů.

### 5.3.3 PCR s primery specifickými pro druh *Bifidobacterium animalis*

Výsledky agarosové gelové elektroforézy ampliconů specifických pro druh *Bifidobacterium animalis* jsou uvedeny na Obrázku 11.



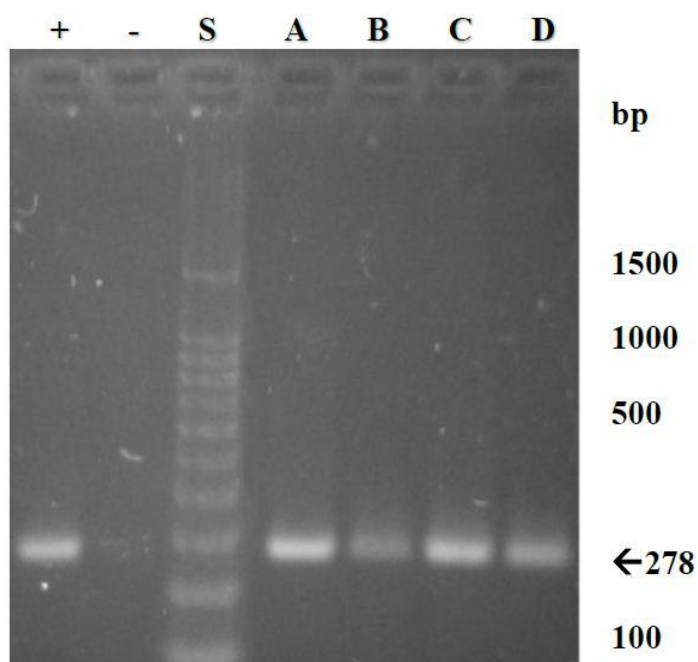
**Obrázek 11:** agarosová gelová elektroforéza ampliconů specifických pro druh *Bifidobacterium animalis*

Běh	DNA	Detekce produktu
+	Pozitivní kontrola	+
-	Negativní kontrola	-
S	Standard DNA	100 bp žebříček
A	Normospektrum	-
E	Linex Baby	+++

Produkt PCR specifický pro druh *Bifidobacterium animalis* o velikosti 925 bp byl detegován u vzorku Linex Baby. U vzorku Normospektrum nebyla přítomnost uvedeného mikroorganismu potvrzena. Izolovaná a identifikovaná DNA odpovídá parametrům, které uvádí výrobci preparátů.

### 5.3.4 PCR s primery specifickými pro druh *Bifidobacterium bifidum*

Výsledky agarosové gelové elektroforézy amplikonů specifických pro druh *Bifidobacterium bifidum* jsou uvedeny na Obrázku 12.



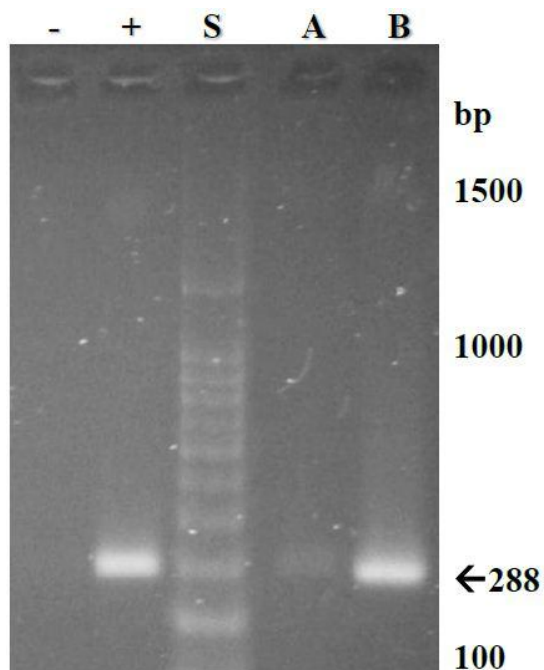
Obrázek 12: agarosová gelová elektroforéza amplikonů specifických pro druh *Bifidobacterium bifidum*

Běh	DNA	Detekce produktu
+	Pozitivní kontrola	+
-	Negativní kontrola	-
S	Standard DNA	100 bp žebříček
A	Normospektrum	+
B	Apo-Baby Probio	+
C	Biopron Junior	+
D	Biopron Laktobacily	+

Produkty PCR specifické pro druh *Bifidobacterium bifidum* o velikosti 278 bp byly detegovány ve stejné intenzitě. Slabší produkt byl detegován u vzorku Apo-Baby Probio. U všech stanovovaných vzorků byla potvrzena přítomnost cílového mikroorganismu. Izolovaná a identifikovaná DNA odpovídá parametrům, které uvádí výrobci preparátů.

