

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

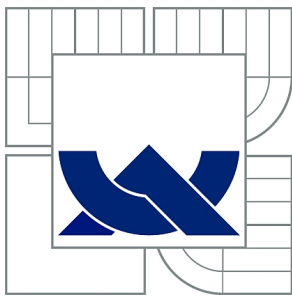
IDENTIFIKACE PROBIOTICKÝCH BAKTERIÍ VE FARMAKÁCH

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

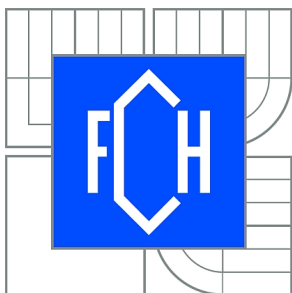
Bc. MONIKA ZOVČÁKOVÁ

BRNO 2010



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

IDENTIFIKACE PROBIOTICKÝCH BAKTERIÍ VE FARMAKÁCH

IDENTIFICATION OF PROBIOTIC BIFIDOBACTERIUM STRAINS IN DAIRY PRODUCTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. MONIKA ZOVČÁKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. ALENA ŠPANOVÁ, CSc.

BRNO 2010



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0439/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Monika Zovčáková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	doc. RNDr. Alena Španová, CSc.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Identifikace probiotických bakterií ve farmakách

Zadání diplomové práce:

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

Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2010

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

Bc. Monika Zovčáková
Student(ka)

doc. RNDr. Alena Španová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Laktobacily sú dominantnými baktériami vaginálnej flóry. Probiotiká obsahujúce laktobacily sa využívajú pri liečbe a prevencii bakteriálnych urogenitálnych infekcií.

Táto práca je zameraná na rodovú a druhovú identifikáciu probiotických baktérií v 5 rôznych vaginálnych tabletách pomocou molekulárne-genetických metód. Celková DNA izolovaná z komplexných matric vaginálnych tabliet bola použitá na amplifikáciu polymerázovou reťazovou reakciou. DNA bola izolovaná z hrubých lyzátov buniek pomocou magnetických častíc P(HEMA-*co*-GMA) a metódou fenolovej extrakcie. Identifikácia druhov probiotických baktérií bola overená pomocou rodovo špecifickej a druhovo špecifických PCR.

Výsledky identifikácie baktérií získané pomocou PCR boli porovnané s údajmi uvedenými výrobcami. Baktérie rodu *Lactobacillus* boli preukázané u všetkých tabliet, zatiaľčo identifikácia druhov bola v zhode iba u jednej tablety.

ABSTRACT

Lactobacilli are dominant bacteria of the vaginal flora. Lactobacillus-containing probiotics products are used for the treatment and prophylaxis of bacterial urogenital infections.

This work is focused on genus and species identification of probiotic bacteria in 5 different vaginal tablets using molecular-genetic methods. Total DNA isolated from complex matrix of vaginal tablets was used for amplification in polymerase chain reaction. DNA was isolated from crude cell lysates by magnetic particles P(HEMA-*co*-GMA) and by method of phenol extraction. Identification of species of probiotic bacteria was verified using genus-specific and species-specific PCRs.

Results of bacterial identification obtained by PCR were compared with declared specification given by producers. Bacteria of genus *Lactobacillus* were proved in all tablets whereas species identification was in accordance with the stated composition in 1 tablet only.

KEÚČOVÉ SLOVÁ

Vaginálne tablety, probiotiká, izolácia DNA, magnetické častice, identifikácia, PCR

KEYWORDS

Vaginal tablets, probiotics, DNA isolation, magnetic microspheres, identification, PCR

ZOVČÁKOVÁ, M. *Identifikace probiotických bakterií ve farmakách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 66 s. Vedúci diplomovej práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Rada by som sa touto cestou poďakovala svojej školiteľke doc. RNDr. Alene Španovej, CSc. za odborné vedenie, čas a cenné rady, ktoré mi venovala pri vypracovaní diplomovej práce. Moje poďakovanie patrí tiež doc. Ing. Bohuslavu Rittichovi, CSc. za poskytnutie cenných informácií a praktických rád pri jej dokončení.

OBSAH

Obsah.....	5
1 Úvod.....	9
1.1 Cieľ práce	9
2 Teoretická časť	10
2.1 Probiotiká	10
2.1.1 Probiotické mikroorganizmy	10
2.1.2 Účinky probiotických baktérií.....	11
2.1.3 Probiotiká v gynekológii a pôrodnictve	11
2.2 Baktérie mliečneho kvasenia.....	12
2.2.1 Homofermentácia	13
2.2.2 Heterofermentácia	13
2.3 Rod <i>Lactobacillus</i>	13
2.3.1 Taxonómia.....	14
2.3.2 Morfológia a fyziológia.....	14
2.3.3 Výskyt	14
2.3.4 Metabolizmus	15
2.4 Rod <i>Bifidobacterium</i>	15
2.4.1 Taxonómia.....	16
2.5 Rod <i>Streptococcus</i>	16
2.5.1 Taxonómia.....	17
2.6 Deoxyribonukleová kyselina (DNA)	17
2.6.1 Štruktúra DNA	17
2.6.2 Stabilita a denaturácia DNA.....	18
2.6.3 Replikácia DNA	19
2.7 Magnetické separačné techniky.....	20
2.7.1 Magnetické neporézne mikročastice	21
2.8 Polymerázová reťazová reakcia (PCR)	21
2.8.1 Princíp PCR.....	22
2.8.2 Komponenty PCR	23
2.8.3 Detekcia PCR produktu.....	23
2.8.4 Výhody a nevýhody PCR.....	24
3 Materiál a metódy	25
3.1 Bakteriálne kultúry	25
3.1.1 Vaginálne tablety.....	25
3.2 Chemikálie a roztoky	26
3.2.1 Rostoky pre izoláciu a purifikáciu DNA.....	27
3.2.2 Rostoky pre agarózovú gélovú elektroforézu	27
3.2.3 PCR komponenty	27
3.3 Prístroje a pomôcky.....	28
3.4 Magnetické nosiče.....	29
3.5 Metódy	29
3.5.1 Lýza buniek a izolácia DNA fenolovou extrakciou	29
3.5.2 Izolácia DNA z vaginálnych tabliet	30
3.5.3 Meranie koncentrácie DNA vzoriek.....	31

3.5.4	Polymerázové reťazové reakcie	31
3.5.5	Gélová elektroforéza DNA na agaróze	33
4	Výsledky	34
4.1	Izolácia DNA z tabliet.....	34
4.1.1	Príprava hrubého lyzátu buniek z tabliet.....	34
4.1.2	Izolácia DNA pomocou magnetického nosiča	34
4.1.3	Izolácia DNA metódou fenolovej extrakcie.....	35
4.2	PCR s univerzálnymi primermi – overenie amplifikovateľnosti DNA.....	36
4.3	Rodovo špecifická PCR	37
4.3.1	Rodovo špecifická PCR pre rod <i>Lactobacillus</i>	37
4.3.2	Citlivosť PCR pre rod <i>Lactobacillus</i>	39
4.4	Rodovo špecifická PCR pre rod <i>Bifidobacterium</i>	40
4.4.1	Citlivosť PCR pre rod <i>Bifidobacterium</i>	41
4.5	Druhovo špecifická PCR pre druhy <i>Lactobacillus</i>	41
4.5.1	Druhovo špecifická PCR – <i>Lactobacillus acidophilus</i>	42
4.5.2	Citlivosť PCR pre DNA <i>Lactobacillus acidophilus</i>	43
4.6	Druhovo špecifická PCR – <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	43
4.6.1	Citlivosť PCR pre druh <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	45
4.7	PCR špecifická pre skupinu – <i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	46
4.7.1	Citlivosť PCR pre skupinu <i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	47
4.8	Druhovo špecifická PCR – <i>Lactobacillus paracasei</i>	47
4.8.1	Citlivosť PCR pre druh <i>Lactobacillus paracasei</i>	49
4.9	Druhovo špecifická PCR – <i>Lactobacillus plantarum</i>	49
4.9.1	Citlivosť PCR pre druh <i>Lactobacillus plantarum</i>	51
4.10	Druhovo špecifická PCR – <i>Lactobacillus gasseri</i>	51
4.10.1	Citlivosť PCR pre druh <i>Lactobacillus gasseri</i>	53
4.11	Druhovo špecifická PCR – <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	53
4.11.1	Citlivosť PCR pre druh <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	55
4.12	Druhovo špecifická PCR – <i>Streptococcus thermophilus</i>	55
4.12.1	Citlivosť PCR pre druh <i>Streptococcus thermophilus</i>	57
4.13	Výsledky rodovej a druhovej identifikácie vaginálnych tabliet.....	58
4.14	Zrovnanie deklarovaného zloženia daného výrobcom s identifikáciou pomocou PCR.....	58
5	Diskusia	59
5.1	Izolácia bakteriálnej DNA a spektrofotometrické stanovenie.....	59
5.2	PCR pre doménu <i>Bacteria</i>	59
5.3	Rodovo špecifická PCR pre <i>Lactobacillus</i>	59
5.4	Rodovo špecifická PCR pre <i>Bifidobacterium</i>	59
5.5	Amplifikácia DNA s druhovo špecifickými primermi pre <i>Lactobacillus acidophilus</i>	60
5.6	Amplifikácia DNA s druhovo špecifickými primermi pre <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	60
5.7	Amplifikácia DNA s druhovo špecifickými primermi pre skupinu <i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	60
5.8	Amplifikácia DNA s druhovo špecifickými primermi pre <i>Lactobacillus paracasei</i>	60

5.9	Amplifikácia DNA s druhovo špecifickými primermi pre <i>Lactobacillus plantarum</i>	61
5.10	Amplifikácia DNA s druhovo špecifickými primermi pre <i>Lactobacillus gasseri</i> .	61
5.11	Amplifikácia DNA s druhovo špecifickými primermi pre <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	61
5.12	Amplifikácia DNA s druhovo špecifickými primermi pre <i>Streptococcus thermophilus</i>	61
6	Záver.....	62
7	Zoznam použitých zdrojov	63
8	Prílohy.....	66

1 ÚVOD

V súčasnej dobe majú v gynekológii a pôrodníctve probiotiká miesto pri doliečovaní gynekologických infekcií, kde sú faktorom pomáhajúcim k návratu mikrobiálnej rovnováhy a k obnove samočistiaceho mechanizmu pošvy. Probiotické baktérie majú antimikrobiálne vlastnosti, a tým regulujú urogenitálnu mikroflóru. Nedokončená liečba genitourinárnych infekcií vedie k zmene lokálnej mikroflóry z prevahy laktobacilov ku koliformným uropatogénom. Pri užívaní probiotík pri prevencii alebo liečbe genitourinárnych infekcií, musia laktobacily preukazovať antimikrobiálnu aktivitu. Jednou z najdôležitejších vlastností je ich schopnosť udržiavať vaginálne pH pod 4,5, čo závisí hlavne na množstve prítomných laktobacilov, ktoré produkujú kyselinu mliečnu a doplnkové antimikrobiálne látky, ktoré zahŕňajú bakteriocíny a peroxid vodíka, pričom rôzne druhy laktobacilov produkujú premenlivé množstvo týchto látok.

1.1 Cieľ práce

Cieľom práce bolo identifikovať probiotické baktérie v 5 rôznych vaginálnych tabletách pomocou molekulárne-genetických metód. K tomu previesť

- 1) izoláciu celkovej DNA z hrubých lyzátov buniek komplexných matríc vaginálnych tabliet pomocou magnetického nosiča P(HEMA-co-GMA) a fenolovou extrakciou (kontrola)
- 2) identifikovať probiotické rody a druhy baktérií pomocou rodovo a druhovo špecifických PCR
- 3) výsledky rodovej a druhovej identifikácie získané v PCR porovnať s deklarovanými údajmi

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Probiotiká

Probiotiká sú charakterizované ako „živé mikroorganizmy, ktoré sú po požití v určitom množstve prospešné zdraviu, nad rámec vlastnej základnej výživy“. ¹ Termín probiotiká nemá dlhú históriu a úzko súvisí s rozvojom mikrobiológie v nadväznosti na imunológiu, genetiku a epidemiológiu v 20. storočí. Pravdepodobne v roku 1954 Ferdinand Vergin zaviedol po prvý raz do literatúry výraz „probiotic“. Vychádzal z gréckeho základu slov (pro: pre a bios: život) predpokladajúc, že substancia je prospešná pre život.

V apríli 2001 v argentínskej Cordobe bola sformovaná expertná komisia FAO (Food and Agriculture Organisation) pri svetovej zdravotníckej organizácii (FAO/WHO), aby vypracovala analýzu a následne definíciu probiotík. Svoje závery FAO/WHO publikovala v máji 2002 a definuje probiotiká ako: „Živé mikroorganizmy, ktoré podávané v dostatočných množstvách majú preukázateľne pozitívny efekt na hostiteľa/príjemcu“. ²

Probiotiká sú bioaktívne substancie, ktoré nepatria k živinám. Napriek tomu majú veľký význam, lebo zohrávajú dôležitú úlohu pri podpore a udržiavaní zdravia. Pôvodne sa za probiotiká považovali také produkty metabolizmu organizmov, ktoré stimulovali rast druhého organizmu. Dnes sú produkty, ktoré obsahujú jeden alebo viac živých – vitálnych mikrobiálnych druhov pôsobiacich na organizmus tak, že zlepšujú zloženie jeho črevnej mikroflóry. ³

Hoci definícia uvádza, že sa jedná o organizmy živé, bolo japonskými vedcami preukázané, že k vyvolaniu zdraviu prospešného efektu môžu postačovať tiež mŕtve mikroorganizmy alebo iba časti ich buniek. ⁴

Okrem toho, že prospievajú tráveniu, vstrebávaniu vitamínov a redukcii hladiny cholesterolu (hlavne v kombinácii s doplnkami stravy s vlákninou), udržiujú ešte správnu acidobazickú rovnováhu (kyselost') v črevách, mobilizujú imunitnú odozvu organizmu v období chrípkových infekcií a preventívne pôsobia proti rakovine čriev a kvasinkovým infekciám (kandidóze). Premnoženie „nepriateľských“ patogénnych mikroorganizmov v črevách (baktérií a plesní) pôsobí rôzne alegie, ekzémy, pálenie žáhy, zácpu, zápaly kĺbov, bolesti hlavy, kandidózu a ďalšie kvasinkové infekcie a zápaly močového mechúra. Proti nim možno nasadiť ako „liek“ bez akýchkoľvek nepriaznivých vedľajších účinkov práve doplnky stravy s probiotickými baktériami. ⁵

2.1.1 Probiotické mikroorganizmy

Ako probiotiká sa používajú rôzne mikroorganizmy, najčastejšie sa jedná o baktérie mliečneho kvasenia (BMK). Boli popísané i ďalšie probiotické alebo potenciálne probiotické mikroorganizmy, medzi ktoré zaraďujeme kvasinky i baktérie rodu *Bacillus* a *Escherchia*. ⁴

2.1.2 Účinky probiotických baktérií

- Potláčajú rast patogénnych mikroorganizmov tvorbou kyseliny mliečnej, octovej a maslovej (potláčajú hnilobné procesy a pôsobia proti zápche)
- Pôsobia imunostimulačne (stimulujú imunitu), zvyšujú odolnosť proti bakteriálnym infekciám
- Napomáhajú obnoviť normálnu črevnú mikroflóru v období rekonvalescencie, najmä po antibiotickej a radiačnej liečbe
- Produkujú vitamíny skupiny B (vrátane B₁₂), vitamín K, uľahčujú vstrebávanie a využitie vitamínov
- Zvyšujú vstrebávanie a lepšie využitie viacerých minerálnych látok z potravy – vápnika, železa a niektorých mikroelementov a stopových prvkov (zinku, medi – významných z hľadiska imunologických reakcií organizmu).
- Znižujú obsah cholesterolu v krvi tým, že podporujú vylučovanie žlčových kyselín z organizmu, čím znižujú nebezpečenstvo srdcovo-cievnych ochorení
- Inhibíciou hnilobných baktérií znižujú obsah amoniaku a toxických amínov v krvi (napr. nitrozamínov), čím znižujú nebezpečenstvo vzniku rakoviny hrubého čreva, pečene a obličiek³

2.1.3 Probiotiká v gynekológii a pôrodníctve

Urogenitálna mikroflóra zdravej ženy obsahuje približne 50 druhov mikroorganizmov. Ich skladba a vzájomný pomer sú vo vzťahu k reprodukčnému veku a sú ovplyvňované rôznymi faktormi (napr. antibiotikami, spermicídmi). V čase infekcie, ktorej symptomatológia priemerne trvá 6 dní, dominuje patogénna ev. potencionálne patogénna flóra, na rozdiel od zdravej ženy, kde dominuje komenzálna flóra. V nej v premenopauzálnom období dominuje *Lactobacillus*.²

Laktobacily sú dominantné baktérie vaginálnej flóry a majú antimikrobiálne vlastnosti, ktoré regulujú urogenitálnu mikrobiálnu flóru.³ U žien vo fertilnom veku sú príslušníci rodu *Lactobacillus* prevažnou zložkou pošvovej mikroflóry a najvýznamnejším prvkom brániacim ascendentnému prenikaniu infekcie do maternice.⁶ Pošvová sliznica je osídlená dosť komplexnou normálnou mikroflórou, ktorá sa mení v závislosti na hormonálnom stave. U dospelaj ženy vo fertilnom veku je pošvová mikroflóra tvorená prevážne príslušníkmi rodu *Lactobacillus* (najčastejšie *Lactobacillus acidophilus*, bežne nazývaným *Döderleinov bacil*). *Lactobacillus acidophilus* je pomerne robustná grampozitívna tyčinka, ktorá dokáže štiepiť glykogén z pošvových epitélií na kyselinu mliečnu, čím znižuje pošvové pH na hodnoty okolo 4,5, čo zabraňuje v usídlení patogénnym a potencionálne patogénnym organizmom. Ďalším obranným mechanizmom by mohla byť tvorba peroxidu vodíku niektorými kmeňmi laktobacilov, tvorba bakteriocínov nazývaných lakticíny a rast na sliznici v podobe biofilmu. Na zdravej pošvovej sliznici môžu byť ďalej prítomné rozmanité mikróby: stafylokoky, enterokoky, difteroidy, enterobaktérie, mykoplazmy a ureaplazmy anaeróby, ale obvykle v nepatrných počtoch.⁷ Laktobacily vykazujú antimikrobiálnu aktivitu ku *Gardnerella vaginalis* a ku *Candida albicans* a majú schopnosť koagregácie s inými patogénmi. Všetky tieto ich vlastnosti majú ochranné účinky na hostiteľa. Dokázala sa aj preukázaná asociácia

medzi infekciou HIV-1 a chýbaním vaginálnych lactobacilov. Pre sexuálne a reprodukčné zdravie ženy je teda dôležitá rovnováha pošvovej biocenózy.²

Nedokončená liečba a recidíva urogenitálnych infekcií vedie k zmene miestnej flóry z prevahy lactobacilov ku koliformným uropatogénom.¹ Genitourinárne infekcie u žien sú často charakterizované zmenou v lokálnej flóre z prevahy lactobacilov ku koliformným uropatogénom ako výsledok nedostatku hormónov, sexuálnej aktivity, antikoncepčných opatrení a iných faktorov. Využitie probiotík obsahujúcich lactobacily pri obnove komenzálnej vaginálnej flóry bolo navrhnuté k liečbe a k prevencii bakteriálnych urogenitálnych infekcií.¹

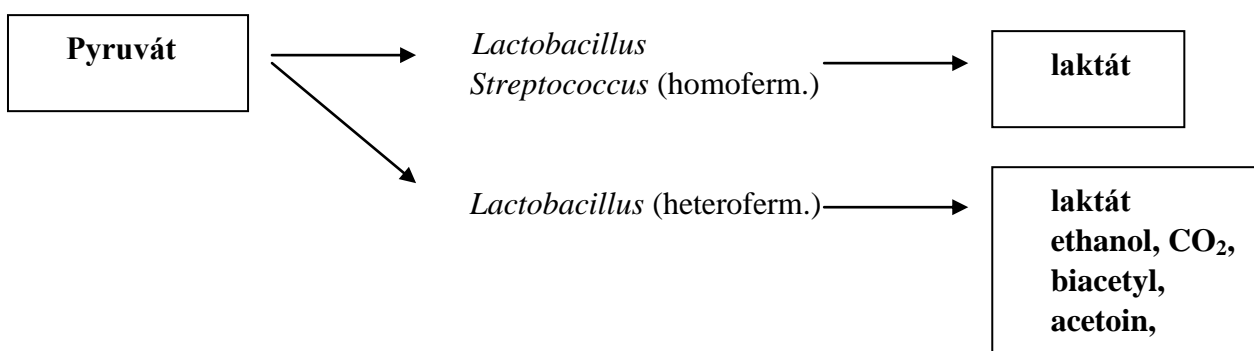
V súčasnej dobe majú v gynekológii a pôrodnictve probiotiká miesto nielen pri prevencii, ale aj pri doliečovaní gynekologických infekcií. Sú faktorom pomáhajúcim k návratu porušenej rovnováhy a obnove samočistiaceho mechanizmu pošvy.² Schopnosť lactobacilov kolonizovať vaginálnu sliznicu závisí od rozsahu adhézie k vaginálnym epiteliálnym bunkám. Vaginálne tablety sú efektívnou cestou k posilneniu obsahu lactobacilov v danej lokálnej flóre.¹ Orálny preparát lactobacilov pre genitourinárne infekcie musí byť schopný udržania ich štrukturálnej integrity počas prechodu cez črevo a doručenie do rektálnej oblasti pre vzostup a kolonizáciu vaginálneho traktu.⁸

2.2 Baktérie mliečneho kvasenia

Baktérie mliečneho kvasenia produkujú kyselinu mliečnu ako hlavný alebo jediný fermentačný produkt. Postrádajú porfyríny, sú kataláza negatívne a nie sú schopné prenášať cytochróm dependentné oxidačné elektróny späť do transportných reakcií. Nie sú striktné anaeróbne. Postrádajú Krebsov cyklus a energiu získavajú fosforyláciou.⁹

Pyruvát je metabolizovaný u probiotických mikroorganizmov na laktát (vid' schéma). Cieľom jeho premeny je vždy súčasná premena redukovaného kofaktoru (tj. NADH) na formu schopnú dehydrogenovať ďalšiu molekulu substrátu pri glykolýze (tj. v NAD⁺).¹⁰

Schéma rozkladu pyruvátu u probiotických mikroorganizmov¹⁰



2.2.1 Homofermentácia

Pri tzv. homofermentatívnom mliečnom kvasení, ktoré prevádzajú vedľa rôznych laktobacilov i koky (napr. rod *Streptococcus*) vzniká prakticky len mliečna kyselina (90%). Pyruvát vzniknutý glykolýzou je redukovaný za súčinnosti redukovaného kofaktoru na laktát tj. anión mliečnej kyseliny ($\text{CH}_3\text{-CHOH-COO}^-$).¹⁰ Na rozdiel od živočíchov, tvoriacich pri nedostatku kyslíku výhradne L-formu laktátu, vyrábajú mliečne baktérie väčšinou len D-laktát.