### 5.3.5 PCR s primery pro druh *Bifidobacterium breve*

Výsledky agarosové gelové elektroforézy amplikonů specifických pro druh *Bifidobacterium breve* jsou uvedeny na Obrázku 13.



Obrázek 13: agarosová gelová elektroforéza amplikonů specifických pro druh *Bifidobacterium breve*

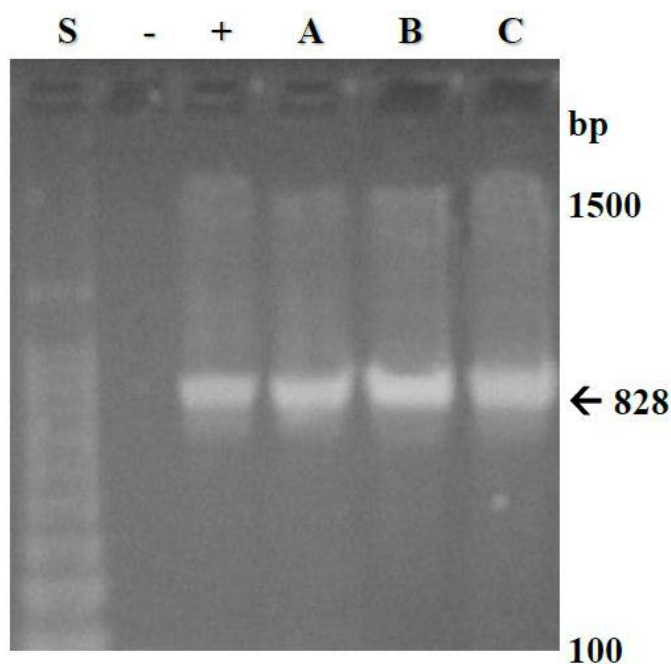
Běh	DNA	Detekce produktu
-	Negativní kontrola	-
+	Pozitivní kontrola	++
S	Standard DNA	100 bp žebříček
A	Normospektrum	+
B	Apo-Baby Probio	++

Produkty PCR specifické pro druh *Bifidobacterium breve* o velikosti 288 bp byly detegovány v rozdílných intenzitách. Slabý amplikon byl detegován u vzorku Normospektrum.

U všech stanovovaných vzorků byla potvrzena přítomnost cílového mikroorganismu. Izolovaná a identifikovaná DNA odpovídá parametrům, které uvádí výrobci preparátů.

### 5.3.6 PCR s primery specifickými pro druh *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis*

Výsledky agarosové gelové elektroforézy ampliconů specifických pro druh *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis* jsou uvedeny na Obrázku 14.



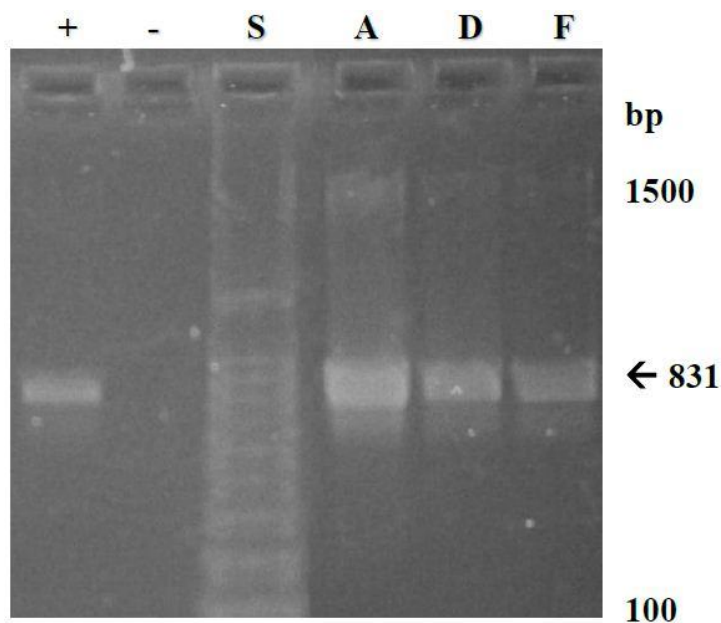
Obrázek 14: agarosová gelová elektroforéza s primery specifickými pro druh *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis*