Homofermentatívne mliečne baktérie sa používajú pre kvasnú výrobu mliečnej kyseliny. Pri postupnej neutralizácii vznikajúceho laktátu (napr. mletým CaCO_3) sa získa až 90% laktátu zo spotrebovaného substrátu. Samovoľné mliečne kvasenie sa využíva pri konzervácii kapusty, uhoriek, lebo zabraňuje rozvoju hnilobných baktérií. Na použitie mliečneho kvasenia je založená tiež výroba syrov a kvasených mliečnych nápojov (acidofilné mlieka, kefir ai.)¹¹

Rody *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* a *Enterococcus* majú iba anaeróbný katabolický metabolizmus a tvoria kyselinu mliečnu ako takmer jediný produkt metabolizmu cukrov. Preto sa zaraďujú medzi homofermentatívne mliečne baktérie.¹⁰

2.2.2 Heterofermentácia

Tzv. heterofermentatívne mliečne baktérie však neobsahujú aldolázu, tj. glykolitický enzým štiepiaci hexóza-1,6 bisfosfát na dva triózafosfáty.¹⁰ Odbúravajú preto glukózu kombináciou pentózového cyklu a časti glykolitického systému. Na laktát sa preto mení len časť glukózy, zo zvyšku sa tvorí ethanol a oxid uhličitý alebo acetát a oxid uhličitý.¹¹ Tým vzniká z hexózy ekvimolárne množstvo oxidu uhličitého, ethanolu a laktátu.¹⁰

2.3 Rod *Lactobacillus*

Z potravinárskeho i biotechnologického hľadiska je najdôležitejší mikroaerofilný rod *Lactobacillus*, ktorý je v prírode veľmi rozšírený.¹⁰ Laktobacily sú anaeróbne grampozitívne nesporeujúce tyčinky.¹²

Väčšina druhov rodu *Lactobacillus* fermentuje glukózu a laktózu na laktát a odtiaľ pochádza meno tohto rodu. Patria sem druhy baktérií, ktoré tvoria časť prirodzenej mikroflóry úst človeka, gastrointestinálneho traktu a vagíny (táto zmes laktobacilov býva často nazývaná Döderleinov laktobacil. Ide napr. o druh *Lactobacillus acidophilus*). Niektoré druhy laktobacilov sa používajú v mliečnom priemysle (jogurty). Tieto potraviny bývajú pre obsah laktobacilov doporučované pacientom trpiacim črevnou dysmikrobiou vzniklou z predchádzajúceho užívania širokospektálnych antibiotík.

Väčšina druhov je schopná rasti pri teplote 45°C (*Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii* má pri tejto teplote optimum). Väčšina druhov skvasuje laktózu.^{6 10 12}



Obr.1 *Lactobacillus rhamnosus* ¹³

2.3.1 Taxonómia

Taxonomické zaradenie laktobacilov je nasledovné: ¹⁴

Doména: *Bacteria*
Kmeň: *Firmicutes*
Trieda: *Bacilli*
Rad: *Lactobacillales*
Čelad': *Lactobacillaceae*
Rod: *Lactobacillus*

2.3.2 Morfológia a fyziológia

Lactobacily sú robustné nesporelujúce grampozitívne tyčinky, tvoriace časté retiazky. ⁶ Bunky tvaru pravidelných tyčiniek (obvykle dlhšie), občas tiež kokovité, usporiadané v palisádach alebo krátkych retiazkach. Fakultatívne anaeróbne, občas mikroaerofilné (slabý rast na vzduchu, ale lepší rast pri redukovanej koncentrácii kyslíku), niektorí zástupci vyžadujú pri izolácii anaeróbne podmienky. Obecne platí, že prítomnosť 5% CO₂ podporuje rast laktobacilov. Chemoorganotrofné vyžadujú bohaté komplexné média, ich metabolizmus je fermentatórny. Neredukujú nitráty, nehydrolyzujú želatínu, kataláza negatívna. Optimálna rastová teplota je 30 až 40°C a optimum pH obvykle medzi 5,5-6,2. ^{6 10}

2.3.3 Výskyt

Laktobacily sú široko rozšírené v prostredí, obzvlášť v najrôznejších potravinách živočíšneho alebo rastlinného pôvodu (i štartovacie kultúry), v nápojoch, v čistej i znečistenej vode, kyslej kapuste, silážach, bežne osídľujú gastrointestinálny trakt vtákov a cicavcov

a vagínu cicavcov, tvoria časť normálnej ústnej flóry mnoho teplotkrvných živočíchov vrátane človeka. Iba vzácne sú patogénne.¹⁵

2.3.4 Metabolizmus

Podľa druhu katabolického metabolizmu rozdelujeme rod *Lactobacillus* na tzv. homofermentatívne mliečne baktérie, ktoré pri skvasovaní sacharidov produkujú prakticky iba kyselinu mliečnu (napr. druhy *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*) a na tzv. heterofermentatívne, ktoré produkujú vedľa kyseliny mliečnej ešte značné množstvo ethanolu a oxidu uhličitého (napr. *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. buchneri*).¹⁰

2.4 Rod *Bifidobacterium*

Bifidobacterium je rod anaeróbných grampozitívnych nesporulujúcich tyčínok, veľmi rozmanitých tvarov, obvykle mierne zakrivené, často zhrubnuté či s náznakmi vetvenia. Usporiadané jednotlivo, po dvoch vo „V“ zoskupeniach, občas v retiazkoch, palisádach alebo ružiciach. Príležitostne vykazujú zhrubnuté kokovité tvary. Patogénna aktivita bola popísaná u *Bifidobacterium dentium*. Uplatňuje sa pri zubnom kaze a vzácne pri zmiešaných endogénnych anaeróbných infekciách. Tu je občas zachytené i *B. longum* a *B. breve*.^{12 15} Nepohyblivé, nesporulujúce, neacidorezistentné, anaeróbne (niektoré druhy môžu rásť na vzduchu s doplnkom 10% CO₂). Nerastú pod hodnotu pH 4,5 ani nad pH 8,5. Optimálna rastová teplota je v rozmedzí 37 až 41°C. Nachádzajú sa v ústach a črevnom trakte teplotkrvných stavovcov vrátane človeka, u hmyzu a v odpadných vodách. Bifidobaktérie sú prospešnou súčasťou črevnej flóry (u kojencov predstavujú až 90%), kde pomáhajú udržiavať rovnováhu a znemožňujú iným patogénnym mikroorganizmom pomnoženie v črevách. Tieto baktérie sú navyše vybavené mechanizmami, ktoré detoxikujú škodlivé zložky tráveniny. Používajú sa v probiotikách.¹⁵



Obr.2 *Bifidobacterium* sp.¹³

2.4.1 Taxonómia

Taxonomické zaradenie bifidobaktérii: ¹⁶

- Doména: Bacteria
- Kmeň: Actinobacteria
- Trieda: Actinobacteria
- Rad: Actinobacteridae
- Čeľaď: Bifidobacteriales
- Rod: Bifidobacteriaceae

2.5 Rod *Streptococcus*

Rod *Streptococcus* obsahuje grampozitívne kataláza negatívne koky usporiadané do dvojíc a reťazkov. Väčšina druhov je fakultatívne anaeróbna, nepohyblivé, nesporulujúce. Niektoré druhy tvoria púzdra. Metabolizmus je fermentatórny, produkuje prevážne laktát, ale nie plyn. Rastú v rozmedzí 25-45°C s optimom 37°C, nerastú pri 10°C. Chemoorganotrofné, k rastu vyžadujú nutrične bohaté médiá a niekedy i 5% CO₂. Konečným produktom fermentácie cukrov je kyselina mliečna. Stretávame sa s nimi ako s komezálmi slizníc, sú súčasťou normálnej flóry hlavne v dutine ústnej, horných dýchacích cestách, môžu kolonizovať vaginálnu sliznicu (*S. agalactiae*), sú prítomné v zažívacom trakte. ^{12 15}



Obr.3 *Streptococcus thermophilus* ¹³

2.5.1 Taxonómia

Taxonomické zaradenie rodu *Streptococcus* ¹⁶ :

- Doména: Bacteria
- Kmeň: Firmicutes
- Trieda: Bacilli
- Rad: Lactobacillales
- Čľaď: Streptococcaceae
- Rod: *Streptococcus*

2.6 Deoxyribonukleová kyselina (DNA)

Deoxyribonukleová kyselina je geneticky aktívnou hmotou buniek. Je nositeľkou genetickej informácie. Informácia kódovaná v štruktúre DNA je daná poradím (sekvenciou) nukleotidov v reťazci. Z chemického hľadiska je táto informácia súborom návodov pre výrobu všetkých typov bielkovín daného organizmu. ^{17 18}

2.6.1 Štruktúra DNA

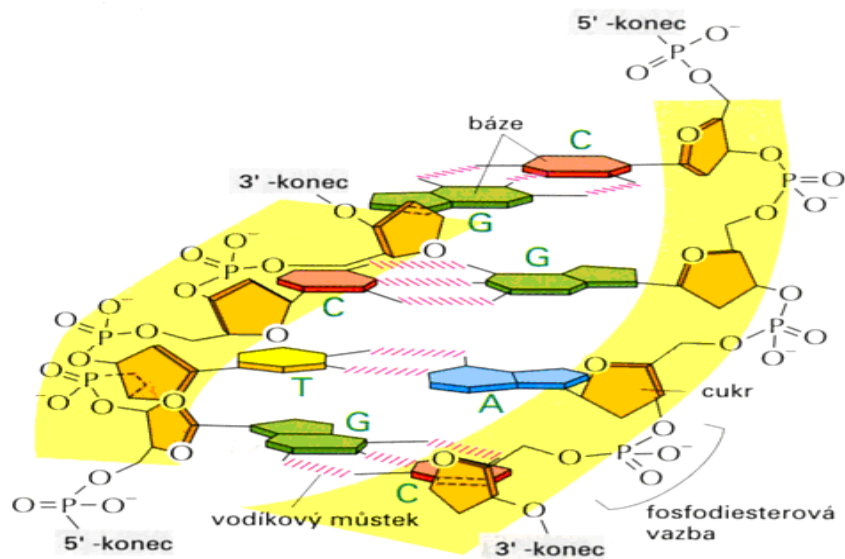
DNA je heteropolymérna látka zložená z mnoho malých molekúl, tzv. monomérov, ktoré sú navzájom spojené kovalentnými väzbami. Monoméry, ktoré tvoria DNA sa označujú ako nukleotidy.

Každý nukleotid sa skladá z troch rôznych častí: cukru typu pentózy, dusíkatých báz a fosfátu.

V prípade DNA cukernou zložkou je pentóza 2-deoxy-D-ribose. Dusíkaté bázy zastúpené v DNA sú deriváty purínu (adenín, guanín) a pyrimidínu (cytosín, thymin). Medzi N-bázami protiahlych vlákien dochádza k väzbovým interakciám. Purínová báza sa vždy viaže s pyrimidínovou bázou na základe komplementarity.

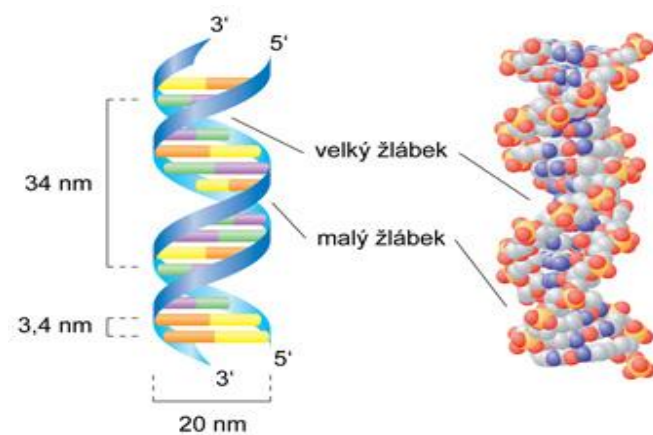
Molekula DNA pozostáva z dvoch polynukleotidových reťazcov, ktoré sú okolo seba vzájomne obtočené do tvaru pravotočivej dvojzávitnice. Reťazce sú antiparalelné, tzn. že sú protismerne orientované, jeden z nich má orientáciu cukorfosfátovej väzby 5'-3' a druhý 3'-5'. Cukorfosfátová kostra je umiestnená na vonkajšej strane dvojzávitnice, bázy sú umiestnené dovnútra a sú orientované kolmo k sebe a pritom sú čiastočne pootočené, čím kopírujú otáčky závitnice. Bázy na opačných reťazcoch sú spojené vodíkovými väzbami. Pritom platí, že adenín sa páruje dvoma vodíkovými väzbami s tymínom a guanín tromi vodíkovými väzbami s cytozínom. ^{19 11 17 18 20} Párovaním báz sú vytvorené podmienky pre spojenie dvoch polynukleotidových reťazcov, kde geneticky určené poradie jednotlivých báz jedného reťazca jednoznačne determinuje poradie báz v reťazci komplementárnom. ²¹

Pretože sú vodíkové väzby slabé, je možno oba reťazce DNA ľahko oddeliť napríklad zahriatím. Bázy sú navzájom k sebe komplementárne, tzn. že nukleotidová sekvencia v jednom reťazci predpisuje nukleotidovú sekvenciu v druhom. ¹⁹



Obr. 4 DNA- párovanie báz ¹⁸

Jednotlivé dvojice, tzv. páry báz (skratka bp, z anglického base pair) sú v dvojzávitnici DNA vzdialené 0,34nm. Na jednu otacku pripadá 10bp. Jedna otacka má vysku 0,34 nm a vonkajší priemer dvojzávitnice je 2 nm. Vďaka charakteru párovania báz nie sú oba dva cukor-fosfátové reťazce rozptýlené v priestore rovnomerne pozdĺž osi dvojzávitnice a výsledkom vinutia je existencia veľkého a malého žliabku. Hoci je veľký žliabok širší a malý užší, oba sú dost veľké na to, aby sa s jednotlivými bázami mohli kontaktovať proteíny. ¹⁹



Obr.5 Priestorový model dvojzávitnice DNA ²²

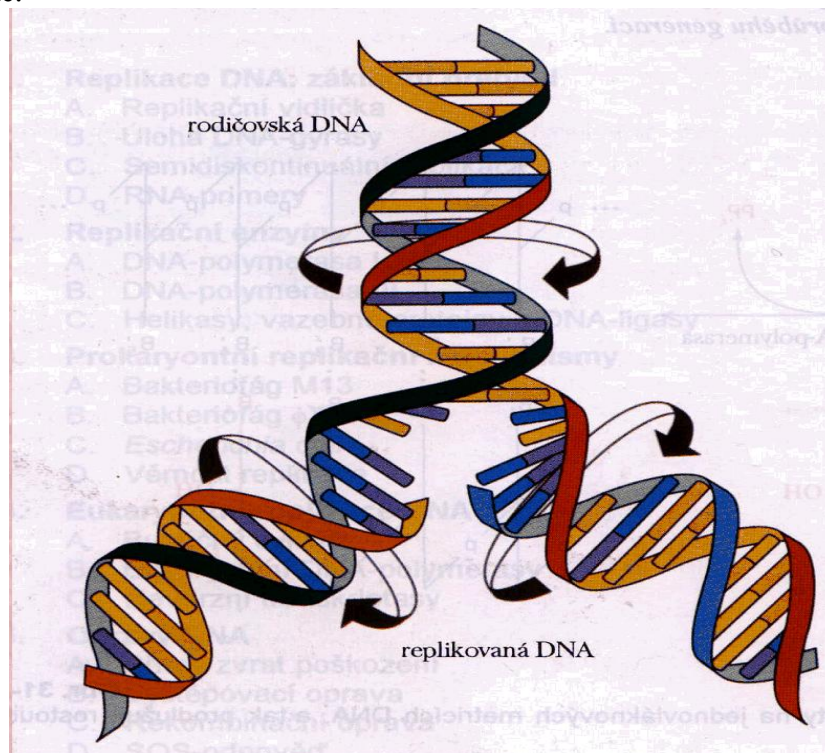
2.6.2 Stabilita a denaturácia DNA

Pri zvysenej teplote dochádza k prerušeniu väzieb prispievajúcich k stabilizácii dvojzavitnicoveho usporiadania DNA. Natívna štruktúra sa zhruti a oba komplementárne reťazce sa oddelia a zaujímajú konformáciu náhodného klobka. K denaturácii dochádza i pôsobením dalsich vplyvov rusiacich vazbové interakcie medzi oboma reťazcami napr. v alkalickom prostredí. Denaturaciu DNA doprevádza tzv. hyperchromny efekt, ktorý pramení z prerušenia elektrónových interakcií medzi susednými bázami a dochádza pri ňom

k zvýšeniu absorpcie ultrafialového svetla. Preto sa prechod medzi natívnym a denaturovaným stavom spravidla sleduje meraním UV-absorpčného spektra pri 260 nm. Stabilita dvojzávitnice DNA a tým i teplota pri ktorej dochádza k denaturácii závisí na niekoľkých faktoroch. Predovšetkým sa na tepelnej stabilite podieľa obsah guanínu a cytozínu. S ich molárnym pomerom rastie teplota nutná k denaturácii, čo súvisí s fixáciou týchto párov pomocou troch vodíkových mostíkov na rozdiel od dvoch vodíkových mostíkov v prípade párov adenínu a thymínu. Ďalšími faktormi ovplyvňujúcimi teplotu topenia sú: pH, ionová sila roztoku a povaha rozpúšťadla. K hyperchromnému posunu dochádza v úzkom rozmedzí teplôt, čo potvrdzuje, že denaturácia je kooperatívny proces, pri ktorom zhrútenie jednej časti molekuly postačuje k destabilizácii jej zbytku. Teplota pri ktorej k denaturácii dochádza sa nazýva teplota topenia (T_m).²³

2.6.3 Replikácia DNA

Replikácia DNA (z pôvodného reduplikácia=zdvojovanie) je nutným predpokladom pre mitotické delenie buniek i pre delenie baktérií. Musí zaistiť identické sekvencie nukleotidov DNA dcériných buniek v porovnaní s DNA bunky materskej alebo baktérie. Replikácia sa uskutočňuje semikonzervatívnou cestou – do každej z dvoch dcériných buniek prejde jedno vlákno materskej dvojzávitnice DNA a druhé sa novo vystavia. Tým vzniknú dva identické páry reťazcov a obe dcériné bunky dostávajú rovnakú genetickú výbavu. Tvorba nových reťazcov je daná výberom vhodných nukleotidov, ktoré musia byť, aby sa začlenili, komplementárne.²⁴



Obr.6: Replikácia DNA¹⁸

Priebeh replikácie:

- Oba komplementárne reťazce dvojzávitnice DNA sa od seba v určitom úseku oddelia, rozvinú sa
- K obom oddeleným úsekom sa komplementárne dostavia dva nové úseky vždy so smerom rastu $5' \rightarrow 3'$, pričom polarita na matricovom vlákne DNA je obrátená: $3' \rightarrow 5'$.²⁴

2.7 Magnetické separačné techniky

Magnetické častice sú stále viac zaujímavé pre ich rôznorodé využitie jak v oblasti medicíny tak i biológie, chémie, biochémie či lekárstva.²⁵ Navyiac, magnetické častice sa využívajú v genómovej analýze, kde molekulárne metódy sa stávajú stále viac dôležité.²⁶

Môžu byť syntetizované v rôznych veľkostiach či už v nano alebo mikro merítku, záleží na ich využití. Výhody hydrofilných mikročastíc sú v ich nízkej nešpecifickej adsorpcii biologicky aktívnych zlúčenín, ktoré obsahujú iné reaktívne skupiny ako napríklad karboxylové skupiny a chelatačné iminodiacetátové skupiny, ktoré sa využívajú napríklad k imobilizácii rôznych ligandov (proteínov, enzýmov, nukleotidov ai).²⁵ Porovnaním s bežnými metódami je práca s magnetickými časticami rýchla, jednoduchá, citlivá, bezpečná a DNA sa získava vo vysokom výťažku a čistote. Navyiac použitie magnetického nosiča nevyžaduje špeciálne vybavenie a uľahčuje automatizáciu pri rutinnej purifikácii.²⁶ Reverzibilná adsorpcia na pevnej fáze založená na kremičitých nosičoch a anión výmenných nosičoch sa stala obľúbená k izolácii DNA. Nukleová kyselina interaguje s kremičitým povrchom pri vysokej koncentrácii chaotropných solí. Neskorší rozvoj dosiahol aplikácie magnetických častíc pri separácii DNA.²⁷

Magnetické nosiče vykazujú svoje magnetické vlastnosti len v prítomnosti vonkajšieho magnetického poľa. Nedochádza k vzniku reziduálneho magnetizmu, z čoho vyplýva že ak sa sa tieto častice nenachádzajú v bezprostrednej blízkosti magnetického poľa, vytvárajú homogénnu suspenziu.²⁸ Reverzibilná imobilizácia na pevnej fáze na magnetických časticách funkcionalizovaných s karboxylovými skupinami je veľmi užitočná napríklad pre izoláciu DNA fragmentov.²⁶

Magnetické nosiče majú na svojom povrchu funkčné ionové skupiny, ktoré sú silno či slabo zásadité (kyslé), obsahujú ligandy alebo cheláty prechodných kovov či viazanú zložku príslušného afinitného páru. Behom magnetickej separácie môžu nastať rôzne typy interakcií, od nešpecifických ako sú väzby hydrofóbne, ionové či vodíkové, cez špecifické väzby až po špecifické afinitné interakcie, čo môžu byť interakcie typu enzým – inhibitor, streptavidín – biotín, protilátka – antigen ai.²⁹

Najlepších výsledkov pri magnetickej separácii sa dosiahne, ak sú častice monodisperzné. Magnetické častice potom majú jednotné chemické i fyzikálne vlastnosti a v roztokoch nedochádza k ich agregácii tak ľahko ako u častíc polydisperzných.

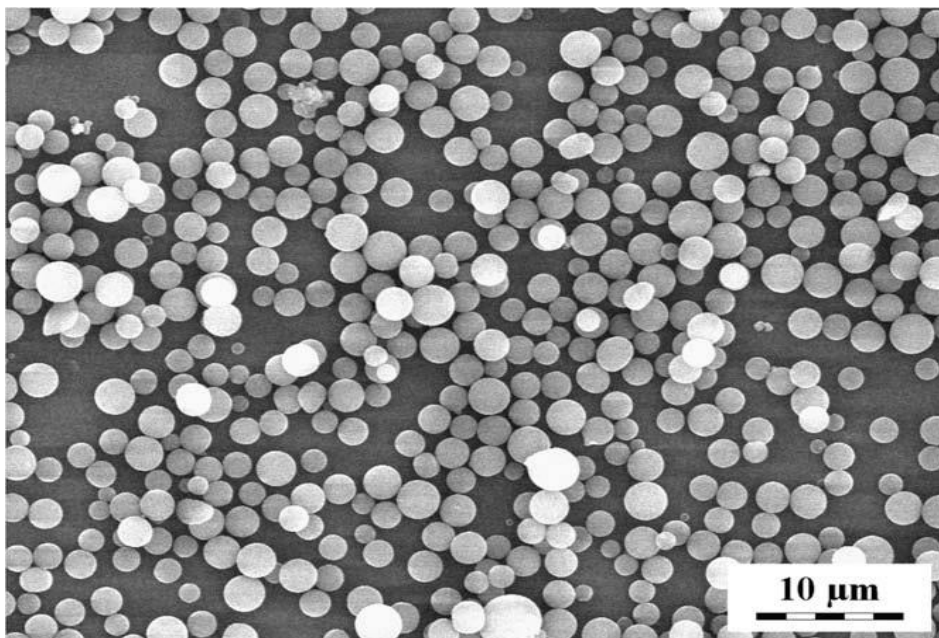
Ak sa jedná o tvar, v praxi sa osvedčila forma guľičky, pretože má výborné hydrodynamické vlastnosti. Čo sa veľkosti magnetických častíc týka, uprednostňuje sa veľkosť mikrometrová a menšia, častice potom majú väčší špecifický povrch, na ktorý môže dochádzať k prichyteniu funkčných skupín alebo k imobilizácii biomolekúl. Príliš malé častice nie sú vhodné z toho dôvodu, že môže dôjsť k značnému zníženiu ich magnetickej citlivosti²⁹

2.7.1 Magnetické neporézne mikročastice

Poly(2-hydroxyethyl methakrylát) (PHEMA) je hydrofilný nosič, známy pre jeho netoxicitu, mechanickú stabilitu, biokompatibilitu a rozsiahle biomedicínske využitie.²⁵

Poly(2-hydroxyethyl methakrylát-*co*-glycidyl methakrylát) - P(HEMA-*co*-GMA) pokrytý karboxylovými skupinami je jedným z typov magnetických mikročastíc, ktoré sa používajú k izolácii bakteriálnej DNA (Obr.7).

Magnetickú neporéznu mikročasticu P(HEMA-*co*-GMA) možno pripraviť disperziou kopolymerizáciou 2-hydroxyethyl methakrylátu (HEMA) a glycidyl methakrylátu (GMA) v prítomnosti koloidných častíc magnetitu (Fe_3O_4) pokrytých kyselinou olejovou. Táto kopolymerizácia je iniciovaná dibenzoyl peroxidom, stabilizovaná acetát-butyrátom celulózy. Hydroxylové skupiny mikročastíc sa oxidujú 2 % vodným roztokom manganistanu draselného v kyslom prostredí kyseliny sírovej. Nanočastice kobaltitého ferritu boli pripravené koprecipitáciou Fe^{3+} a Co^{2+} v prítomnosti kyseliny algovej.²⁷



Obr.7: Elektrónový mikrosnímok magnetických neporéznych P(HEMA-*co*-GMA) mikročastíc²⁵

2.8 Polymerázová reťazová reakcia (PCR)

Polymerázová reťazová reakcia (Polymerase Chain Reaction) je enzýmová metóda, ktorá slúži k rýchlej syntéze veľkého množstva definovaného úseku DNA *in vitro*. Vzhľadom k vysokej citlivosti detekcie je možné PCR použiť pre zistenie prítomnosti veľmi malého množstva nukleovej kyseliny vo vzorke. Základom úspešnej reakcie je použitie neporušeného úseku DNA, ktorý má byť amplifikovaný.²³ Špecifita reakcie je založená na použití dvoch východných nukleotidových jednotiek (primerov), ktoré hybridujú do komplementárnych sekvencií opačných vlákien DNA a ohraničujú žiadanú sekvenciu.³⁰ Pre PCR je nutné poznať sekvencie hraničných úsekov fragmentov, ktorý má byť amplifikovaný.²³

Nejedná sa o sériu manipulácií vyžadujúcich živé bunky, PCR sa prevádza v jedinej mikroskúmavke jednoducho tak, že sa DNA zmieša so súborom reagensí a mikroskúmavka sa vloží do termálneho cycléru (termocycléru), zariadenia, ktoré umožňuje inkubovanie zmesi pri rôznych teplotách striedajúcich sa v zhode s tým, ako bolo dopredu naprogramované.³¹

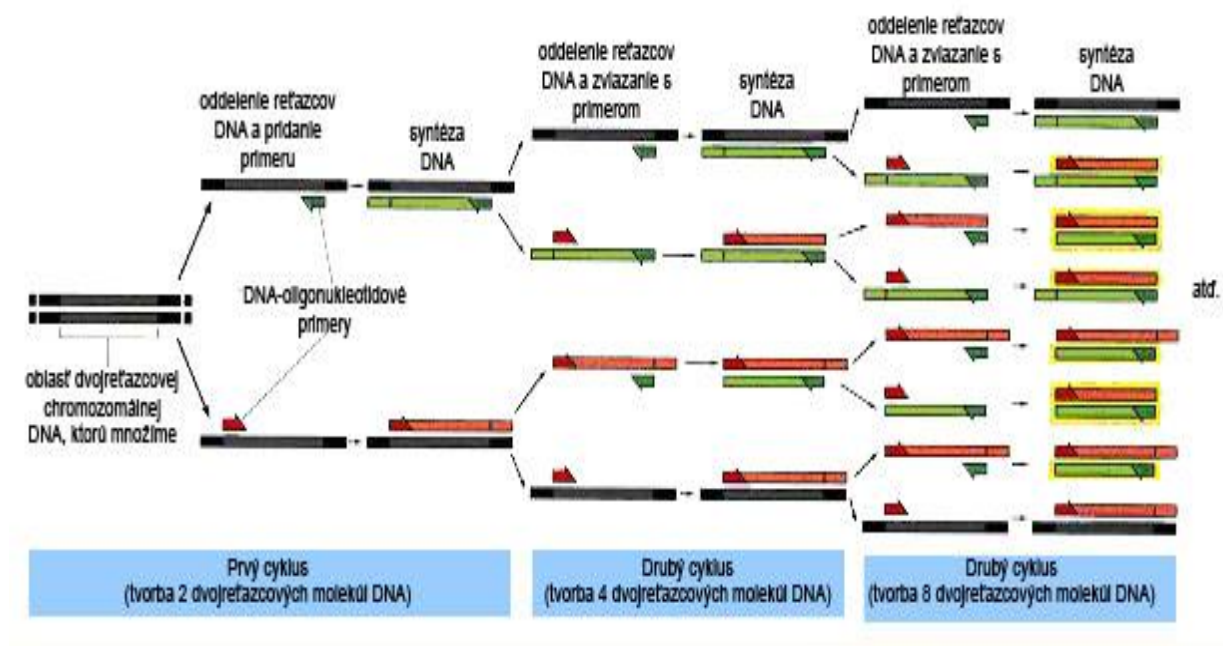
2.8.1 Princíp PCR

Princíp PCR je založený na replikácii nukleových kyselín, ktorá je základným molekulárnym procesom všetkých živých organizmov. Podstatou PCR je cyklicky sa opakujúca enzýmová syntéza nových reťazcov vybraných úsekov dvojreťazcovej DNA v smere 5'→3' prostredníctvom DNA-polymerázy. Študovaný úsek nukleotidovej sekvencie je vymedzený pripojením dvoch primerov, ktoré sa viažu na protiahlé reťazce DNA tak, že ich 3'-konce smerujú proti sebe. Po pridaní DNA-polymerázy a nukleotidov potom prebieha syntéza nových vlákien na oboch matricových reťazcoch protismerne. K syntéze DNA sa používajú termostabilné polymerázy izolované z termofilných mikroorganizmov, napr. *Taq* DNA-polymeráza z *Thermus aquaticus* odolávajúce teplotám, pri ktorých DNA denaturuje. To umožňuje, aby syntéza DNA prebiehala opakovane formou cyklov. PCR je proces pri ktorom sa v závislosti na teplote reakčnej zmesi pravidelne striedajú tri kroky, behom ktorých prebiehajú tri odlišné deje s odlišnými nárokmi na teplotu:

- Denaturácia dvojreťazcových molekúl DNA (94°C)
- Pripojenie primerov k oddeleným reťazcom DNA (30-65°C)
- Syntéza nových reťazcov DNA prostredníctvom DNA-polymerázy (65-75°C)

Výsledným produktom PCR sú amplikóny – úseky DNA definovanej dĺžky o veľkosti obvykle desiatky až tisíce bp.³²

Obr.8: Princíp PCR¹⁸



2.8.2 Komponenty PCR

Reakčná zmes (obvykle v rozmedzí 25 – 100 μ l) sa skladá z nasledujúcich zložiek:

- Matrica DNA (DNA templát) – makromolekula DNA, podľa ktorej sa komplementárne syntetizujú nové reťazce DNA. Obsahuje cieľové miesta pre primery. Typické množstvo bakteriálnej a plazmidovej DNA pridávanej do reakcie, sú 10 a 1 ng a 10 pg.
- Oligonukleotidové primery – bývajú synteticky pripravené a sú komplementárne k DNA, ktorá má byť amplifikovaná. Primery sú sekvenčne špecifické a nesmú obsahovať falošné miesta na templáte. Typické primery majú 18-30 nukleotidov a obsahujú 40-60 % GC báz. Teplota topenia primerov býva v rozmedzí 55-80°C. Primery by nemali byť medzi sebou komplementárne, hlavne nie na 3'-konci, kde párovanie dvoch alebo troch báz môže viesť k vzniku dimérov primérov, hlavne pri nadbytku primérov. Potrebná koncentrácia každého priméru pre jednu reakciu je 0,1-0,5 μ M.
- 3'-deoxynukleozid-5'-trifosfáty (dNTP) – (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) – stavebné kamene pre syntézu novej DNA. Optimálna koncentrácia je 200 μ M, tolerančné rozpätie je 20-400 μ M. Vysoké koncentrácie dNTP (od 4mM a viac) pôsobia inhibične, pretože vyvážujú horečnaté ióny (Mg^{2+})
- Mg^{2+} ióny – sú nevyhnutné pre aktivitu DNA-polymerázy. Koncentrácia Mg^{2+} musí byť optimalizovaná pre každú kombináciu primerov a DNA templátu. Obvykle sa používa koncentrácia 1,5mM Mg^{2+} . Tolerančné rozpätie je 0,5-8mM. Vyššie koncentrácie iónov znižuje špecifitu PCR. U primerov bohatých na G a C bázy je ale použitie vyššej koncentrácie Mg^{2+} vhodnejšie.
- Pufor pre PCR – vytvára optimálne prostredie pre DNA-polymerázu. Štandardný reakčný pufor obsahuje 10 mM Tris-HCl (pH 8,3-8,8), 50mM KCl, 1,5mM $MgCl_2$. Prípadne môže ešte obsahovať acetamid, albumín, želatínu alebo Tween 20.
- PCR voda – používa sa na doplnenie zmesi pre PCR na požadovaný objem. Najvhodnejšia je voda o odpore 18 m Ω alebo voda pre inekcie ČSL 4.³³

2.8.3 Detekcia PCR produktu

Výsledky väčšiny PCR experimentov sa overujú elektroforézou časti amplifikovanej reakčnej zmesi v agarózovom géle. Po ofarbení ethidium bromidom sa amplifikovaná DNA objaví na géle ako pruh.³¹ Veľkosť PCR produktu je porovnaná s DNA štandardom, ten obsahuje DNA fragmenty o známej veľkosti.¹⁸

2.8.4 Výhody a nevýhody PCR

2.8.4.1 Výhody PCR

a) Vysoká špecifita a citlivosť – V kombinácii s modernými metódami izolácia DNA umožňuje PCR vyšetrenie takmer akéhokoľvek materiálu, pričom k analýze teoreticky postačí iba jediná molekula DNA.

b) Rýchlosť – amplifikácia trvá 3-48 hodín (doba závisí na dĺžke amplifikovaného úseku a tiež na tom, aké veľké množstvo ampliconov potrebujeme pripraviť).

c) Bezpečnosť práce – pri PCR spravidla nepoužívame radioaktívne značené nukleotidy.

d) Návaznosť na ostatné vyšetrenia – produkty PCR môžeme využiť k ďalším molekulárnebiologickým analýzám

e) Dobrá rozlišovacia schopnosť – pomocou PCR sa dá spravidla amplifikovať i silno degradovanú DNA (napr. zo starších vzorkov, z kostrových pozostatkov dlho uložených v zemi atd.)

f) Možnosť automatizácie - ktorú poskytujú cyklery, na ktorých je možno iba zvoliť vhodný program (tj. zadať teploty, časy a počet jednotlivých cyklov), a potom nechať prebehnúť reakciu bez nutnosti akejkoľvek osobnej asistencie.³⁴

2.8.4.2 Nevýhody PCR

a) Dĺžka amplifikovaného úseku – pomocou PCR sa nedajú amplifikovať dlhé sekvencie

b) Nutnosť poznať sekvencie ohraničujúce amplifikovaný úsek – aby bolo možné vybrať vhodné primery

c) Nepresnosť replikácie – pri syntéze DNA môže dojsť k chybným zaradením nukleotidov k mutácii, ktorá bude pri následných cykloch PCR „kopírovaná“ do novo vznikajúcich ampliconov.

d) Možnosť kontaminácie cudzorodou DNA – vyvoláva veľké komplikácie hlavne pri vyšetreniach v klinickej genetike, kedy môže byť k vzorku DNA od pacienta primiešaná DNA z iného vzorku, popr. od inej osoby (napr. pracovníka v laboratóriu)

e) Obtiažnosť kvantitatívneho stanovenia amplifikovaného produktu – týka sa to situácii, kedy vyšetrujeme rozsiahlejšie delécie. Pokiaľ je deletovaný skúmaný úsek iba na jednom homologickom chromozóme, zatiaľčo na druhom je odpovedajúci úsek zachovaný, je možné, že primery nasadnú iba na tento nedeletovaný homológ, zatiaľčo s deletovaným chromozómom vôbec hybridovať nebudú (nenájdu na ňom komplementárne sekvencie, ktoré sú tiež deletované). Amplifikáciou potom vznikne rovnaký produkt ako u zdravej osoby bez akejkoľvek delécie, takže pri gélovej elektroforéze sa u oboch vzorkov vytvoria identické prúžky tvorené amplifikovanými úsekmi. I keď bude u pacienta s deléciou ich množstvo polovičné, uvedené experimentálne usporiadanie spravidla neumožňuje presnú kvantifikáciu. Tieto problémy sa sčasti podarilo vyriešiť zavedením niektorých moderných modifikácií, napr. kvantitatívna PCR (Real-time PCR).³⁴

3 MATERIÁL A METÓDY

3.1 Bakteriálne kultúry

V práci boli použité vzorky DNA z vaginálnych tabliet (Tabuľka 1) izolované fenolovou extrakciou s následným prezrážaním etanolom i pomocou magnetického nosiča z hrubých lyzátov buniek.