Běh	DNA	Detekce produktu
S	Standard DNA	100 bp žebříček
-	Negativní kontrola	-
+	Pozitivní kontrola	+
A	Normospektrum	+
B	Apo-Baby Probio	+
C	Biopron Junior	+

Produkty PCR specifické pro druh *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis* o velikosti 828 bp byly detegovány ve stejné intenzitě. U všech stanovovaných vzorků byla potvrzena přítomnost cílového mikroorganismu. Izolovaná a identifikovaná DNA odpovídá parametrům, které uvádí výrobci preparátů.

### 5.3.7 PCR s primery pro druh *Bifidobacterium longum* ssp. *longum*

Výsledky agarosové gelové elektroforézy amplikonů specifických pro druh *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* jsou uvedeny na Obrázku 15.



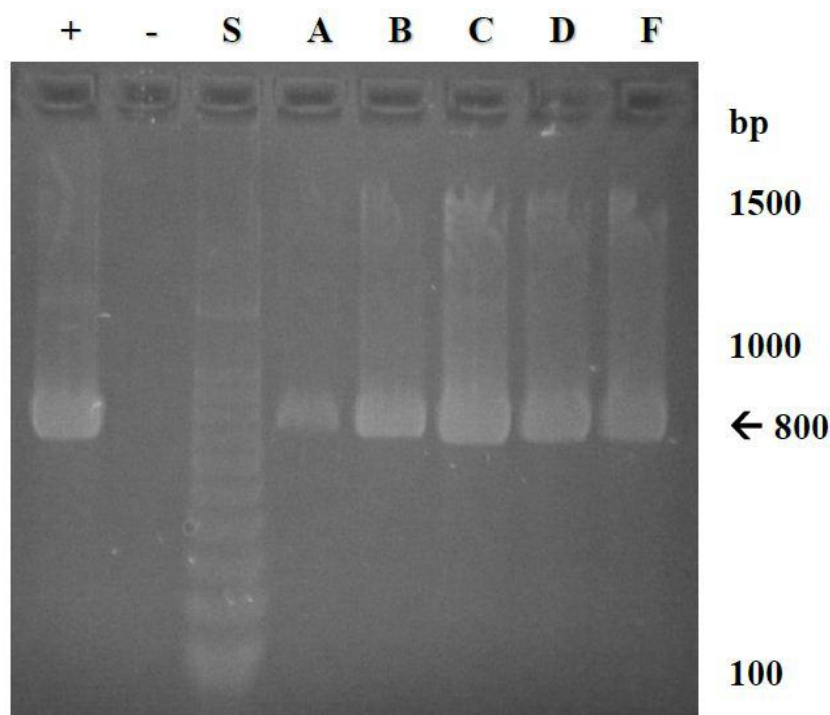
Obrázek 15: agarosová gelová elektroforéza s primery specifickými pro druh *Bifidobacterium longum* ssp. *longum*

Běh	DNA	Detekce produktu
+	Pozitivní kontrola	+
-	Negativní kontrola	-
S	Standard DNA	100 bp žebříček
A	Normospektrum	++
D	Biopron Laktobacily	+
F	Laktobacilky	+

Produkty PCR s primery specifickými pro druh *Bifidobacterium longum* ssp. *longum*, o velikosti 831 bp byly detegovány ve stejné intenzitě. U vzorku Normospektrum byla detekce o něco silnější. U všech stanovovaných vzorků byla potvrzena přítomnost cílového mikroorganismu. Izolovaná a identifikovaná DNA odpovídá parametrům, které uvádí výrobci preparátů.

### 5.3.8 PCR s primery specifickými pro druh *Lactobacillus acidophilus*

Výsledky agarosové gelové elektroforézy amplikonů specifických pro druh *Lactobacillus acidophilus* jsou uvedeny na Obrázku 16.