Ďalšie bakteriálne kmene, ktoré sa používali ako pozitívne kontroly pri jednotlivých reakciách pochádzali z Českej sbírky mikroorganizmů v Brně a to kmene

Lactobacillus fermentum CCM 7192^T

Bifidobacterium breve Reuter1963^{AL}

Lactobacillus acidophilus CCM 4833^T

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus CCM 7190^T

Lactobacillus gasseri CCM 7009^T

Lactobacillus paracasei ssp. paracasei CCM 1753^T

Lactobacillus plantarum CCM 7039^T

Lactobacillus rhamnosus CCM 1825^T

Streptococcus thermophilus CCM 4757

3.1.1 Vaginálne tablety

Tabuľka 1 Vaginálne tablety a ich deklarované zloženie

Názov tablety	Zloženie	Sprievodné látky	Deklarované množstvo buniek
1.Gynocaps	Lyofilizovaná kultúra kmeňa <i>Lactobacillus casei</i> variety <i>Rhamnosus Döderlein</i>	monohydrát laktózy	min. 10 ⁹ baktérií v 1g
2.Fermalac vaginal	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. delbrueckii subs. bulgaricus</i> , <i>Streptococcus salivarius subsp. thermophilus</i>	nie sú uvedené	2x10 ⁶ baktérií v kapsli
3.Maldion	<i>L. gasseri</i> , <i>L. rhamnosus</i>	bezvodá glukóza, laktitol, monohydrát, kukuričný škrob, hydroxypropylmethylcelulóza, oxid titaničitý, stearan horečnatý	min. 1x10 ⁸ lyofilizovaných baktérií v kapsli

Tab.1 Pokračovanie - *Vaginálne tablety a ich deklarované zloženie*

Názov tablety	Zloženie	Sprievodné látky	Deklarované množstvo buniek
4.Floragyn ovuli	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>L. biphidus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. thermophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantharum</i>	glyceridy z pšeničných klíčkov, vit. C, kys. mliečna, extrakt z morských rias	v 1 tablete 2g laktobacilov
5.Gynolact	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i>	maltodextrín, laktóza, mliečnan vápenatý, sodná soľ karboxymetylškrobu, magnéziumstearát	2x10 ⁹ baktérií v kapsli

3.2 Chemikálie a roztoky

Pre prípravu médií a roztokov boli použité nasledujúce chemikálie:

- Agaróza pre elektroforézu DNA (Serva, Heidelberg, SRN)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Lachema, Brno, ČR)
- Ethanol (Lachema, Brno, ČR)
- Ethidiumbromid (5 mg/ml) (Sigma, St. Louis, USA)
- Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Fenol (Lachema, Brno, ČR)
- Hydroxid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Chloroform (Lachema, Brno, ČR)
- Isoamylalkohol (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina boritá (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR)
- Lyzozým (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)
- PCR agaróza (Top-Bio, Praha, ČR)
- Proteináza K (Sigma, St. Louis, USA)
- RNáza A (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- SDS (Sigma, St. Lois, USA)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris-báze) (Amresco, Solon, USA)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan hydrochlorid (Tris-HCl) (Amresco, Solon, USA)

3.2.1 Roztoky pre izoláciu a purifikáciu DNA

Jednotlivé postupy boli prevzaté zo skrípt Španová a Rittich (2010)³³

- EDTA (0,5 M, pH 8): Do 800 ml destilovanej vody sa kvantitatívne prenieslo 202,2 g EDTA, za stáleho miešania magnetickou miešačkou. pH bolo upravené pridaním NaOH v peletkách na hodnotu 8,0. Roztok bol doplnený destilovanou vodou do 1 000 ml a sterilizovaný v autokláve (121 °C, 15 minút).
- Tris-HCl (1 M, pH 7,8): V 80 ml destilovanej vody bolo rozpustené 12,1 g Tris-bázy. pH upravené pomocou koncentrovanej HCl. Roztok sa doplnil destilovanou vodou do 100 ml a sterilizoval v autokláve (121 °C, 15 minút).
- Lyzačný roztok A: 10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 5 mM EDTA (pH 8,0)
- Lyzačný roztok B: 10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 5 mM EDTA (pH 8,0), lyzozým (3mg/ml)
- CIZ: zmes chloroformu a isoamylalkoholu v pomere 24:1.
- TE pufr: 10 mM Tris-HCl (pH 7,8), 1 mM EDTA (pH 8,0)
- SDS (20%): v 80 ml sterilnej destilovanej vody sa rozpustilo 20 g SDS. V prípade pomalého rozpúšťania sa roztok zahrial na 68 °C. pH bolo upravené na hodnotu 7,0 niekoľkými kvapkami koncentrovanej HCl. Roztok sa doplnil destilovanou vodou do 100 ml. Bez sterilizácie.
Proteináza K (1 mg/ml, 100 µg/ml) Na analytických váhach navážiť príslušné množstvo (10 mg, 1 mg) a doplniť destilovanou vodou do 10 ml. Rozplniť do alikvotov. Uchovávať pri – 20 °C.

3.2.2 Roztoky pre agarózovú gélovú elektroforézu

Prevzaté zo skrípt Španová a Rittich (2010), ak nie je uvedené inak.

- 5 x TBE pufr: 54 g Tris bázy, 27,5 g kyseliny boritej a 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) doplnené do 1000 ml destilovanou vodou, výsledné pH upravené pomocou 1 M NaOH na 8,3. Takto pripravený zásobný roztok sa pred použitím riedi 10krát destilovanou vodou na výslednú koncentráciu 45 mM Tris, 45 mM kyselina boritá a 1 mM EDTA.
- nanášací pufr (6× koncentrovaný)
- PCR vkladací pufr Yellow load (Top-Bio, Praha, ČR)
- DNA štandard Malamité 100 bp rebríček (Moravské Prusy, ČR)
- DNA štandard Malamité 50 bp rebríček (Moravské Prusy, ČR)
- 0,5 µg/ml ethidiumbromid: 100 µl roztoku EtBr (500µg/ml) sa zriedi 500 ml sterilnej destilovanej vody.

3.2.3 PCR komponenty

- PCR voda – voda pre injekcie ČSL 4 (Biotika, Slovenská Ľupča, SR)
- PCR pufr kompletný – reakčný pufr 10× PCR Blue Buffer (obsahujúci MgCl₂) pre Taq DNA polymerázu 1.1 (Top-Bio, Praha, ČR)
- MgCl₂ (25mM) (Top-Bio, Praha, ČR)
- dNTP zmes (10 mM) (Top-Bio, Praha, ČR)
- primery (10 pmol/µl) – vid'. Tabuľka (Oligo-Biotech, Hradec Králové, ČR)
- Taq DNA polymeráza 1.1 (1U/µl) (Top-Bio, Praha, ČR)

- DNA štandard 100 bp rebríček (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
(Obsahuje fragmenty: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500 bp)
- DNA štandard 50 bp rebríček (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
(Obsahuje fragmenty: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 766, 916, 1350 bp)

Tabuľka 2 Zoznam použitých primerov

Špecifickosť primerov	Označenie primerov	Teplota hybridizácie (°C)	Veľkosť PCR produktu (bp)	Referencia
Univerzálne	R_eub F_eub	56	466	Haarman a Knol 2006
Rod <i>Lactobacillus</i>	F_allact_IS R_allact_IS	58	92	Haarman a kol. 2006
Rod <i>Bifidobacterium</i>	Bif 164 Bif 662	55	523	Kok a kol. 1996
<i>L. acidophilus</i>	AciSI 16SII	58	750	Walter a kol. 2000
<i>L. casei/paracasei</i>	PrI CasII	55	*	Walter a kol. 2000
<i>L. delbrueckii</i>	Rdelb Fdelb	58	94	Haarman a kol. 2006
<i>L. gasseri</i>	GasI GasII	55	*	Walter a kol. 2000
<i>L. paracasei</i>	Y2 paracasei	58	290	Ward a Timmins 1999
<i>L. plantarum</i>	PlanI PlanII	58	*	Walter a kol. 2000
<i>L. rhamnosus</i>	PrI RhaII	58	200 - 400	Walter a kol. 2000
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Sthermoph1 Sthermoph2	58	968	Lick a kol. 2001

*autor neuvádza veľkosť špecifického PCR produktu

3.3 Prístroje a pomôcky

- Centrifuga MINI Spin 13 400 min⁻¹ (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
- Digitálny fotoaparát Olympus
- Exikátor typ N 86 KN.18 (KNF Neuberger Labport, Freiburg, SRN)
- Fotoaparát Polaroid CD34 na film T667 (Ultra Lum, Polaroid, Cambridge, USA)
- Mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Varšava, Polsko)
- Mikrovlnná rúra SMW 5020 (SENCOR, ČR)
- Laboratórne váhy B0430 (Ohaus, USA)
- Minicykly PTC-100TM (MJ Research, Watertown, USA)
- NanoPhotometerTM (Implen, Nemecko)
- Očkovací box (Fatran, ČR)

- Termocykler PTC-200 (BIO-RAD Lab., USA)
- Termostat – Mini incubator (Labnet, USA)
- Termostat FTC 901 (VELP SCIENTIFICA, Miláno, Taliansko)
- Transilluminátor TVR 3121 (Spectroline, Paramount, USA)
- Zariadenie pre elektroforézu Easy-Cast, model B1 (Owl Scientific, USA)
- Zariadenie pre elektroforézu Mini gel unit 7x10 cm (Hoefler, USA)
- Zdroj elektrického napätia pre elektroforézu Lighting Volt Power Supply, model OSP-300 (Owl Scientific, USA)
- Bežné laboratórne sklo, umelohmotný materiál a bežné laboratórne pomôcky

3.4 Magnetické nosiče

poly(2-hydroxyethyl methacrylát-*co*-glycidyl methacrylát) P(HEMA-*co*-GMA50%) (1:1)-pokrytý karboxylovými skupinami

Veľkosť:	1 μm
Obsah – COOH:	2,61 mmol/g
Obsah Fe:	6,55%

3.5 Metódy

Prevzaté z Španová a Rittich (2010)

3.5.1 Lýza buniek a izolácia DNA fenolovou extrakciou

Bunky boli zlyzované tak, že 1 ml bakteriálnej kultúry sa stočil pri 15 000 ot./3 min. Sediment bakteriálnych buniek bol resuspendovaný v 1 ml lyzačného roztoku A a suspenzia bola centrifugovaná pri 15 000 ot./3 min. K sedimentu sa pridalo 500 μl roztoku B a vzorky sa inkubovali pri laboratórnej teplote 1 hod. Následne sa k suspenzii pridalo 25 μl 10% SDS a 5 μl proteínázy K a inkubovalo sa pri 55 °C do druhého dňa. Z hrubého lyzátu bolo 20 μl uschovaných pre gélovú elektroforézu. K lyzátu sa pridalo 10 μl RNázy A a inkubovalo sa 30 minút pri 37 °C.

Fenolová extrakcia DNA začala tým, že k lyzátu buniek sa pridal rovnaký objem fenolu a vzorky sa premiešali po dobu 4 min. Po centrifugácii pri 15 000 ot./3 min bola odobraná vodná fáza s DNA do čistej eppendorfky, kde sa k nej pridalo 700 μl CIZ. Po 4 minútovom miešaní boli vzorky centrifugované (15 000 ot./3 min) a vodná fáza s DNA opäť odobraná do čistej eppendorfovej skúmavky.

Pri prezrážaní DNA etanolom sa k DNA pridala 1/10 objemu 3 M octanu sodného a 1 ml 96 % etanolu. DNA bola vyzrážaná pri -20 °C po dobu 15 min a následne 15 min centrifugovaná pri 15 000 ot. Supernatant sa zliat a DNA bola usušená v exikátore. Na záver bola DNA rozpustená vo vhodnom objeme TE pufri.

3.5.1.1 Zakoncentrovanie hrubého lyzátu buniek

Hrubý lyzát buniek z vaginálnych tabliet bol 2x zakoncentrovaný podľa nasledujúceho postupu:

- K 350 μ l hrubého lyzátu buniek sa pridalo 17 μ l 3M octanu sodného.
- K zmesi sa pridalo 920 μ l 96% etanolu.
- Inkubácia pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 min.
- Po inkubácii sa zmes 15 min. centrifugovala pri 15 000 ot/min.
- Supernatant sa opatrne zliat a sediment bol usušený v exikátore (15 min.).
- Po usušení sa sediment rozpustil v 175 μ l TE pufru.

3.5.2 Izolácia DNA z vaginálnych tabliet

1. Tableta bola sterilne odobraná, otreaná ethanolom a rozdrtená.
 2. K 1 g rozdrtenej tablety bolo pridané 5 ml lyzačného roztoku B, vzorka bola rozsuspendovaná.
 3. Po 1 hodine inkubácie pri laboratórnej teplote k vzorke bolo pridané 50 μ l 20 % SDS a 5 μ l proteinázy K (1 mg/ml).
 4. Vzorky boli inkubované pri $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ do druhého dňa.
- Z takto pripravených hrubých lyzátov buniek prítomných v tabletách sa DNA izoluje metódou fenolovej extrakcie (3.5.2), alebo je použitá pre separáciu DNA magnetickým nosičom.
- Tento hrubý lyzát môže byť uchovaný v mrazničke pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.5.2.1 Príprava zmesi pre izoláciu DNA pomocou magnetických nosičov

Zmesi boli pripravené v eppendorfkových skúmavkách (1,5 ml). (Objem jednotlivých komponent je udávaný v (μ l) (Tabuľka 3)

Tabuľka 3 Zloženie zmesi

Poradie komponent	Komponenta	Objem jednotlivých komponent (μ l)
1	NaCl(5M)	80
2	Hrubý lyzát buniek	60
3	PEG(40%)	40
4	Magnetické častice (2mg/ml)	20
Výsledný objem (μ l)		200

- Zmes bola pripravená podľa Tabuľky 3, bola premiešaná a ponechaná k inkubácii 15 minút pri laboratórnej teplote.
- Častice s naviazanou DNA boli odseparované pomocou magnetu 15 minút pri laboratórnej teplote.

- Supernatant bol odpipetovaný do čistej ependorfovej skúmavky a uvoľnil sa magnet z magnetického pásu.
- Skúmavka obsahujúca nosič s naviazanou DNA je premytá 1000 μl 70% ethanolu
- Častice boli odseparované magnetom 2 minúty pri laboratórnej teplote
- Ethanol sa zliat. Skúmavky sa sušili v termostate pri 55°C do vyparchania ethanolu
- DNA bola eluovaná do 100 μl TE pufru do nasledujúceho dňa pri laboratórnej teplote
- Častice boli odseparované 2 minúty pri laboratórnej teplote
- Eluovaná DNA je odpipetovaná do čistej ependorfky
- Takto pripravená DNA zmes sa použila pre PCR

3.5.3 Meranie koncentrácie DNA vzoriek

Koncentrácia vzoriek bola meraná spektrofotometricky pomocou prístroja NanoPhotometerTM. Ako referenčná vzorka bol používaný TE pufr. Absorbancia sa merala v rozmedzí vlnových dĺžok 220 – 320 nm, pričom koncentrácia DNA bola stanovená z hodnoty absorbancie A_{260} pri 260 nm, a to na základe poznatku, že DNA o koncentrácii 50 ng/ μl má pri tejto vlnovej dĺžke absorbanciu rovnú 1.

Z pomeru hodnôt A_{260}/A_{280} sa stanovila čistota DNA. Pomer absorbancií čistej DNA sa pohybuje v rozmedzí 1,8 – 2,0, ak vzorka obsahuje proteíny, je pomer menší ako 1,8, v prípade obsahu RNA je pomer väčší než 2,0.

3.5.4 Polymerázové reťazové reakcie

Všetky komponenty PCR reakcie boli pred použitím vždy skontrolované a krátko zcentrifugované. PCR zmes sa miešala v boxe vopred vysterilizovanom UV žiarením.

3.5.4.1 Zloženie PCR zmesi

Používané PCR zmesi sú uvedené v Tabuľka 4.

Tabuľka 4 Používané PCR zmesi

Komponenta PCR	F_eub R_eub	F_allact_IS R_allact_IS	Bif 164 Bif 662	AciSI 16SII	PrI RhaII	PrI CasII	Y2 paracasei	PlanI PlanII
PCR voda	10,5	17	17	15	13,5	13,5	10,5	16,5
PCR pufr kompletný	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
dNTP (10 mM)	1,0	0,5	0,5	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0
5' primer (10 pmol/ μl)	1,0	0,5	0,5	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0
3' primer (10 pmol/ μl)	1,0	0,5	0,5	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0
DNA polymeráza (1U/ μl)	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
MgCl ₂	2,0	0	0	0	2,0	2,0	3,0	2,0
DNA matrica (10 ng/ μl)	5,0	3,0	3,0	5,0	3,0	3,0	5,0	3,0

Pokračovanie Tabuľka 4

Komponenta PCR	GasI GasII	Sthermoph1 Sthermoph2	R_delb F_delb
PCR voda	13	15,5	15,5
PCR pufo kompletný	2,5	2,5	2,5
dNTP (10 mM)	1,0	1,0	1,0
5' primer (10 pmol/μl)	1,0	1,0	1,0
3' primer (10 pmol/μl)	1,0	1,0	1,0
DNA polymeráza (1U/μl)	1,0	1,0	1,0
MgCl ₂	2,5	0	2,0
DNA matrica (10 ng/μl)	3,0	3,0	1,0

3.5.4.2 Programy amplifikácie

Programy amplifikácie používané v tejto práci sú zhrnuté v Tabuľka , kde jednotlivé riadky znamenajú kroky:

1. Denaturácia DNA pred prvým cyklom
2. Denaturácia DNA
3. Hybridizácia primerov
4. Syntéza DNA reťazcov
5. Počet cyklov (opakovanie krokov 2 až 4)
6. Dosyntetizovanie reťazca v poslednom kroku

Tabuľka 5 Zoznam použitých amplifikačných programov

	Eubacter	LBC rod	BIFI rod	LBCRHA	LBCCAS	STHERM
1.	94°C/5 min	94°C/5min	95°C/5min	95°C/5 min	95°C/5 min	95°C/5 min
2.	94°C/30 s	94°C/1 min	94°C/1 min	94°C/30 sec	94°C/30 sec	94°C/1 min
3.	56°C/30 s	56°C/1 min	55°C/1 min	58°C/30 sec	55°C/30 sec	58°C/1 min
4.	72°C/1 min	72°C/1 min	72°C/2 min	72°C/1 min	72°C/1 min	72°C/1 min
5.	34 cyklov	34 cyklov	34 cyklov	34 cyklov	34 cyklov	34 cyklov
6.	72°C/7 min	72°C/7 min	72°C/7min	72°C/7 min	72°C/7 min	72°C/10 min
7.	10°C	10°C	10°C	10°C	10°C	10°C

3.5.5 Gélková elektroforéza DNA na agaróze

V princípe sa jedná o tri na seba nadväzujúce kroky:

- Príprava agarózového gélu vhodnej hustoty (tak, aby bolo zabezpečené optimálne rozdelenie očakávaných fragmentov DNA)
- Nanesenie vzoriek DNA spolu s vkladacím pufrom do komôrok na géle a preliatie gélu TBE pufrom, delenie za napätia 60 V
- Farbenie ethidium bromidom s následnou vizuálnou detekciou fluorescencie pomocou UV transluminátora a fotografická dokumentácia

Pre elektroforézu PCR produktov sa pripravoval gél o hustote 1,8 %.

Na gél bolo nanesených 25 μ l DNA, resp. PCR produktu spolu s 5 μ l nanášacieho pufro Yellow load.

Ako DNA štandard sa používal štandard Malamité (100bp rebríček) s DNA fragmentmi dĺžky 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 a 1500 bp alebo štandard Malaité (50 bp rebríček). Štandardu sa na gél dávalo 5 μ l.

Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy boli dokumentované odfotoграфovaním gélu pomocou fotoaparátu Polaroid CD34 na film T667 alebo digitálnym fotoaparátom Olympus FE-210.

4 VÝSLEDKY

4.1 Izolácia DNA z tabliet

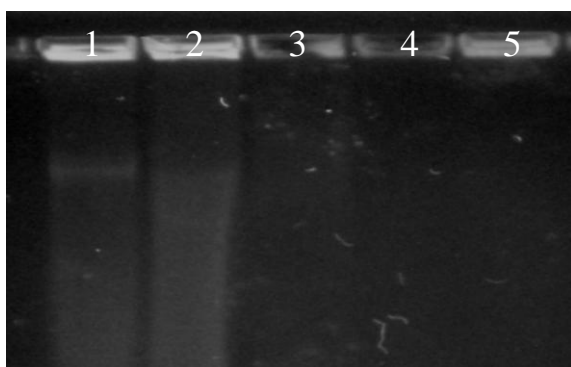
Z piatich hrubých lyzátov buniek vaginálnych tabliet bola vyizolovaná DNA metódou fenolovej extrakcie s následným prezrážaním etanolom a pomocou magnetického nosiča P(HEMA-co-GMA).

4.1.1 Príprava hrubého lyzátu buniek z tabliet

Tablety boli rozpustené v 5 ml vody a bunky v nich boli lyzované podľa postupu uvedeného v kapitole Materiál a metódy.

Lýza buniek bola overená pomocou agarózovej gélovej elektroforézy (Obr.9).

Obr.9 Gélová elektroforéza (1,8% gél) hrubých lyzátov buniek (15 µl na géle). Číslo behu označuje číslo vzorky (vid'. Tabuľka).



Beh	Hrubý lyzát buniek tablety	Detekcia DNA na géle
1.	Gynocaps	++
2.	Fermalac vaginal	++
3.	Maldion	+/-
4.	Floragyn ovuli	-
5.	Gynolact	-

-/+,+,++,+++rôzna intenzita detekcie
-.....nedetekovateľné

→ Na géle bola detekovaná DNA u troch tabliet, u dvoch detekovaná nebola.

4.1.2 Izolácia DNA pomocou magnetického nosiča

DNA z hrubých lyzátov buniek bola izolovaná pomocou magnetického nosiča vid'. Materiál a metódy.

Koncentrácia eluovanej DNA bola zmeraná spektrofotometricky vid'. Tabuľka. 6.

Tabuľka 6 Koncentrácia DNA a pomer A_{260nm}/A_{280nm}

Vzorka	Tableta	Metóda izolácie DNA	c(ng/μl)	A_{260nm}/A_{280nm}	Množstvo DNA (μg)
1.	Gynocaps	MN	9,0	2,12	0,9
2.	Fermalac vaginal	MN	2,0	-8	0,2
3.	Maldion	MN	1,5	-6	0,2
4.	Floragyn ovuli	MN	8,0	3,84	0,8
5.	Gynolact	MN	5,8	2,60	0,6

MN – izolácia DNA pomocou magnetického nosiča

Bola izolovaná DNA.

Z dôvodu nízkych koncentrácií vyizolovaných DNA sa nerobilo riedenie vzoriek na 10 ng/μl. Vzorky o uvedených koncentráciách sa použili do PCR.

4.1.3 Izolácia DNA metódou fenolovej extrakcie

DNA z hrubých lyzátov buniek bola izolovaná metódou fenolovej extrakcie podľa postupu.