Obrázek 16: agarosová gelová elektroforéza s primery specifickými pro druh *Lactobacillus acidophilus*

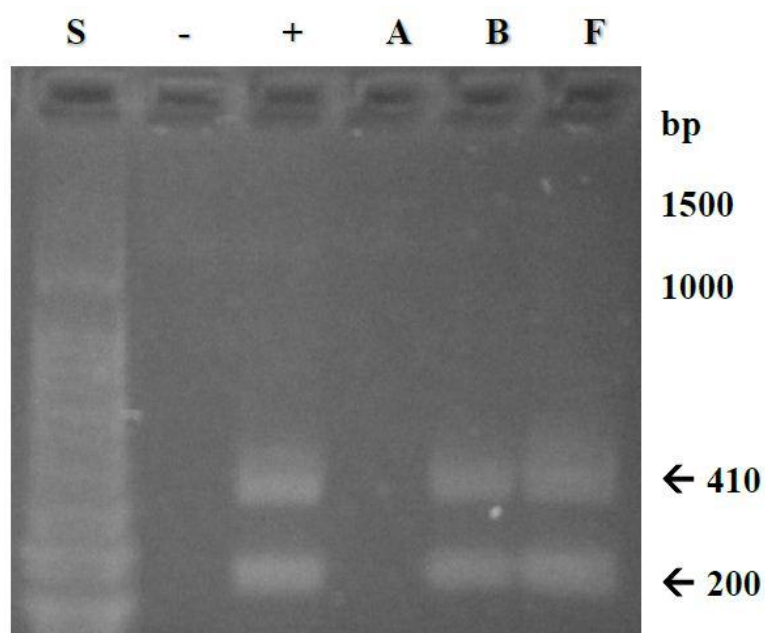
Běh	DNA	Detekce produktu
+	Pozitivní kontrola	++
-	Negativní kontrola	-
S	Standard DNA	100 bp žebříček
A	Normospektrum	+
B	Apo-Baby Probio	++
C	Biopron Junior	++
D	Biopron Laktobacily	++
F	Laktobacílky	++

Produkty PCR specifické pro druh *Lactobacillus acidophilus* o velikosti 800 bp byly detegovány ve stejné intenzitě. U vzorku Normospektrum byl detegován méně výrazný amplikon. U všech stanovovaných vzorků byla potvrzena přítomnost cílového mikroorganismu. Izolovaná a identifikovaná DNA odpovídá parametrům, které uvádí výrobci preparátů.



### 5.3.9 PCR s primery specifickými pro druh *Lactobacillus rhamnosus*

Výsledky agarosové gelové elektroforézy ampliconů specifických pro druh *Lactobacillus rhamnosus* jsou uvedeny na Obrázku 17.



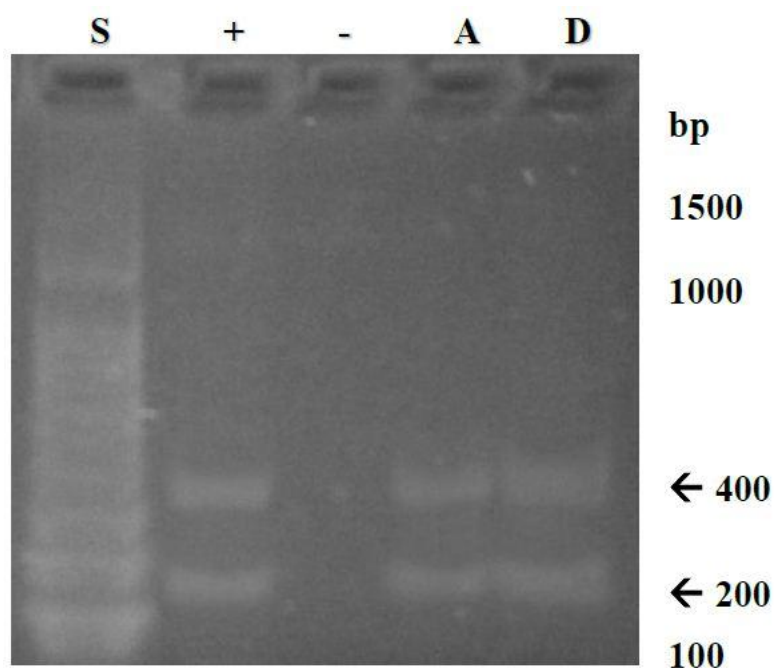
Obrázek 17: agarosová gelová elektroforéza s primery specifickými pro druh *Lactobacillus rhamnosus*

Běh	DNA	Detekce produktu
S	Standard DNA	100 bp žebříček
-	Negativní kontrola	-
+	Pozitivní kontrola	++
A	Normospektrum	-
B	Apo-Baby Probio	++
F	Laktobacílky	++

Produkty PCR specifické pro druh *Lactobacillus rhamnosus* o velikosti 410 a 200 bp byly detegovány u výrobků Apo-Baby Probio a Laktobacílky. Ve výrobku Normospektrum nebyla přítomnost tohoto mikroorganismu potvrzena. Izolovaná a identifikovaná DNA odpovídá parametrům, které uvádí výrobci preparátů.

### 5.3.10 PCR s primery specifickými pro druh *Lactobacillus casei*

Výsledky agarosové gelové elektroforézy amplikonů specifických pro druh *Lactobacillus casei* jsou uvedeny na Obrázku 18.



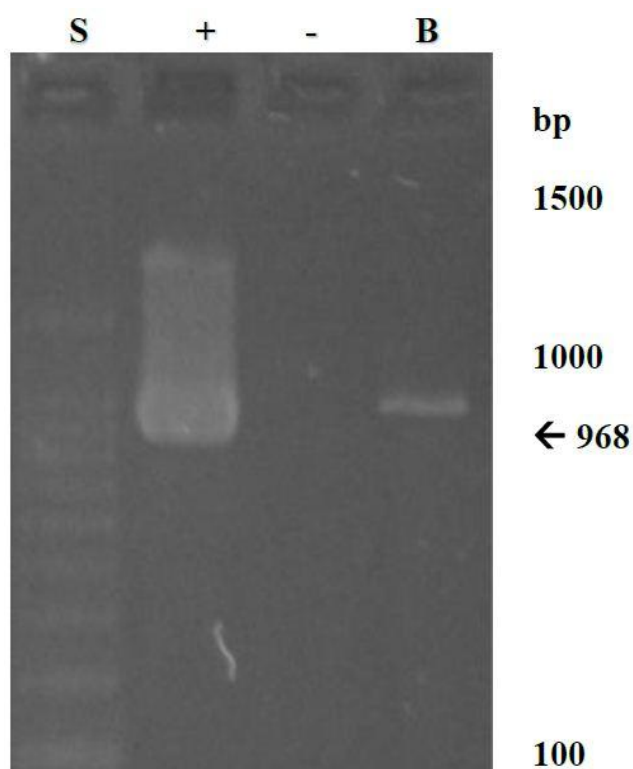
Obrázek 18: agarosová gelová elektroforéza s primery specifickými pro druh *Lactobacillus casei*

Běh	DNA	Detekce produktu
S	Standard DNA	100 bp žebříček
+	Pozitivní kontrola	++
-	Negativní kontrola	-
A	Normospektrum	++
D	Biopron Laktobacily	++

Produkty PCR pro poddruh *Lactobacillus casei* o velikosti 400 a 200 bp byly detegovány a ve stejné intenzitě. U všech stanovovaných vzorků byla potvrzena přítomnost cílového mikroorganismu. Izolovaná a identifikovaná DNA odpovídá parametrům, které uvádí výrobci preparátů.

### 5.3.11 PCR s primery specifickými pro druh *Streptococcus thermophilus*

Výsledky agarosové gelové elektroforézy amplikonů specifických pro druh *Streptococcus thermophilus* jsou uvedeny na Obrázku 19.



Obrázek 19: agarosová gelová elektroforéza s primery specifickými pro druh *Streptococcus thermophilus*

Běh	DNA	Detekce produktu
S	Standard DNA	100 bp žebříček
+	Pozitivní kontrola	+++
-	Negativní kontrola	-
B	Apo-Baby probio	+

Produkty PCR pro druh *Streptococcus thermophilus* o velikosti 968 bp byly detegovány ve slabé intenzitě oproti pozitivní kontrole, kde detekce byla velmi silná. Izolovaná a identifikovaná DNA odpovídá parametrům, které uvádí výrobce preparátu.

## 6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo izolovat DNA z probiotických výrobků pro dětskou výživu v takové kvalitě, aby byla vhodná pro identifikaci polymerasovou řetězovou reakci.