Koncentrácia DNA bola zmeraná spektrofotometricky (Tabuľka 7) a vyriedená na c=10 ng/μl (Tabuľka 8).

Tabuľka 7 Koncentrácia DNA a pomer A_{260nm}/A_{280nm}

Vzorka	Tableta	Metóda izolácie DNA	c(ng/μl)	A_{260nm}/A_{280nm}	Množstvo DNA (μg)
1.	Gynocaps	FE	157	4,74	31,4
2.	Fermalac vaginal	FE	24,5	1,45	4,9
3.	Maldion	FE	124,5	1,86	24,9
4.	Floragyn ovuli	FE	38,5	1,43	7,7
5.	Gynolact	FE	74,5	1,41	14,9

FE - izolácia DNA fenolovou extrakciou s následným prezrážaním ethanolom

Tabuľka 8 Riedenie DNA na c=10ng/μl

Vzorka	Tableta	Metóda izolácie DNA	Riedenie na 10 ng/μl do objemu 100 μl	
			μl vzorky	μl TE pufru
6.	Gynocaps	FE	6,37	93,63
7.	Fermalac vaginal	FE	40,80	59,20
8.	Maldion	FE	8,00	92
9.	Floragyn ovuli	FE	26,00	74,00
10.	Gynolact	FE	13,4	86,6

FE - izolácia DNA fenolovou extrakciou s následným prezrážaním ethanolom

Po úprave koncentrácie boli všetky vzorky pripravené na použitie do PCR.

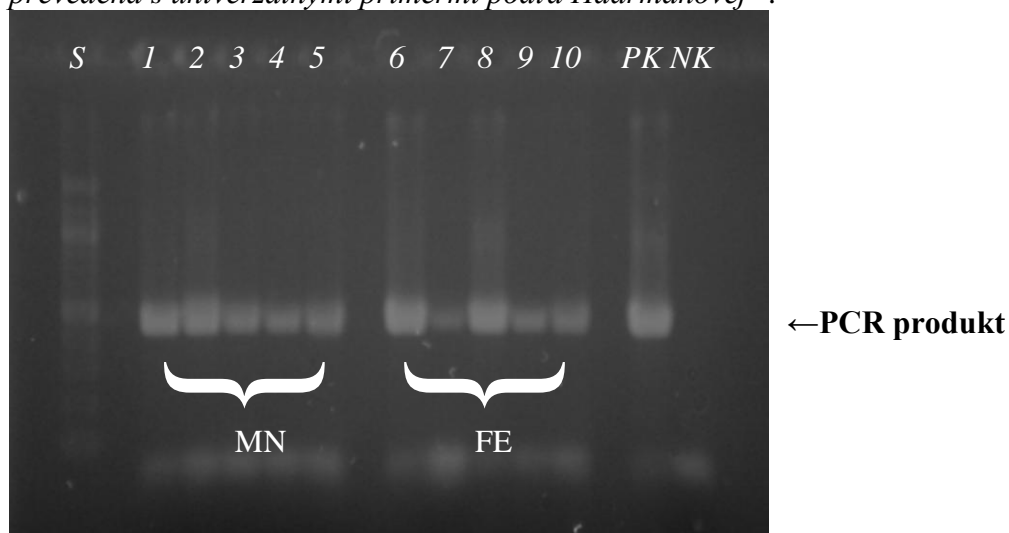
4.2 PCR s univerzálnymi primermi – overenie amplifikovateľnosti DNA

DNA z tabliet bola amplifikovaná pomocou polymerázovej reťazovej reakcie s univerzálnymi primermi podľa Haarmanovej (2005) (Materiál a metódy). Boli detekované špecifické PRC produkty 466 bp po amplifikácii DNA izolovanej jak fenolovou extrakciou tak i magnetickými nosičmi.

PCR produkty boli detekované pomocou agarózovej gélovej elektroforézy (Obr. 10).

PCR reakcia prebiehala podľa programu Eubacter (tab.5) a namiešanie PCR zmesi je zapísané v Tabuľke.4 (viď. 3.5.4)

Obr. 10 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov (466 bp). Amplifikácia DNA bola prevedená s univerzálnymi primermi podľa Haarmanovej³⁶.



Beh	Tableta	Izolácia DNA	Množstvo DNA v PCR zmesi (ng)	PCR produkt
1.	Gynocaps	MN	45	+++
2.	Fermalac vaginal		10	+++
3.	Maldion		7,5	++
4.	Floragyn ovuli		40	++
5.	Gynolact		30	++
6.	Gynocaps	FE	50	+++
7.	Fermalac vaginal		50	+
8.	Maldion		50	+++
9.	Floragyn ovuli		50	++
10.	Gynolact		50	+++
11.	Pozitívna kontrola (10ng/μl)			+++
12.	Negatívna kontrola			-

FE - izolácia DNA fenolovou extrakciou s následným prezrážaním ethanolom

MN – izolácia DNA pomocou magnetického nosiča

S – štandard

PK - pozitívna kontrola s DNA *L. fermentum* CCM 7192^T

NK - negatívna kontrola.

-/+,+,++,+++rôzna intenzita detekcie produktu

-.....nedetekovateľné

DNA izolovaná zo všetkých tabliet sa amplifikovala v PCR (bol detekovaný PCR produkt o veľkosti 466 bp).

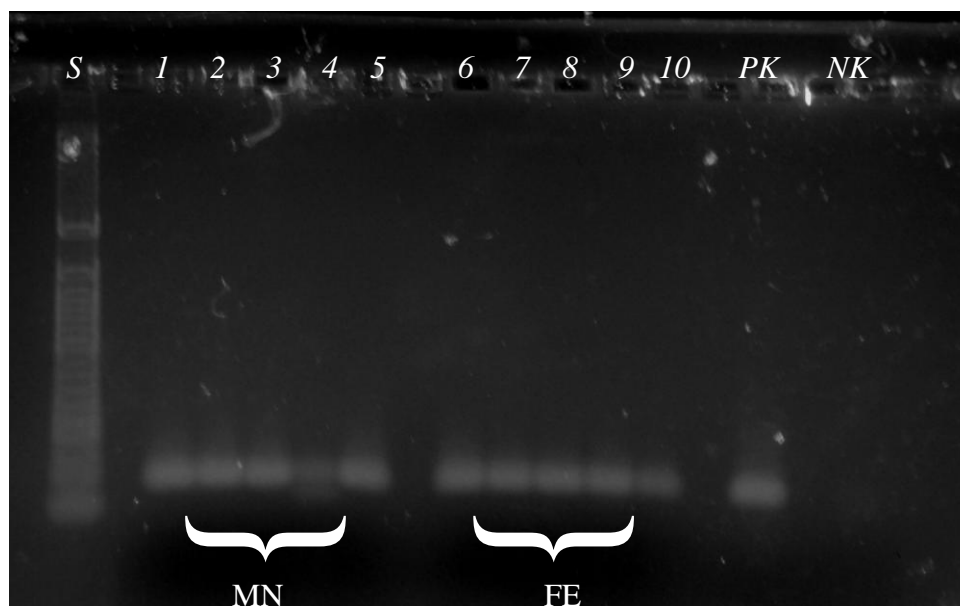
4.3 Rodovo špecifická PCR

Bola prevedená rodovo špecifická PCR pre *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*.

4.3.1 Rodovo špecifická PCR pre rod *Lactobacillus*

K amplifikácii DNA rodu *Lactobacillus* boli použité rodovo špecifické primery F_alllact_IS R_alllact_IS (PCR produkt 92 bp). PCR produkty boli detekované pomocou agarózovej gélovej elektroforézy (vid' Obr.11). Amplifikácia rodovo špecifických PCR produktov prebiehala podľa programu LBCROD (vid' Tabuľka 5) a namiešanie PCR zmesi je zapísané v Tabuľke.4 (vid'. 3.5.4).

Obr.11 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov (92 bp). Amplifikovaná bola DNA s rodovo špecifickými primermi F_allact_IS R_allact_IS.



Beh	Tableta	Izolácia DNA	Množstvo DNA v PCR zmesi (ng)	PCR produkt
1.	Gynocaps	MN	27	+++
2.	Fermalac vaginal		6	+++
3.	Maldion		4,5	+++
4.	Floragyn ovuli		24	++
5.	Gynolact		18	+++
6.	Gynocaps	FE	30	+++
7.	Fermalac vaginal		30	+++
8.	Maldion		30	+++
9.	Floragyn ovuli		30	+++
10.	Gynolact		30	+++
11.	Pozitívna kontrola (10ng/μl)			+++
12.	Negatívna kontrola			-

FE - izolácia DNA fenolovou extrakciou s následným prezrážaním ethanolom

MN – izolácia DNA pomocou magnetického nosiča

S – štandard

PK - pozitívna kontrola s DNA *L. fermentum* CCM 7192^T

NK - negatívna kontrola

-/+,+,++,+++rôzna intenzita detekcie

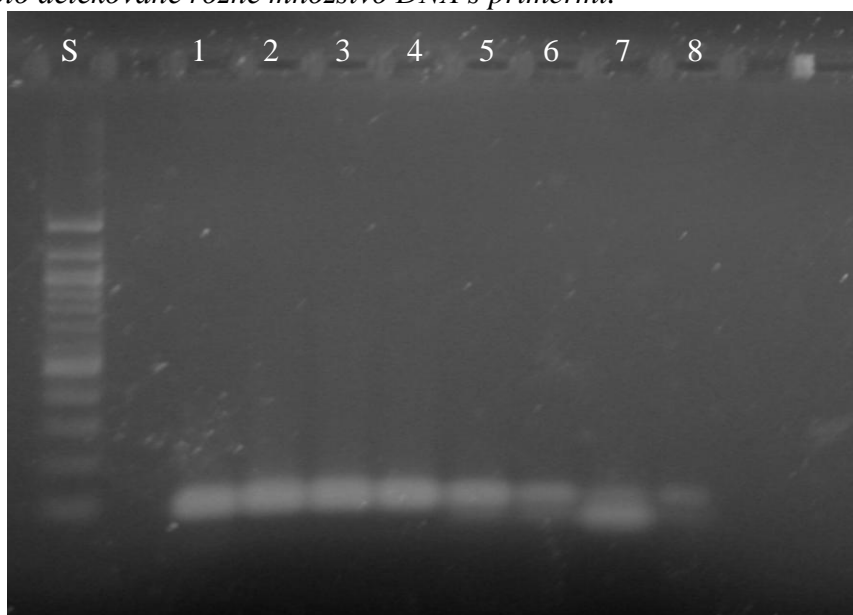
-.....nedetekovateľné

Po amplifikácii DNA bol detekovaný PCR produkt o veľkosti 92 bp. PCR produkty boli detekované u všetkých tabliet.

4.3.2 Citlivosť PCR pre rod *Lactobacillus*

PCR bola prevedená s DNA zbierkového kmeňa *L. fermentum* CCM 7192^T, ktorá bola vyriedená na 10ng, 1ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1fg. Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy sú zobrazené na Obr.12

Obr.12 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre rod Lactobacillus. Bolo detekované rôzne množstvo DNA s primermi.



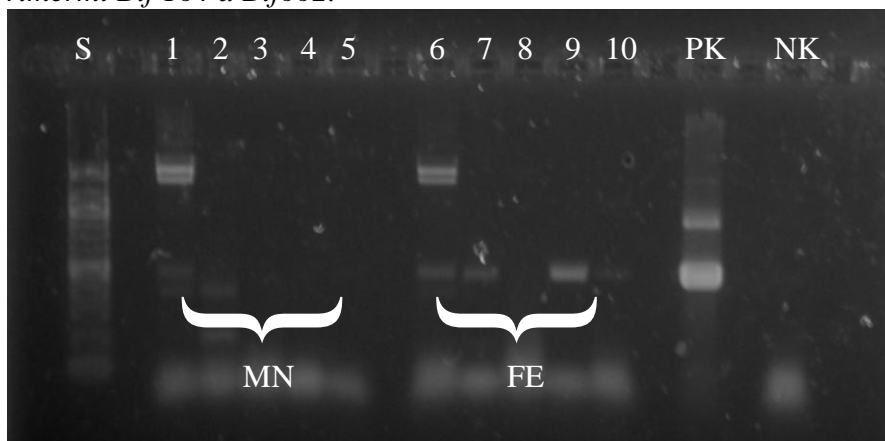
Beh	Množstvo DNA v PCR zmesi	PCR produkt
1.	10ng	+++
2.	1ng	+++
3.	100 pg	+++
4.	10 pg	+++
5.	1 pg	+++
6.	100 fg	+++
7.	10 fg	++
8.	1fg	++

Najnižšie množstvo DNA amplifikovateľnej v PCR za vzniku amplicónu detekovateľného na géle je 1 fg.

4.4 Rodovo špecifická PCR pre rod *Bifidobacterium*

K amplifikácii DNA rodu *Bifidobacterium* boli použité rodovo špecifické primery Bif 164 a Bif 662 s PCR produktom veľkosti 523 bp (Obr. 13). Amplifikácia rodovo špecifických PCR produktov prebiehala podľa programu BIFI ROD (viď Tabuľka 5) a namiešanie PCR zmesi je zapísané v Tabuľke.4 (viď. 3.5.4).

Obr. 13 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov (523 bp). Amplifikovaná bola DNA s primermi Bif 164 a Bif662.



Beh	Tableta	Metóda izolácie DNA	Množstvo DNA v PCR zmesi (ng)	PCR produkt
1.	Gynocaps	MN	27	+
2.	Fermalac vaginal		6	-
3.	Maldion		4,5	-
4.	Floragyn ovuli		24	-
5.	Gynolact		18	-
6.	Gynocaps	FE	30	++
7.	Fermalac vaginal		30	++
8.	Maldion		30	-
9.	Floragyn ovuli		30	+++
10.	Gynolact		30	+/-
11.	Pozitívna kontrola (10ng/μl)			+++
12.	Negatívna kontrola			-

FE - izolácia DNA fenolovou extrakciou s následným prizržaním ethanolom

MN – izolácia DNA pomocou magnetického nosiča

S – štandard

PK - pozitívna kontrola s DNA *B.breve* Reuter1963^{AL}

NK - negatívna kontrola

-/+,+,++,+++rôzna intenzita detekcie

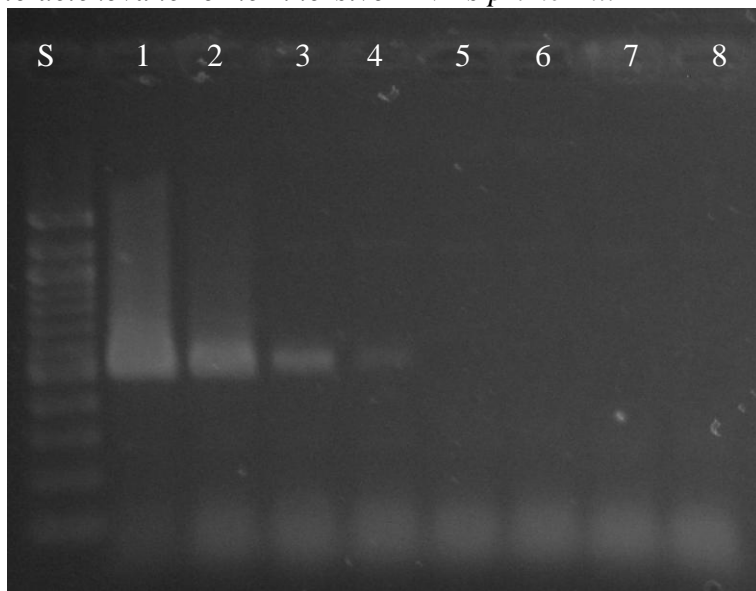
-.....nedetekovateľné

Po amplifikácii DNA bol detekovaný PCR produkt o veľkosti 523 bp. PCR produkty boli rôznej intenzity.

4.4.1 Citlivosť PCR pre rod *Bifidobacterium*

PCR bola prevedená s DNA zbierkového kmeňa *B.breve* Reuter1963^{AL}, ktorá bola vyriedená na 10ng, 1ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1fg. Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy sú zobrazené na Obr. 14

Obr.14 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre rod *Bifidobacterium*. Bolo detekované rôzne množstvo DNA s primermi.



Beh	Množstvo DNA v PCR zmesi	PCR produkt
1.	10ng	+++
2.	1ng	+++
3.	100 pg	++
4.	10 pg	+
5.	1 pg	-
6.	100 fg	-
7.	10 fg	-
8.	1fg	-

Najnižšie množstvo DNA amlifikovateľnej v PCR za vzniku amplikónu detekovateľného na géle je 10 pg.

4.5 Druhovo špecifická PCR pre druhy *Lactobacillus*

Boli prevedené druhovo špecifické PCR a zároveň bola stanovená citlivosť jednotlivých druhovo špecifických PCR pre druhy *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, pre skupinu – *Lactobacillus casei/paracasei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus delbrueckii*.

4.5.1 Druhovo špecifická PCR – *Lactobacillus acidophilus*

Na amplifikáciu DNA druhu *Lactobacillus acidophilus* bola použitá PCR s druhovo špecifickými primermi AciSI a 16SII. Amplifikovaný PCR produkt má dĺžku 750 bp (Obr. 15). Amplifikácia rodovo špecifických PCR produktov prebiehala podľa programu LBCRHA (viď Tabuľka 5) a namiešanie PCR zmesi je zapísané v Tabuľke 4 (viď. 3.5.4).

Obr.15 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov (750 bp). Amplifikovaná bola DNA s primermi AciSI a 16 SII.



Beh	Tableta	Metóda izolácie DNA	Množstvo DNA v PCR zmesi (ng)	PCR produkt
1.	Gynocaps	MN	45	-
2.	Fermalac vaginal		10	-
3.	Maldion		7,5	-
4.	Floragyn ovuli		40	-
5.	Gynolact		30	-
6.	Gynocaps	FE	50	-
7.	Fermalac vaginal		50	-
8.	Maldion		50	-
9.	Floragyn ovuli		50	-
10.	Gynolact		50	-
11.	Pozitívna kontrola (10ng/μl)			+++
12.	Negatívna kontrola			-

FE - izolácia DNA fenolovou extrakciou s následným prezrážaním ethanolom

MN – izolácia DNA pomocou magnetického nosiča

S – štandard

PK - pozitívna kontrola s DNA *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833^T

NK - negatívna kontrola

-/+,+,++,+++rôzna intenzita detekcie

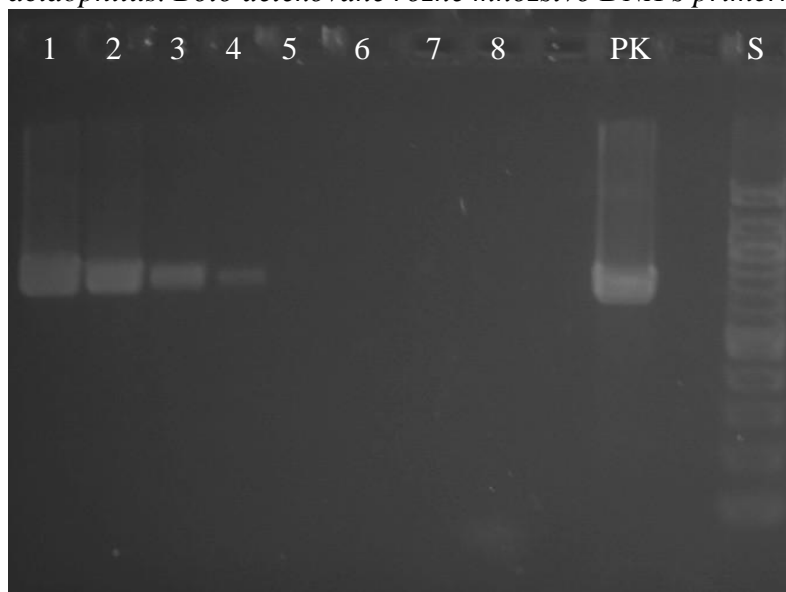
-.....nedetekovateľné

PCR produkty špecifické pre druh *L. acidophilus* neboli detekované.

4.5.2 Citlivosť PCR pre DNA *Lactobacillus acidophilus*

PCR bola prevedená s DNA zbierkového kmeňa *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833^T, ktorá bola vyriedená na 10ng, 1ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1fg. Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy sú zobrazené na Obr. 16

Obr.16 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre druh *Lactobacillus acidophilus*. Bolo detekované rôzne množstvo DNA s primermi.



Beh	Množstvo DNA v PCR zmesi	PCR produkt
1.	10ng	+++
2.	1ng	+++
3.	100 pg	++
4.	10 pg	++
5.	1 pg	-
6.	100 fg	-
7.	10 fg	-
8.	1fg	-

S-štandard

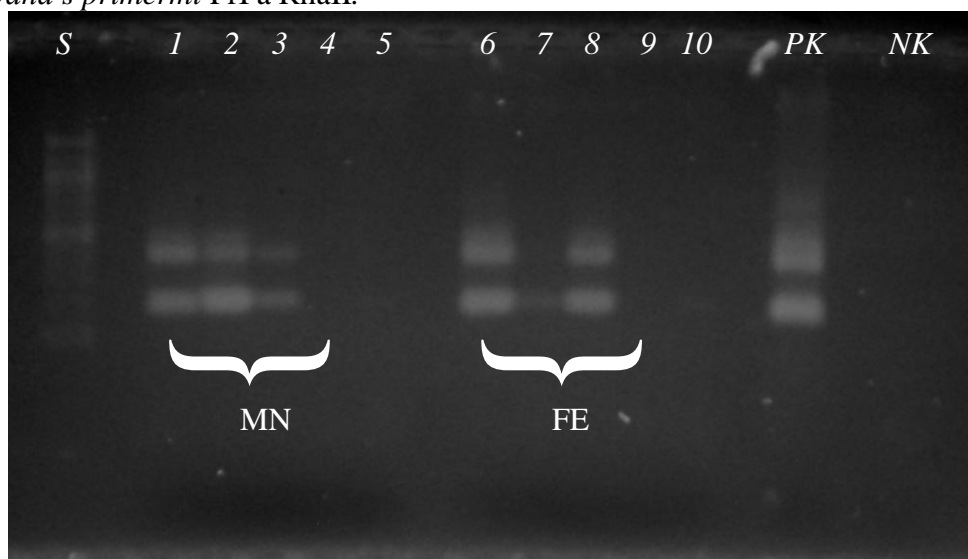
PK-pozitívna kontrola

Najnižšie množstvo DNA amlifikovateľnej v PCR za vzniku amplikónu detekovateľného na géle je 10 pg.

4.6 Druhovo špecifická PCR – *Lactobacillus rhamnosus*

Na preukázanie baktérií druhu *Lactobacillus rhamnosus* bola použitá PCR s druhovo špecifickými primermi PrI a RhaII. Boli detekované dva PCR produkty o veľkosti 400 a 200 bp (Obr. 17). Amplifikácia rodovo špecifických PCR produktov prebiehala podľa programu LBRHA (vid' Tabuľka 5) a namiešanie PCR zmesi je zapísané v Tabuľke 4 (vid'. 3.5.4).

Obr.17 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov (400 a 200 bp). DNA bola amplifikovaná s primermi PrI a RhaII.



Beh	Tableta	Metóda izolácie DNA	Množstvo DNA v PCR zmesi (ng)	PCR produkt
1.	Gynocaps	MN	27	+++
2.	Fermalac vaginal		6	+++
3.	Maldion		4,5	++
4.	Floragyn ovuli		24	-
5.	Gynolact		18	-
6.	Gynocaps	FE	30	+++
7.	Fermalac vaginal		30	+/-
8.	Maldion		30	+++
9.	Floragyn ovuli		30	-
10.	Gynolact		30	-
11.	Pozitívna kontrola (10ng/μl)			+++
12.	Negatívna kontrola			-

FE - izolácia DNA fenolovou extrakciou s následným prezrážaním ethanolom

MN – izolácia DNA pomocou magnetického nosiča

S – štandard

PK - pozitívna kontrola s DNA *Lb. rhamnosus* CCM 1825^T

NK - negatívna kontrola

-/+,+,++,+++rôzna intenzita detekcie

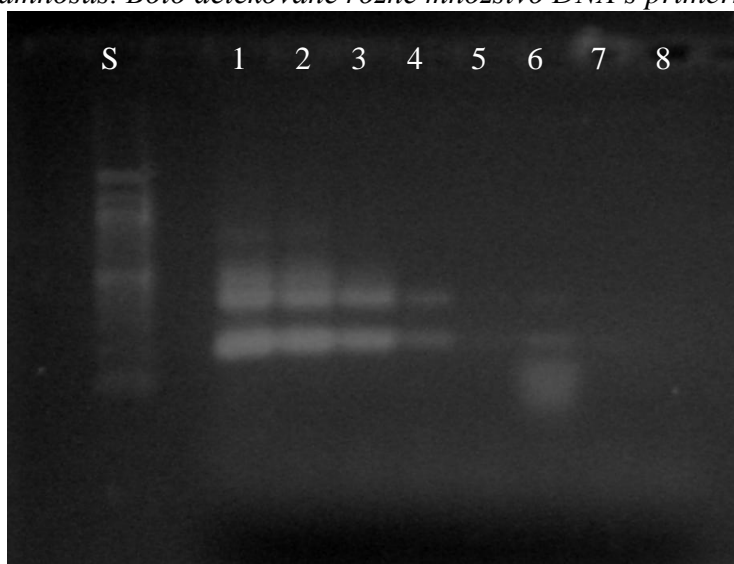
-.....nedetekovateľné

Boli detekované PCR produkty rôznej intenzity o veľkosti 400 a 200 bp po amplifikácii DNA. *L. rhamnosus* bol prekázaný u 3 výrobkov – (Gynocaps, Fermalac vaginal a Maldion).

4.6.1 Citlivosť PCR pre druh *Lactobacillus rhamnosus*

PCR bola prevedená s DNA zbierkového kmeňa *Lb. rhamnosus* CCM 1825^T, ktorá bola vyriedená na 10ng, 1ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1fg. Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy sú zobrazené na Obr. 18

Obr.18 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre druh *Lactobacillus rhamnosus*. Bolo detekované rôzne množstvo DNA s primermi.



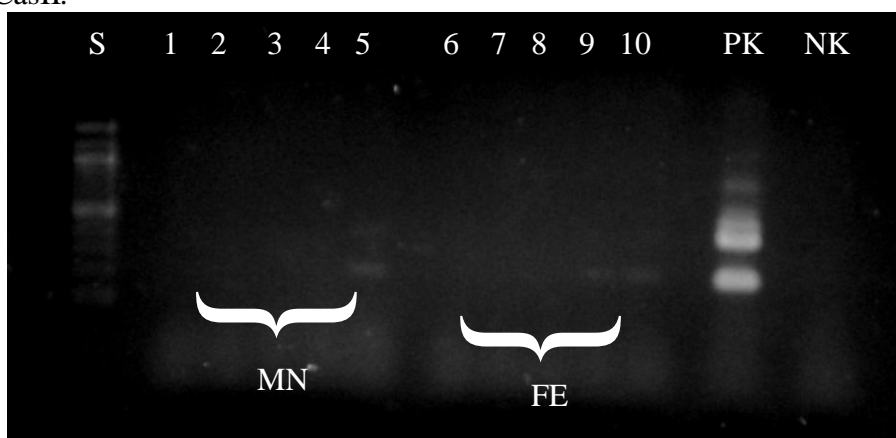
Beh	Množstvo DNA v PCR zmesi	PCR produkt
1.	10ng	+++
2.	1ng	+++
3.	100 pg	+++
4.	10 pg	+
5.	1 pg	+/-
6.	100 fg	+
7.	10 fg	-
8.	1fg	-

Najnižšie množstvo DNA amplifikovateľnej v PCR za vzniku amplicónu detekovateľného na géle je 100 fg.

4.7 PCR špecifická pre skupinu – *Lactobacillus casei/paracasei*

Na preukázanie prítomnosti baktérií skupiny *Lactobacillus casei/paracasei* bola použitá PCR s druhovo špecifickými primermi pre PrI a CasII. Amplifikovali sa dva PCR produkty o veľkosti 400 a 200 bp. Detekcia PCR produktov je uvedená na Obr. 19. Amplifikácia rodovo špecifických PCR produktov prebiehala podľa programu LBCCAS (vid' Tabuľka 5) a namiešanie PCR zmesi je zapísané v Tabuľke 4 (vid' 3.5.4).

Obr.19 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov (400 a 200 bp) s primermi PrI a CasII.



Beh	Tableta	Metóda izolácie DNA	Množstvo DNA v PCR zmesi (ng)	PCR produkt
1.	Gynocaps	MN	45	-
2.	Fermalac vaginal		10	-
3.	Maldion		7,5	-
4.	Floragyn ovuli		40	-
5.	Gynolact		30	+/-
6.	Gynocaps	FE	50	-
7.	Fermalac vaginal		50	-
8.	Maldion		50	-
9.	Floragyn ovuli		50	+/-
10.	Gynolact		50	+/-
11.	Pozitívna kontrola (10ng/μl)			+++
12.	Negatívna kontrola			-

FE - izolácia DNA fenolovou extrakciou s následným prezrážaním ethanolom

MN – izolácia DNA pomocou magnetického nosiča

S – štandard

PK - pozitívna kontrola s DNA *L. paracasei* ssp. *paracasei* CCM 1753^T

NK - negatívna kontrola

-/+,+,++,+++rôzna intenzita detekcie

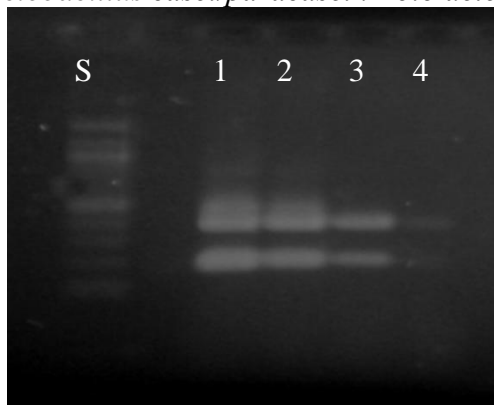
-.....nedetekovateľné

Boli detekované PCR produkty o veľkosti 400 a 200 bp minimálnej intenzity u dvoch výrobkov.

4.7.1 Citlivosť PCR pre skupinu *Lactobacillus casei/paracasei*

PCR bola prevedená s DNA zbierkového kmeňa *L. paracasei* ssp. *paracasei* CCM 1753^T, ktorá bola vyriedená na 10ng, 1ng, 100 pg, 10 pg. Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy sú zobrazené na Obr. 20.

Obr.20 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre skupinu *Lactobacillus casei/paracasei*. Bolo detekované rôzne množstvo DNA s primermi.



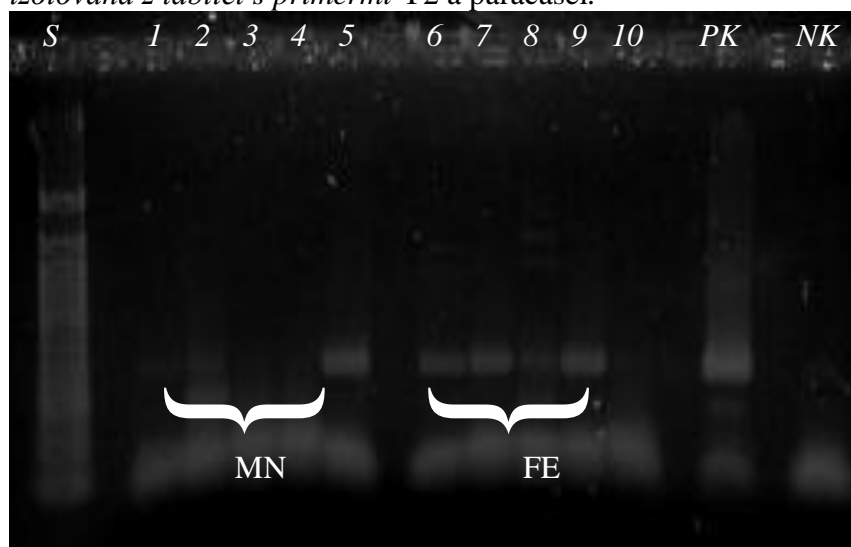
Beh	Množstvo DNA v PCR zmesi	PCR produkt
1.	10ng	+++
2.	1ng	+++
3.	100 pg	+++
4.	10 pg	+/-

Najnižšie množstvo DNA amlifikovateľnej v PCR za vzniku amplicónu detekovateľného na géle je 100 pg.

4.8 Druhovo špecifická PCR – *Lactobacillus paracasei*

Na zaradenie bakteriálnych kmeňov do druhu *Lactobacillus paracasei* bola použitá PCR s druhovo špecifickými primermi Y2 a paracasei. Bol detekovaný PCR produkt o veľkosti 290 bp (Obr.21). Amplifikácia rodovo špecifických PCR produktov prebiehala podľa programu LBCRHA (viď Tabuľka 5) a namiešanie PCR zmesi je zapísané v Tabuľke.4 (viď. 3.5.4).

Obr. 21 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov (290 bp). Bola amplifikovaná DNA izolovaná z tabliet s primermi Y2 a paracasei.



Beh	Tableta	Metóda izolácie DNA	Množstvo DNA v PCR zmesi (ng)	PCR produkt
1.	Gynocaps	MN	27	+/-
2.	Fermalac vaginal		6	+
3.	Maldion		4,5	-
4.	Floragyn ovuli		24	-
5.	Gynolact		18	+++
6.	Gynocaps	FE	30	++
7.	Fermalac vaginal		30	+++
8.	Maldion		30	+
9.	Floragyn ovuli		30	+++
10.	Gynolact		30	-
11.	Pozitívna kontrola (10ng/μl)			+++
12.	Negatívna kontrola			-

FE - izolácia DNA fenolovou extrakciou s následným prezrážaním ethanolom

MN – izolácia DNA pomocou magnetického nosiča

S – štandard

PK - pozitívna kontrola s DNA *L. paracasei* ssp. *paracasei* CCM 1753^T

NK - negatívna kontrola

-/+,+,++,+++rôzna intenzita detekcie

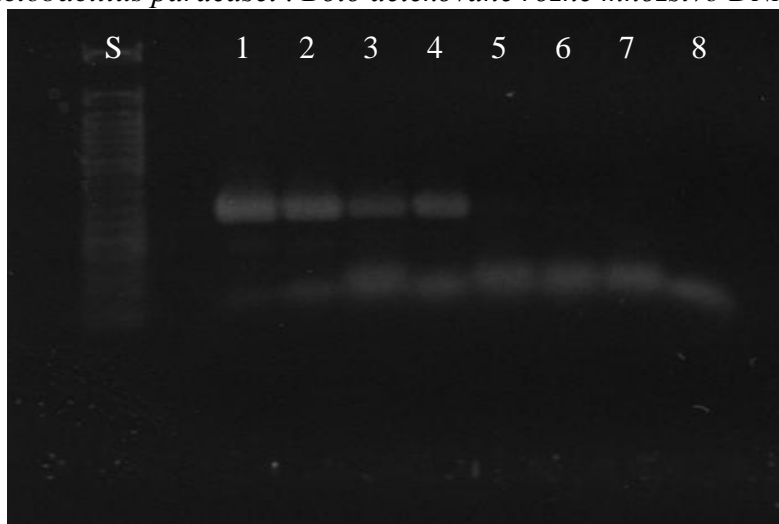
-.....nedetekovateľné

Špecifické PCR produkty (290 bp) boli detekované u všetkých výrobkov. PCR produkty boli rôznej intenzity.

4.8.1 Citlivosť PCR pre druh *Lactobacillus paracasei*

PCR bola prevedená s DNA zbierkového kmeňa *L. paracasei* ssp. *paracasei* CCM 1753^T, ktorá bola vyriedená na 10ng, 1ng, 100 pg, 10 pg. Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy sú zobrazené na Obr. 22

Obr.22 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre druh *Lactobacillus paracasei*. Bolo detekované rôzne množstvo DNA s primermi.



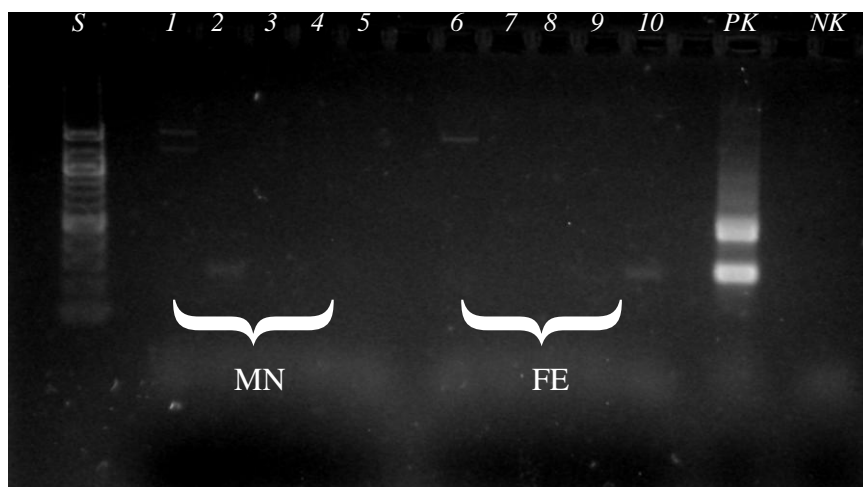
Beh	Množstvo DNA v PCR zmesi	PCR produkt
1.	10ng	+++
2.	1ng	+++
3.	100 pg	+++
4.	10 pg	+++
5.	1 pg	+/-
6.	100 fg	+/-
7.	10 fg	-
8.	1fg	-

Najnižšie množstvo DNA amifikovateľnej v PCR za vzniku ampikónu detekovateľného na géle je 100 fg .

4.9 Druhovo špecifická PCR – *Lactobacillus plantarum*

Na zaradenie bakteriálnych kmeňov do druhu *Lactobacillus plantarum* bola použitá PCR s druhovo špecifickými primermi Lfpr(PlanI) a PlanII. Bol detekovaný PCR produkt o veľkosti 250 a 500 bp (Obr. 23). Amplifikácia rodovo špecifických PCR produktov prebiehala podľa programu LBCRHA (viď Tabuľka 5) a namiešanie PCR zmesi je zapísané v Tabuľke.4 (viď. 3.5.4).

Obr.23 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov po amplifikácii DNA izolovanej z tabliet metódou FE a MN (250 a 500 bp) s primermi Lfpr(PlanI) a PlanII



Beh	Tableta	Metóda izolácie DNA	Množstvo DNA v PCR zmesi (ng)	PCR produkt
1.	Gynocaps	MN	27	-
2.	Fermalac vaginal		6	+
3.	Maldion		4,5	-
4.	Floragyn ovuli		24	-
5.	Gynolact		18	-
6.	Gynocaps	FE	30	-
7.	Fermalac vaginal		30	-
8.	Maldion		30	-
9.	Floragyn ovuli		30	-
10.	Gynolact		30	+
11.	Pozitívna kontrola (10ng/μl)			+++
12.	Negatívna kontrola			-

FE - izolácia DNA fenolovou extrakciou s následným prezrážaním ethanolom

MN – izolácia DNA pomocou magnetického nosiča

S – štandard

PK - pozitívna kontrola s DNA *L. plantarum* CCM 7039^T

NK - negatívna kontrola

-/+,+,++,+++rôzna intenzita detekcie

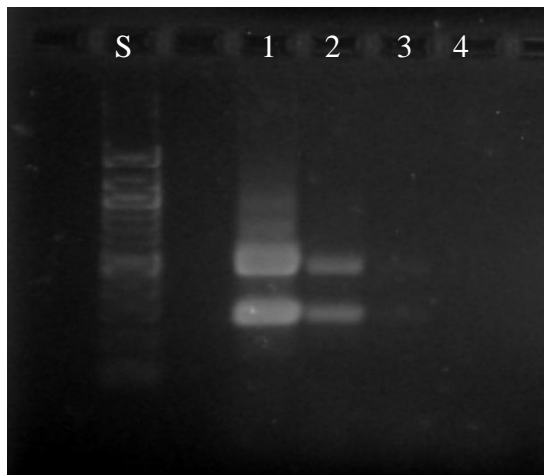
-.....nedetekovateľné

PCR produkty špecifické pre druh *L. plantarum* boli detekované u dvoch výrobkov, boli veľmi slabej intenzity.

4.9.1 Citlivosť PCR pre druh *Lactobacillus plantarum*

PCR bola prevedená s DNA zbierkového kmeňa *Lactobacillus plantarum* CCM 7039^T, ktorá bola vyriedená na 10ng, 1ng, 100 pg, 10 pg. Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy sú zobrazené na Obr. 24

Obr.24 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre druh *Lactobacillus plantarum*. Bolo detekované rôzne množstvo DNA s primermi.



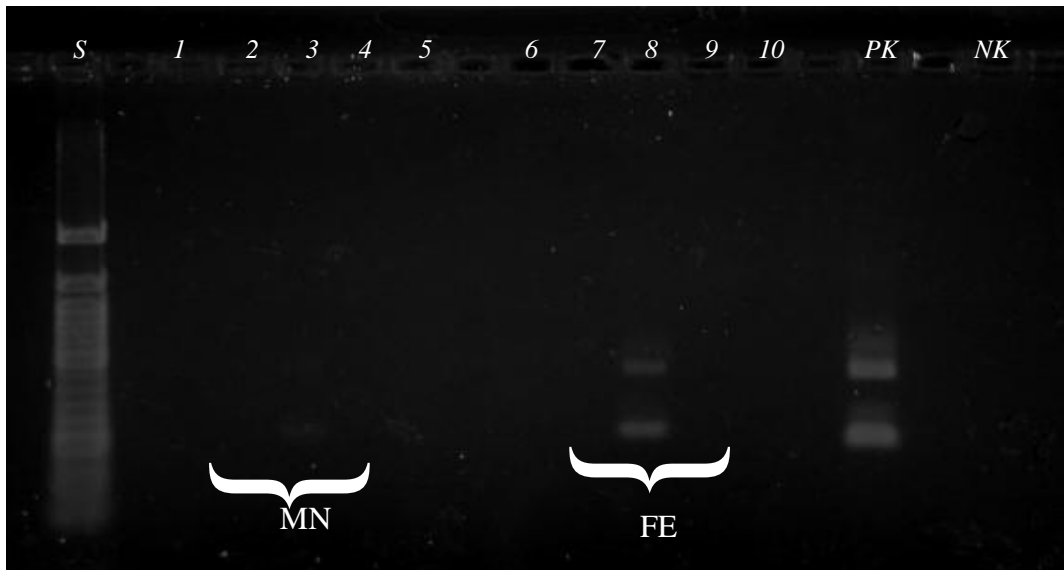
Beh	Množstvo DNA v PCR zmesi	PCR produkt
1.	10ng	+++
2.	1ng	++
3.	100 pg	+
4.	10 pg	-

Najnižšie množstvo DNA amlifikovateľnej v PCR za vzniku amplikónu detekovateľného na géle je 100 pg.