- Bylo analyzováno 6 probiotických preparátů, a to Normospektrum, Apo-Baby Probio, Biopron Junior, BiopronLaktobacily baby BIFI+, Linex baby a Laktobacilky.
- Izolace DNA z vybraných preparátů byla provedena z hrubých lyzátů buněk pomocí magnetických mikročástic P(HEMA-co-GMA). Testované magnetické částice byly vhodné pro izolaci DNA v množství dostatečném pro PCR.
- Na amplifikaci DNA byly využívány rodově a druhově specifické primery vybrané podle mikroorganismů deklarovaných výrobcí preparátů.
- Byly stanoveny následující druhy mikroorganismů: *L. acidophilu*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *B. bifidum*, *B. longum ssp. longum*, *B. breve*, *B. longum ssp infantis*, *B. animalis* a *S. thermophilus*.
- V analyzovaných preparátech byly identifikovány všechny mikroorganismy deklarované výrobcí. Nebyly identifikovány buňky druhu *Lactobacillus plantarum*, který uvádí výrobce u preparátu Normospektrum.
- Postupy uvedené v diplomové práci jsou vhodné a dostačující pro identifikaci cílových mikroorganismů u vybraných probiotických preparátů.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. WAIKAR, Y. *Review of probiotics in children, Pediatric Infectious Disease*. [http://dx.doi.org/10.1016/j.pid.2013.01.002] 2013.
2. GUARNER, F., SCHAAFSMA, G. J. www.sciencedirect.com. *International Journal of Food Microbiology*. [Online] Probiotics, 17. 2 1998. [Citace: 5. 1 2013.] <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160597001360>. ISSN 0168-1605.
3. BALOG, P. *Marketing ve farmacii*. místo neznámé : Grada Publishing a.s., 2006. str. 208. ISBN 8024708302.
4. KEVIN MD. *Giving children probiotics*. [Online] 2010. [Citace: 13. duben 2013.] <http://www.kevinmd.com/blog/2010/12/giving-children-probiotics.html>.
5. KUNOVÁ, V. *Zdravá výživa - 2., přepracované vydání, Zdravý a životní styl*. Praha : Grada Publishing a.s., 2011. str. 140. ISBN 8024734338.
6. LACROIX, CH. *Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation*. Cambridge : Woodhead Publishing, 2011. str. 537. ISBN 978-1-61344-369-9.
7. WOOD, B. J. B., HOLZAPFEL, W. H. N. *The lactic acid bacteria : The genera of lactic acid bacteria*. 1. London: Blackie Academic & Professional , 1995. 398 s., ISBN 0-7514-0215-X.
8. KLABAN, V. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 1. Praha: Galén, 2005, 654 s. ISBN 80-7262-341-9.
9. ROSYPAL, S., et al. *Obecná bakteriologie*. 1. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1981. 749 s. ISBN 14-549-81.
10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. *National Center for Biotechnology Information*. [Online] U.S. National Library of Medicine. [Citace: 15. 1 2013.] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1579>.
11. SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007, 270 s. ISBN 80-210-4207-9.

12. ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
13. MATTARELLI, P., BONAPARTE, C., POT, B., BIAVATI, B., 2008. *Proposal to reclassify the three biotypes of Bifidobacterium longum as three subspecies: Bifidobacterium longum subsp. longum subsp. nov., Bifidobacterium longum subsp. infantis.: comb. nov. And Bifidobacterium longum subsp. suis comb. nov.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58, 767-772.
14. ŠMARDA, J., et al. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd., 2. dotisk. Brno: Masarykova univerzita, 2010, 188 s. ISBN-10: 80-210-3841-1 15.
15. Koolman, J., Roehm, K. H. *Color Atlas of Biochemistry*. 2. vydání. New York : Thieme flexibook, 2005, 467 s. ISBN 3-13-100372-3.
16. SAMBROOK, J., RUSSEL, D. W. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3. vydání. Cold Spring Laboratory Harbors Press, New York, 2001. ISBN-13: 978-0879695774.
17. ALBERTS, B. at al. *Základy buněčné biologie*. Brno : Espero, 1998, 700 s. ISBN 80-902906-0-4.
18. ŠPANOVÁ, A., RITTICH, B. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010, 86 s. ISBN 978-80-214-4004-3.
19. KOČÁREK, E. *Molekulární biologie v medicíně*. Brno : NCO NZO Brno, 2007, 218s. ISBN 978-80-7013-450-4.
20. ROSYPAL, S. et. al. *Úvod do molekulární biologie*. 3. vydání. Brno : Brno, 2002. ISBN 80-90-25-62-4-4.
21. Нормоспектрум для детей от 3 до 14 лет. *НПФ Амфита*. [Online] 2010. [Citace: 11. říjen 2012.] [http://www.amfita.ru/o\\_preparatah/normospectrum/dlya\\_detey\\_3/](http://www.amfita.ru/o_preparatah/normospectrum/dlya_detey_3/).
22. Apotex - doplňky stravy. *Apotex (ČR)*. [Online] 2011. [Citace: 11. Říjen 2012.] [http://www.apotex.cz/download/APO-BABY\\_PROBIO.pdf](http://www.apotex.cz/download/APO-BABY_PROBIO.pdf).
23. Biopron JUNIOR | Biopron | [www.biopron.cz](http://www.biopron.cz). *Biopron, Pro zdravé zažívání a lepší imunitu*. [Online] 2012. [Citace: 11. Říjen 2012.] <http://www.biopron.cz/Biopron-vyber/biopron-junior.html>.