4.10 Druhovo špecifická PCR – *Lactobacillus gasseri*

Na zaradenie bakteriálnych kmeňov do druhu *Lactobacillus gasseri* bola použitá PCR s druhovo špecifickými primermi GasI a GasII. Bol detekovaný špecifický PCR produkt (Obr. 25). Amplifikácia rodovo špecifických PCR produktov prebiehala podľa programu LBCCAS (viď Tabuľka 5) a namiešanie PCR zmesi je zapísané v Tabuľke.4 (viď. 3.5.4).

Obr. 25 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov. Amplifikovaná bola DNA s primermi GasI a GasII.



Beh	Tableta	Metóda izolácie DNA	Množstvo DNA v PCR zmesi (ng)	PCR produkt
1.	Gynocaps	MN	27	-
2.	Fermalac vaginal		6	-
3.	Maldion		4,5	+/-
4.	Floragyn ovuli		24	-
5.	Gynolact		18	-
6.	Gynocaps	FE	30	-
7.	Fermalac vaginal		30	-
8.	Maldion		30	++
9.	Floragyn ovuli		30	-
10.	Gynolact		30	-
11.	Pozitívna kontrola (10ng/μl)			+++
12.	Negatívna kontrola			-

FE - izolácia DNA fenolovou extrakciou s následným prezrážaním ethanolom

MN – izolácia DNA pomocou magnetického nosiča

S – štandard

PK - pozitívna kontrola s DNA *L. gasseri*

NK - negatívna kontrola

-/+ , + , ++ , +++rôzna intenzita detekcie

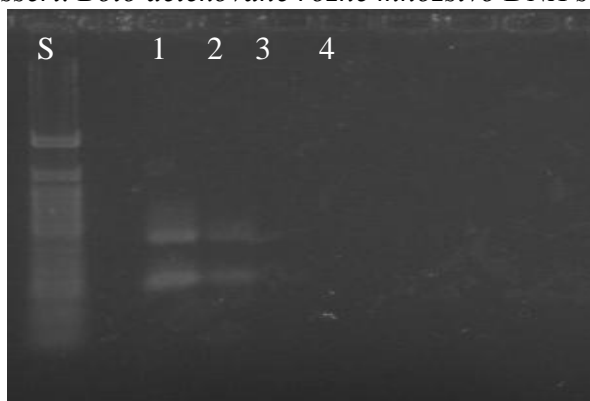
-nedetekovateľné

Špecifický PCR produkt bol detekovaný u 1 výrobku.

4.10.1 Citlivosť PCR pre druh *Lactobacillus gasseri*

PCR bola prevedená s DNA zbierkového kmeňa *Lactobacillus gasseri*, ktorá bola vyriedená na 10ng, 1ng, 100 pg, 10 pg. Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy sú zobrazené na Obr. 26

Obr.26 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre druh *Lactobacillus gasseri*. Bolo detekované rôzne množstvo DNA s primermi.



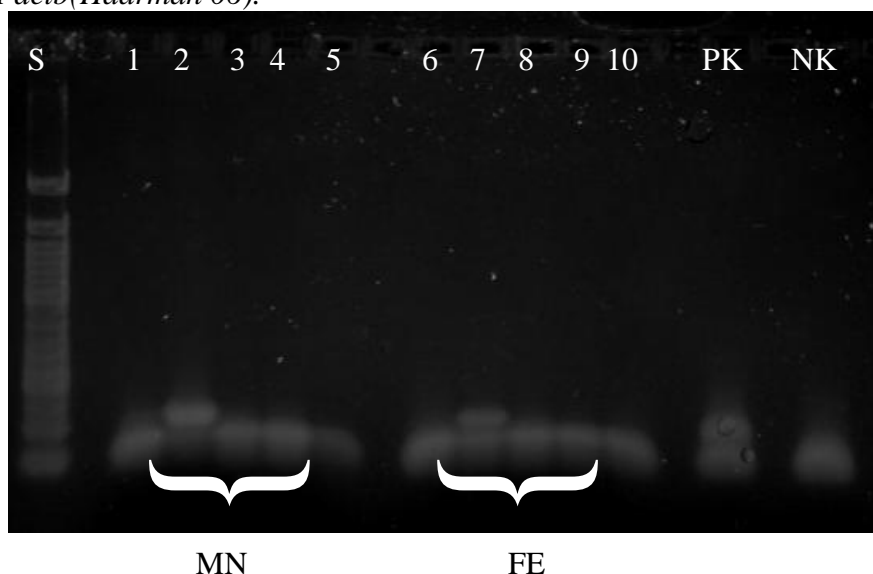
Beh	Množstvo DNA v PCR zmesi	PCR produkt
1.	10ng	++
2.	1ng	+
3.	100 pg	-
4.	10 pg	-

Najnižšie množstvo DNA amplifikovateľnej v PCR za vzniku amplikónu detekovateľného na géle je 1 ng.

4.11 Druhovo špecifická PCR – *Lactobacillus delbrueckii*

Na zaradenie bakteriálnych kmeňov do druhu *Lactobacillus delbrueckii* bola použitá PCR s druhovo špecifickými primermi Rdelb a Fdelb (Haarman 06). Bol detekovaný PCR produkt o veľkosti 94 bp (Obr. 27). Amplifikácia rodovo špecifických PCR produktov prebiehala podľa programu STRTHER (vid' Tabuľka 5) a namiešanie PCR zmesi je zapísané v Tabuľke 4 (vid'.3.5.4).

Obr.27 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov (94 bp) s primermi Rdelb a Fdelb(Haarman 06).



Beh	Tableta	Metóda izolácie DNA	Množstvo DNA v PCR zmesi (ng)	PCR produkt
1.	Gynocaps	MN	9	-
2.	Fermalac vaginal		2	+++
3.	Maldion		1,5	-
4.	Floragyn ovuli		8	-
5.	Gynolact		6	-
6.	Gynocaps	FE	10	-
7.	Fermalac vaginal		10	+++
8.	Maldion		10	-
9.	Floragyn ovuli		10	-
10.	Gynolact		10	-
11.	Pozitívna kontrola (10ng/μl)			+++
12.	Negatívna kontrola			-

FE - izolácia DNA fenolovou extrakciou s následným prezrážaním ethanolom

MN – izolácia DNA pomocou magnetického nosiča

S – štandard

PK - pozitívna kontrola s DNA *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CCM 7190^T

NK - negatívna kontrola

-/+,+,++,+++rôzna intenzita detekcie

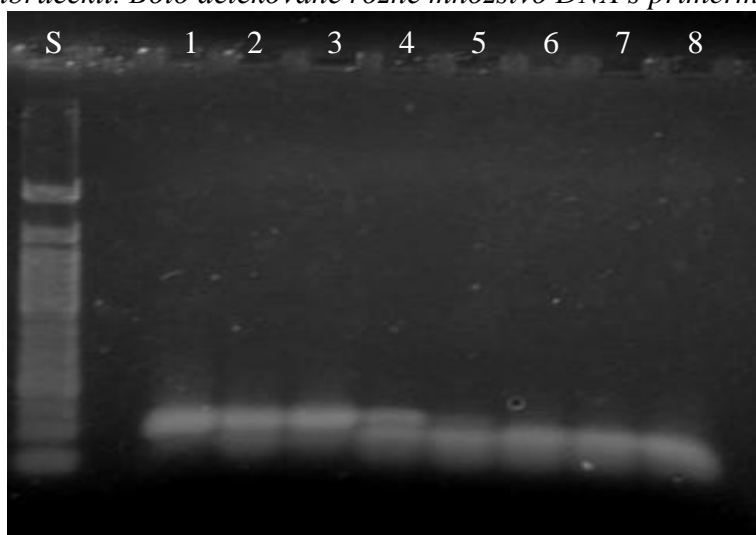
-.....nedetekovateľné

Po amplifikácii DNA izolovaných zo vzoriek bol detekovaný PCR produkt o veľkosti 94 bp. PCR produkty boli rôznej intenzity. PCR produkt špecifický pre druh *Lactobacillus delbrueckii* bol detekovaný po amplifikácii DNA u jedného výrobku.

4.11.1 Citlivosť PCR pre druh *Lactobacillus delbrueckii*

PCR bola prevedená s DNA zbierkového kmeňa *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 7190^T, ktorá bola vyriedená na 10ng, 1ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1fg. Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy sú zobrazené na Obr. 28

Obr.28 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre druh *Lactobacillus delbrueckii*. Bolo detekované rôzne množstvo DNA s primermi.



Beh	Množstvo DNA v PCR zmesi	PCR produkt
1.	10ng	+++
2.	1ng	+++
3.	100 pg	+++
4.	10 pg	+++
5.	1 pg	+
6.	100 fg	-
7.	10 fg	-
8.	1fg	-

Najnižšie množstvo DNA amlifikovateľnej v PCR za vzniku amplikónu detekovateľného na géle je 1 pg.

4.12 Druhovo špecifická PCR – *Streptococcus thermophilus*

Na zaradenie bakteriálnych kmeňov do druhu *Streptococcus thermophilus* bola použitá PCR s druhovo špecifickými primermi Sthermoph1 a Sthermoph2. Bol detekovaný PCR produkt o veľkosti 968 bp (Obr. 29). Amplifikácia rodovo špecifických PCR produktov prebiehala podľa programu STRTHER (viď Tabuľka 5) a namiešanie PCR zmesi je zapísané v Tabuľke 4 (viď 3.5.4).

Obr.29 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov (968 bp). DNA bola amplifikovaná s primermi *Sthermoph1* a *Sthermoph2*.



Beh	Tableta	Metóda izolácie DNA	Množstvo DNA v PCR zmesi (ng)	Detekcia PCR produktu
1.	Gynocaps	MN	27	-
2.	Fermalac vaginal		6	+++
3.	Maldion		4,5	-
4.	Floragyn ovuli		24	-
5.	Gynolact		18	-
6.	Gynocaps	FE	30	-
7.	Fermalac vaginal		30	+
8.	Maldion		30	-
9.	Floragyn ovuli		30	-
10.	Gynolact		30	-
11.	Pozitívna kontrola (10ng/μl)			+++
12.	Negatívna kontrola			-

FE - izolácia DNA fenolovou extrakciou s následným prezrážaním ethanolom

MN – izolácia DNA pomocou magnetického nosiča

S – štandar

PK - pozitívna kontrola s DNA *Streptococcus thermophilus* CCM 4757

NK - negatívna kontrola

-/+,+,++,+++rôzna intenzita detekcie

-.....nedetekovateľné

Špecifický PCR produkt o veľkosti 968 bp bol prekázaný v jednom výrobku.

4.12.1 Citlivosť PCR pre druh *Streptococcus thermophilus*

PCR bola prevedená s DNA zbierkového kmeňa *Streptococcus thermophilus* CCM 4757, ktorá bola vyriedená na 10ng, 1ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1fg. Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy sú zobrazené na Obr. 30.

Obr.30 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre druh *Streptococcus thermophilus*. Bolo detekované rôzne množstvo DNA s primermi.



Beh	Množstvo DNA v PCR zmesi	PCR produkt
1.	10ng	++++
2.	1ng	++++
3.	100 pg	+++
4.	10 pg	+++
5.	1 pg	++
6.	100 fg	+
7.	10 fg	+/-
8.	1fg	-

Najnižšie množstvo DNA amplifikovateľnej v PCR za vzniku amplikónu detekovateľného na géle je 10 fg.

4.13 Výsledky rodovej a druhovej identifikácie vaginálnych tabliet

Výsledky uvedené v Tabuľke. V Tabuľke je uvedená i citlivosť PCR pre jednotlivé PCR.

Rodová a druhová identifikácia	Citlivosť PCR	Detekované v tablete č.
rod <i>Lactobacillus</i>	1 fg	1,2,3,5
rod <i>Bifidobacterium</i>	10 pg	1,2,4,5
druh <i>L. acidophilus</i>	10 pg	nedetekované
druh <i>L. rhamnosus</i>	100 fg	1,2,3
skupina <i>L. casei/paracasei</i>	10 pg	4,5
druh <i>L. paracasei</i>	100 fg	1,2,3,4,5
druh <i>L. plantarum</i>	100 pg	2,5
druh <i>L. gasseri</i>	1 ng	3
druh <i>L. delbrueckii</i>	1 pg	2
druh <i>Streptococcus thermophilus</i>	10 fg	2

Citlivosť PCR- Najnižšie množstvo DNA amplifikovateľnej v PCR za vzniku amplicónu detekovateľného na géle

4.14 Zrovnanie deklarovaného zloženia daného výrobcom s identifikáciou pomocou PCR

Tableta	Deklarované zloženie	PCR	PCR
		Zhodná identifikácia	Nezhodná identifikácia
1. Gynocaps	<i>Lactobacillus casei</i> variety <i>Rhamnosus Döderlein</i>	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. paracasei</i>	rod <i>Bifidobacterium</i>
2. Fermalac vaginal	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>L. paracasei</i> <i>L. plantarum</i> rod <i>Bifidobacterium</i>
3. Maldion	<i>L. gasseri</i> <i>L. rhamnosus</i>	<i>L. gasseri</i> <i>L. rhamnosus</i>	
4. Floragyn ovuli	<i>L. bulgaricus</i> <i>L. biphidus</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. thermophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. plantharum</i>	<i>L. casei/paracasei</i> <i>L. paracasei</i>	rod <i>Bifidobacterium</i>
5. Gynolact	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. casei</i> <i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lb. casei/paracasei</i> <i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. plantarum</i> rod <i>Bifidobacterium</i>

5 DISKUSIA

5.1 Izolácia bakteriálnej DNA a spektrofotometrické stanovenie

DNA z piatich vaginálnych tabliet bola izolovaná a purifikovaná metódou fenolovej extrakcie i pomocou magnetického nosiča P(HEMA-co-GMA) . Pre zistenie koncentrácie a čistoty izolovanej DNA z tabliet bola spektrofotometricky zameraná absorbancia v rozsahu vlnových dĺžok (220-320 nm)³⁵. Koncentrácia DNA bola v rozmedzí 1,5-157 ng/μl. Veľké rozmedzie koncentrácie DNA mohlo byť spôsobené inhibítormi DNA.

DNA po fenolovej extrakcii bola vyriedená na 10 ng/μl. DNA izolovaná pomocou magnetického nosiča sa neriedila z dôvodu nízkej koncentrácie a 1-5 ng/μl (záležalo na druhu tablety) bolo ďalej použité pre DNA amplifikačné metódy.

5.2 PCR pre domému *Bacteria*

Izolovaná DNA zo všetkých tabliet je amplifikovateľná. Po amplifikácii DNA boli detekované PCR produkty (466 bp) u všetkých tabliet jak izolovanej DNA metódou fenolovej extrakcie s následným prezrážaním etanolom tak i izolovanej DNA pomocou magnetického nosiča P(HEMA-co-GMA) z hrubých lyzátoov buniek, čo potvrdilo ich zaradenie do domény *Bacteria*.³⁶

5.3 Rodovo špecifická PCR pre *Lactobacillus*

PCR produkt odpovedajúci rodu *Lactobacillus* (92 bp) bol detekovaný u všetkých tabliet vo veľmi dobrej intenzite jak u izolovanej DNA metódou fenolovej extrakcie s následným prezrážaním etanolom tak i izolovanej DNA pomocou magnetického nosiča .³⁶

5.4 Rodovo špecifická PCR pre *Bifidobacterium*

S využitím rodovo špecifických primerov bolo zistené, že v štyroch z piatich testovaných tabliet bol detekovaný PCR produkt odpovedajúci rodu *Bifidobacterium* (523 bp), čo neodpovedá deklarovanému popisu tabliet.³⁷ DNA izolovaná z prvej tablety bol detekovaný produkt, jak pomocou magnetického nosiča, tak i pomocou fenolovej extrakcie s následným prezrážaním ethanolom. U posledných dvoch tabliet bol preukázaný produkt iba pomocou fenolovej extrakcie. U tablety č.3 rod *Bifidobacterium* preukázaný nebol.

5.5 Amplifikácia DNA s druhovo špecifickými primermi pre *Lactobacillus acidophilus*

S využitím druhovo špecifických primerov boli testované vzorky, či obsahujú *L. acidophilus*.³⁸ PCR produkt odpovedajúci *L. acidophilus* (750 bp) sa nepodarilo detekovať u žiadnej z DNA izolovanej z tabliet i po opakovanej analýze i napriek tomu, že tento druh bol deklarovaný u dvoch z piatich tabliet.

5.6 Amplifikácia DNA s druhovo špecifickými primermi pre *Lactobacillus rhamnosus*

Pre zaradenie vzoriek do druhu *L. rhamnosus* boli použité druhovo špecifické primery. PCR produkt odpovedajúci *L. rhamnosus* (400 a 200 bp) sa podarilo detekovať u prvých troch tabliet³⁸. Rozdiel bol iba v intenzite bandov.

Pomocou magnetického nosiča (beh č. 1-3) sa amplifikovali prvé tri vzorky pričom tretí band sa prejavil slabšou intenzitou, pomocou fenolovej extrakcie s následným prezrážaním ethanolom sa prejavili takisto prvé tri vzorky, avšak intenzita u druhej vzorky bola minimálna.

Podarilo sa preukázať *L. rhamnosus* u prvých troch tabliet, kde bol aj deklarovaný, u piatej tablety, kde bol tento druh deklarovaný, sa ho preukázať nepodarilo.

5.7 Amplifikácia DNA s druhovo špecifickými primermi pre skupinu *Lactobacillus casei/paracasei*

S využitím druhovo špecifických primerov bolo testované, či vzorky obsahujú *L. casei/paracasei*.³⁸ PCR produkt odpovedajúci *L. casei/paracasei* (400 a 200 bp) sa podarilo detekovať iba v minimálnej intenzite u behu č. 5, 9, 10, čo podľa intenzity PCR pre daný druh možno pokladať za menej ako 10 pg/μl vo vzorke.

5.8 Amplifikácia DNA s druhovo špecifickými primermi pre *Lactobacillus paracasei*

PCR produkt odpovedajúci *L. paracasei* (290 bp)³⁹ sa podarilo detekovať u behu č. 1 v minimálnej intenzite a v behu č. 5 vo veľmi dobrej intenzite, čo predstavuje vzorky izolované pomocou magnetického nosiča. U behov č. 6,7,8,9, čo predstavuje DNA izolovanú fenolovou extrakciou s následným prezrážaním ethanolom, bola dobrá intenzita bandov, v 10. behu bola minimálna. Tieto výsledky nie sú v zhode s deklarovanými.

5.9 Amplifikácia DNA s druhovo špecifickými primermi pre *Lactobacillus plantarum*

Pre zaradenie vzoriek do druhu *L. plantarum* boli použité druhovo špecifické primery. ³⁸ PCR produkt odpovedajúci *L. plantarum* (250 a 500 bp) sa podarilo detekovať vo veľmi slabej intenzite u behu č. 2, čo predstavuje vzorky izolované pomocou magnetického nosiča a u behu č.10, čo predstavuje DNA izolovanú fenolovou extrakciou s následným prezrážaním ethanolom. Získané výsledky nie sú zhodné s údajmi uvedenými výrobcami.

5.10 Amplifikácia DNA s druhovo špecifickými primermi pre *Lactobacillus gasseri*

Špecifický PCR produkt odpovedajúci *L. gasseri* sa podarilo detekovať u druhej tablety jak u izolovanej DNA metódou fenolovej extrakcie s následným prezrážaním etanolom tak i vyizolovanej DNA pomocou magnetického nosiča. ³⁴

5.11 Amplifikácia DNA s druhovo špecifickými primermi pre *Lactobacillus delbrueckii*

PCR produkt odpovedajúci *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (94 bp) sa podarilo detekovať u druhej tablety z DNA izolovanej jak pomocou magnetického nosiča, tak i pomocou fenolovej extrakcie s následným prezrážaním ethanolom. ³⁶ Pri detekcii PCR produktu *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* sa vytvárali silné diméry primérov. Napriek tomu sa podarilo preukázať tento druh u tablety č. 2, kde bol aj deklarovaný. V tablete č. 4, kde bol tento druh deklarovaný, sa ho nepodarilo preukázať.