24. Biopron LAKTOBACILY | Biopron | [www.biopron.cz](http://www.biopron.cz). *Biopron, Pro zdravé zažívání a lepší imunitu*. [Online] 2012. [Citace: 11. Říjen 2012.] <http://www.biopron.cz/Biopron-vyber/biopron-laktobacily.html>.
25. Sandoz. [www.sandoz.cz](http://www.sandoz.cz). *Sandoz ČR*. [Online] [Citace: 29. 01 2013.] [http://www.sandoz.cz/produkty/doplanky\\_stravy/linex\\_baby.shtml](http://www.sandoz.cz/produkty/doplanky_stravy/linex_baby.shtml).
26. Swissherbal. [www.swissherbal.cz](http://www.swissherbal.cz). *Swissherbal CZ*. [Online] [Citace: 29. 01 2013.] [http://www.swissherbal.cz/index.php?page=shop.product\\_details&flypage=flypage.tpl&product\\_id=14&category\\_id=6&option=com\\_virtuemart&Itemid=4&lang=cs](http://www.swissherbal.cz/index.php?page=shop.product_details&flypage=flypage.tpl&product_id=14&category_id=6&option=com_virtuemart&Itemid=4&lang=cs).
27. DUBERNET S., DESMASURES N., GUÉGUE M. *A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level*. FEMS Microbiol. Lett. 2002 Sv. 214: 271-275.
- DUBERNET S., DESMASURES N., GUEGUEN M. *A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level*. FEMS Microbiology Letters. 2002, vol. 214, is. 2, pp. 271 - 275. ISSN 0378-1097.
28. KOK R. G., et al. *Specific detection and analysis of probiotic Bifidobacterium strain in infant feces*. App. Environ. Microbio. 1996. Sv.62: 3668-3672.
29. ROY D., SIROIS S. *Molecular differentiation of Bifidobacterium species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the gene*. App. Environ. Microbio. 2000. Sv. 191: 17-24.
30. MATSUKI T., et al. *Polyphasic taxonomic analysis of B. animalis and B. lactis reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of B. animalis at B. animalis subsp. animalis subsp. nov and B. lactis as B. animalis subsp. nov. místo neznámé* : App. Environ. Microbio. 1999. Sv. 54: 1137-1143.
31. MATSUKI T. et al. *Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16 S rRNA-genetargeted species specific primers*. Am. Soc. Microbiol 1999- 65: 4506-4512.
32. WALTER J., et al. *Detection and identification of gastrointestinal Lactobacillus species by using denaturing gradient gel electrophoresis and specific PCR primers*. App. Environ. Microbio. 2000. Sv. 66: 297-303.

33. SONJA L. et. al. *Survival of Lactobacillus delbrucii susp. bulgaricus and Streptococcus thermophilus in the terminal ileum of fistulated gottingen minipigs*. App. Environ. Microbio. 2001: 4137-4143.



## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

DNA	deoxyribonukleová kyselina
PCR	polymerázová řetězová reakce
GIT	gastrointestinální trakt
G	guanin
C	cytosin
ss DNA	jednořetězcová DNA
ds DNA	dvouřetězcová DNA
dATP	deoxyadenintrifosfát
dCTP	deoxycytosintrifosfát
dGTP	deoxyguanintrifosfát
dTTP	deoxythymidintrifosfát
bp	pár bází
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>B.</i>	<i>Bifidobacterium</i>
CCM	Česká sbírka mikroorganismů

## **SEZNAM PŘÍLOH**

## **PŘÍLOHY**