5.12 Amplifikácia DNA s druhovo špecifickými primermi pre *Streptococcus thermophilus*

PCR produkt odpovedajúci *Streptococcus thermophilus* (968 bp) sa podarilo detekovať u druhej tablety, kde bol aj deklarovaný. Rozdiel bol v intenzite bandov. ⁴⁰ Pomocou magnetického nosiča sa amplifikoval silný band, pomocou fenolovej extrakcie s následným prezrážaním ethanolom sa detekoval band slabej intenzity. U tablety č. 4, kde bol tento druh deklarovaný, sa ho nepodarilo preukázať.

Potvrdenie výsledkov vyžaduje použitie ďalších molekulárne-biologických metód.

6 ZÁVER

Cieľom práce bolo preukázať probiotické bakterie v 5 rôznych vaginálnych tabletkách pomocou molekulárne-biologických metód. K izolácii DNA z hrubých lyzátov buniek boli použité magnetické neporézne mikročastice P(HEMA-co-GMA) pokryté karboxylovými skupinami. Ako kontrola bola použitá DNA izolovaná metódou fenolovej extrakcie s následným prezrážaním ethanolom. Koncentrácia DNA bola stanovená spektrofotometricky.

K identifikácii DNA z tabliet boli použité primery pre špecifickú DNA domény, rodu a druhu. PCR zmes obsahovala rôzne množstvo DNA (v rozsahu 1,5-50ng DNA). Amplifikovaný PCR produkt bol detekovaný pomocou agarózovej gélovej elektroforézy s následným ofarbením gélu ethidiumbromidom. Získané výsledky identifikácie baktérií pomocou PCR boli porovnané s údajmi uvedenými výrobcami.

Magnetický nosič bol vhodný pre izoláciu DNA kompatibilný s PCR. DNA izolovaná z vaginálnych tabliet bola pomocou PCR metód zaradená do rodu *Lactobacillus* a druhov *L. rhamnosus*, skupiny *L. casei/paracasei*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. gasseri*, *L. delbrueckii* a *Streptococcus thermophilus*. Druh *L. acidophilus* sa nepodarilo detekovať v žiadnej tablete. Zhodná identifikácia bakteriálnych druhov bola preukázaná u jedného druhu tabliet (Maldion).

7 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- ¹ Barrons, R., Tassone, D.: *Use of Lactobacillus Probiotics for Bacterial Genitourinary Infections in Women: A Review*, Clinical Therapeutics/volume 30, number 3, 2008
- ² Kuchta, M., Pružinec, P. a kol.: *Probiotiká, ich miesto a využitie v medicíne*, 1.vyd. Bratislava: Bonus CCS s.r.o., 2006. 163 s. ISBN 80-968491-7-4
- ³ Hudecová, D., Majtán, V.: *Mikrobiológia I*, 1. vyd. Bratislava: STU, 2002. 189 s. ISBN 80-227-1663-4
- ⁴ Ouwehand, A. C., Salminen, S., Isolauri, E.: *Probiotics: an overview of beneficial effect*. 2002. Antonie van Leeuwenhoek 82: 279 – 289.
- ⁵ Mach, I.: *Doplňky stravy*, 1. vyd. Praha: Svoboda Servis, 2004. 157 s. ISBN 80-86320-34-0
- ⁶ Votava, M. a kol.: *Lékařská mikrobiologie speciální*, Brno: NEPTUN, 2003. 495 s. ISBN 80-902896-6-5
- ⁷ Votava, M.: *Lékařská mikrobiologie obecná*, 2. prepr. vyd. Brno: NEPTUN, 2005. 351 s. ISBN 80-86850-00-5
- ⁸ Morelli, L., Zonenschain, D., Del Piano, M., Cognein, P.: *Utilization of the intestinal tract as a delivery system for urogenital probiotics*. J Clin Gastroenterol. 2004;38:S107-S110
- ⁹ Tvrđíková, J.: *Izolace DNA z probiotických druhů bakterií mléčného kvašení v potravinových doplňcích*. 2008. 180 s. Vedúci diplomovej práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc.
- ¹⁰ Šilhánková, L.: *Mikrobiologie pro potravináře*, 3. opravené vyd. Praha: Academia, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6
- ¹¹ Vodrážka, Z.: *Biochemie*, 2. opravené vyd. Praha: Academia, 2002, dotisk 2007, 192 s. ISBN 80-200-0439-4
- ¹² Bednár, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J.: *Mikrobiologie*, 1. vyd. Praha: Marvil, 1996. 558 s. ISBN
- ¹³ [online], [cit. 2010-4-25]
- Dostupné z: < *Visuals unlimited*. 2009. <http://www.visualsunlimited.com/c/visualsunlimited>>
- ¹⁴ Bernardeau, M., Gueguen, M., Vernoux, J. P.: *Beneficial lactobacilli in food and feed: long – term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments*. 2006. FEMS Microbiol. Rev. 30: 487 – 513.
- ¹⁵ Sedláček, I.: *Taxonomie prokaryot*, 1.vyd. Brno: MU, 2007. 270 s. ISBN 80-210-4207-9
- ¹⁶ [online], [cit. 2010-4-22] *NCBI taxonomy browser*. 2000. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- ¹⁷ Rosypal, S.: *Úvod do molekulární biologie*, I. díl, 4. vyd. Brno, 2006. 289 s. ISBN 80-902562-5-2
- ¹⁸ Alberst, B.: *Základy buněčné biologie*, 2. vyd. Ústí nad Labem : Espero Publishing, 1998. 332s. ISBN 80-902906-2-0
- ¹⁹ Bartoš, M., Bartošová, L.: *Základy molekulárnej biologie pro farmaceuty*, 1.vyd Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2007. 148 s. ISBN 978-80-7305-020-7

²⁰ Voet, D., Voetová, G.: *Biochemie*, 1.vyd. Praha: Victoria publishing, 1995. 1325 s. ISBN 80-85605-44-9

²¹ Horák, V., Staszková, L.: *Biochemie*, 2.prepracované vyd. Praha: Česká zemědělská univerzita, 2002. 181 s. ISBN 80-213-0980-6

²² VŠCHT [online], [cit. 2010-4-27]

Dostupné z: < http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.help.htm >

²³ Králová, B., Fukal, L., Rauch, P., Ruml, T. : *Bioanalytické metody*, 3. vyd. Praha: VŠCHT, 2007. 254 s. ISBN 978-807080-449-3

²⁴ Ledvina, M., Stoklasová, A., Cerman, J.: *Biochemie pro studující medicíny II.díl*, Praha: Karolinum, 2009. 546 s. ISBN 978-80-246-1415-1

²⁵ Rittich, B., Španová, A., Horák, D.: Functionalised magnetic microspheres with hydrophilic properties for molecular diagnostic applications, *Food Research Int.* (2009) 42: 493–498

²⁶ Rittich, B., Španová, A., Horák, D.: *Carboxyl-functionalized magnetic carrier for isolation and identification of DNA in dairy products*. 2007. *J. Magn. Magn. Mat.* 311: 247-254

²⁷ Rittich, B., Španová, A., Horák, D., Beneš, M. J.: *Isolation of microbial DNA by newly designed magnetic particles*. 2006. *Colloids and Sur. B: Biointerfaces* 52: 143 – 148.

²⁸ Šafařík, I., Šafaříková, M.: *Use of magnetic techniques for the isolation of cells*. *J. Chromatogr. B* 722: 33-53. 1999.

²⁹ Horák, D., Babič, M., Macková, H. Beneš, M. J. : *Preparation and properties of magnetic nano- and micro-sized particles for biological and environmental separations*. 2007. *J. Sep. Sci.* 30: 1751 – 1772.

³⁰ Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W.: *Harperova biochemie*, 4.české vyd., 2002. 872s. ISBN 80-7319-013-3

³¹ Brown, T.A.: *Klonování genů a analýza DNA*, 1.české vyd. Olomouc: Univerzita Palackého, 2007. 389 s. ISBN 978-80-244-1719-6

³² Šmarda, J., Doškař, J., Pantuček, R., Ružičková, V., Koptíková, J.: *Metody molekulární biologie*, 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 188 s. ISBN 80-210-3841-1

³³ Španová, A., Rittich, B.: *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*, 1.vyd. Brno: VUT, Fakulta chemická, 2010. 86 s. ISBN 978-80-214-4004-3

³⁴ Kočárek, E.: *Molekulární biologie v medicíně*, 1. vyd. Brno Národní centrum ošetrovatelství nelékařských zdravotnických oborů, 2007. 218 s. ISBN 978 -80-7013-450-4

³⁵ Sambrook J., Russel D.W. (2001): *Molecular cloning: A laboratory manual (II)*, 3rd ed. Cold Spring Laboratory Harbor Press, New York.

³⁶ Haarman, M., Knol, J.: *Quantitative Real-Time PCR Analysis of fecal Lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula*. 2006. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 2359-2365.

³⁷ Kok, R., Waal, A., Schut, F., Gjalte, W., Weenk, G., Heellingwerf, K.: *Specific detection and analysis of prebiotic Bifidobacterium Strain in infant feces*. 1996. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3668-3672

-
- ³⁸ Walter, J., Tannock, G.W., Timisjarvi, T., Rodtonh, S., Loach, D., Munro, K., Alatosava, T.: *Detection and identification of gastrointestinal Lactobacillus species by using gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers*. 2000. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 297-303
- ³⁹ Ward, L., Timmins, M.J.: *Differentiation of Lactobacillus casei, Lactobacillus paracasei and Lactobacillus rhamnosus by polymerase chain reaction*. 1999. *Lett. Appl. Microbiol.* 29: 90-92
- ⁴⁰ Lick, S., Karsten, D., Keller, K.: *Survival of Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus and Streptococcus thermophilus in terminal ileum of fistulated Göttingen minipigs*. 2001. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4137-4143

8 PRÍLOHY

Výsledky práce boli prezentované formou posteru na vedeckej konferencii *XIV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů* (20.-21. 4. 2010)

Využitie magnetického nosiča pre izoláciu probiotickej DNA z vaginálnych tabliet

Zovčáková Monika, Španová Alena, Rittich Bohuslav

Vysoké učení technické v Brne, Fakulta chemická, Ústav potravinářské chemie a biotechnologie, Purkyňova 118, 61200 Brno

Úvod: Vaginálny ekosystém je komplexné prostredie, v ktorom u zdravých žien dominujú laktobacily. V súčasnej dobe probiotické druhy laktobacilov predstavujú významný potenciál pri zvládnutí širokého spektra gynekologických problémov – od zápalu až po dyskomfort. V gynekológii a pôrodnictve majú probiotiká miesto nielen pri prevencii, ale aj pri doliečovaní gynekologických infekcií. [1]

Cieľ práce: Cieľom práce bolo preukázanie probiotických baktérií v 5 rôznych vaginálnych tabletoch pomocou molekulárne-biologických metód. Pre izoláciu DNA bola testovaná reverzibilná adsorpcia na pevnej fáze. K izolácii DNA z hrubých lyzátov buniek boli použité magnetické neporézne mikročastice P(HEMA-co-GMA) pokryté karboxylovými skupinami.

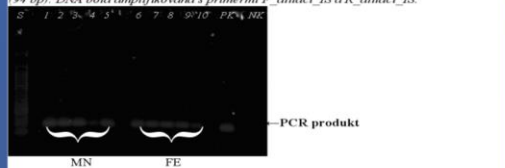
Materiál a metódy: DNA z tabliet bola izolovaná pomocou magnetického nosiča z hrubých lyzátov buniek. Ako kontrola bola použitá DNA izolovaná metódou fenolovej extrakcie s následným prezrážaním etanolom. Koncentrácia DNA bola stanovená spektrofotometricky. PCR zmes obsahovala rôzne množstvo DNA (v rozsahu 1,5-50ng DNA). Amplifikovaný PCR produkt bol detekovaný pomocou agarózovej gélovej elektroforézy s následným ofarbením gélu ethidiumbromidom. K identifikácii DNA z tabliet boli použité primery pre špecifickú DNA domény, rodu a druhu (Tabuľka 1).

Tab.1 PCR primery

Špecifickosť primerov	Označenie primerov	Teplota hybridizácie (°C)	Veľkosť PCR produktu (bp)	Referencia
Univerzálne	R_eub F_eub	56	470	Haarman a kol 2005
Rod <i>Lactobacillus</i>	F_allact_1S R_allact_1S	58	94	Haarman a kol 2005
<i>Lb. rhamnosus</i>	PrI PhaII	58	200 - 400	Waher a kol 2000
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Sthermoph1 Sthermoph2	58	968	Lick a kol
<i>Lb. delbrueckii</i>	Rdelb Fdelb	58	94	Haarman a kol 2006

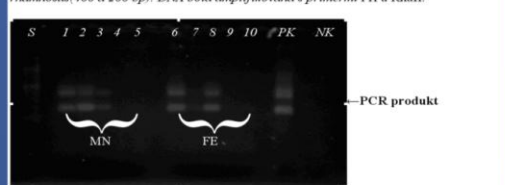
Výsledky a diskusia: DNA vyzolovaná z tabliet pomocou magnetického nosiča a fenolovou extrakciou bola špecifikovaná na základe detekcie PCR produktov. Všetky vzorky boli zaradené do rodu *Lactobacillus*. Druhovú špecifickú PCR už bola rôzna pre jednotlivé tablety. Výsledky gélovej elektroforézy PCR produktov sú uvedené na obr.1, obr.2, obr.3, obr.4, detekcia je zhrnutá v tab.2. Získané výsledky identifikácie baktérií pomocou PCR boli porovnané s údajmi uvedenými výrobcami (Tab.3).

Obr.1 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre rod *Lactobacillus* (94 bp). DNA bola amplifikovaná s primermi F_allact_1S a R_allact_1S.



FE - izolácia DNA fenolovou extrakciou s následným prezrážaním etanolom
MN - izolácia DNA pomocou magnetického nosiča
S - štandard
PK - pozitívna kontrola s DNA *Lb. Fermentan* CCM 7192^T
NK - negatívna kontrola

Obr.2 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre druh *Lactobacillus rhamnosus* (400 a 200 bp). DNA bola amplifikovaná s primermi PrI a PhaII.

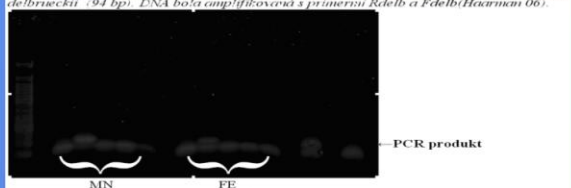


FE - izolácia DNA fenolovou extrakciou s následným prezrážaním etanolom
MN - izolácia DNA pomocou magnetického nosiča
S - štandard
PK - pozitívna kontrola s DNA *Lb. rhamnosus* CCM 1825^T
NK - negatívna kontrola

Záver: DNA vyzolovaná z vaginálnych tabliet bola pomocou PCR metód zaradená do rodu *Lactobacillus* a druhov *Lb. rhamnosus*, skupina *Lb. casei/paracasei*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. gasseri*, *Lb. delbrueckii* a *Streptococcus thermophilus*. Druh *Lb. acidophilus* sa nepodarilo detekovať v žiadnej tablete. Zhodná identifikácia bakteriálnych druhov bola preukázaná u jednej tablety (Maldion).

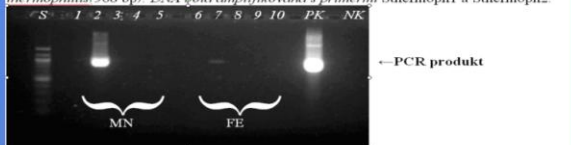
Literatúra:[1] Kuchta, M., Pružinec, P. a kol.: *Probiotiká, ich miesto a využitie v medicíne*, 1.vyd. Bratislava: Bonus CCS s.r.o., 2006, 163 s. ISBN 80-968491-7-4

Obr.3 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre druh *Lactobacillus delbrueckii* (94 bp). DNA bola amplifikovaná s primermi Rdelb a Fdelb(Haarman 06).



FE - izolácia DNA fenolovou extrakciou s následným prezrážaním etanolom
MN - izolácia DNA pomocou magnetického nosiča
S - štandard
PK - pozitívna kontrola s DNA *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CCM 7190^T
NK - negatívna kontrola

Obr.4 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov špecifických pre druh *Streptococcus thermophilus* (968 bp). DNA bola amplifikovaná s primermi Sthermoph1 a Sthermoph2.



FE - izolácia DNA fenolovou extrakciou s následným prezrážaním etanolom
MN - izolácia DNA pomocou magnetického nosiča
S - štandard
PK - pozitívna kontrola s DNA *Streptococcus thermophilus* CCM 475^T
NK - negatívna kontrola

Tab.2 Detekcia PCR produktov pre rod *Lactobacillus* a pre druhy *Lb. rhamnosus*, *Lb. delbrueckii* a *Streptococcus thermophilus*.

C. číslo	Názov tablety	Metóda izolácie DNA	Det. PCR produktu pre rod <i>Lactobacillus</i>	Det. PCR produktu pre <i>Lb. rhamnosus</i>	Det. PCR produktu pre <i>Lb. delbrueckii</i>	Det. PCR produktu pre <i>Streptococcus thermophilus</i>
1	Gynocaps	MH	+++	+++	-	-
2	Fermalac vaginal		+++	+++	-	+++
3	Maldion	FE	++	++	-	-
4	Floragn ovuli		++	++	-	-
5	Gynolact	FE	+++	+++	-	-
6	Fermalac vaginal		+++	+++	-	+
7	Maldion	FE	+++	+++	-	-
8	Floragn ovuli		+++	+++	-	-
9	Gynolact	FE	+++	+++	-	-
10	Fermalac vaginal		+++	+++	-	+++
11	Euastiva (Gynagel)	FE	+++	+++	+++	+++
12	Bogartiva (Euastiva)		-	-	-	-

FE - izolácia DNA fenolovou extrakciou s následným prezrážaním etanolom
MN - izolácia DNA pomocou magnetického nosiča
-/-, +, ++, +++ rôzna intenzita detekcie
-/-, - nedetekovateľne

Tab.3 Vaginálne tablety, ich zloženie a porovnanie deklarovaných údajov o prítomnosti baktérií uvedenými výrobcami s identifikáciou pomocou PCR

Názov tablety	Deklarované bakteriálne zloženie	PCR Zhodná identifikácia	PCR Nezhodná identifikácia	Množstvo buniek
1. Gynocaps	<i>Lactobacillus casei</i> variety <i>Rhamnosus Doderleinii</i>	- <i>Lb. rhamnosus</i> - <i>Lb. paracasei</i>	-rod <i>Bifidobacterium</i>	min. 10 ⁹ baktérií v 1g
2. Fermalac vaginal	- <i>Lb. rhamnosus</i> - <i>Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> - <i>Streptococcus salivarius subsp. thermophilus</i>	- <i>Lb. paracasei</i> - <i>Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> - <i>Streptococcus thermophilus</i>	- <i>Lb. paracasei</i> - <i>Lb. plantarum</i> -rod <i>Bifidobacterium</i>	2x10 ⁸ baktérií v kapsli
3. Maldion	- <i>Lb. gasseri</i> - <i>Lb. rhamnosus</i>	- <i>Lb. gasseri</i> - <i>Lb. rhamnosus</i>	-	min. 1x10 ⁸ lyofilizovaných baktérií v kapsli
4. Floragn ovuli	- <i>Lb. bulgaricus</i> - <i>Lb. bifidus</i> - <i>Lb. acidophilus</i> - <i>Lb. thermophilus</i> - <i>Lb. casei</i> - <i>Lb. plantarum</i>	- <i>Lb. casei/paracasei</i> - <i>Lb. paracasei</i>	-rod <i>Bifidobacterium</i>	v 1 tablete 2g laktobacilov
5. Gynolact	- <i>Lb. acidophilus</i> - <i>Lb. casei</i> - <i>Lb. rhamnosus</i>	- <i>Lb. casei/paracasei</i> - <i>Lb. paracasei</i>	- <i>Lb. plantarum</i> -rod <i>Bifidobacterium</i>	2x10 ⁸ baktérií v kapsli

Tab.4 Výsledky rodovej a druhovej identifikácie u vaginálnych tabliet s ohľadom na citlivosť PCR

Rodová a druhová identifikácia	Citlivosť PCR	Detekované v tablete č.
rod <i>Lactobacillus</i>	10 pg	1,2,3,4,5
rod <i>Bifidobacterium</i>	10 pg	1,2,4,5
druh <i>Lb. acidophilus</i>	10 pg	nedetekované
druh <i>Lb. rhamnosus</i>	100 fg	1,2,3
skupina <i>Lb. casei/paracasei</i>	10 pg	4,5
druh <i>Lb. paracasei</i>	100 fg	1,2,3,4,5
druh <i>Lb. plantarum</i>	100 pg	2,5
druh <i>Lb. gasseri</i>	1 ng	3
druh <i>Lb. delbrueckii</i>	1 pg	2
druh <i>Streptococcus thermophilus</i>	10 fg	2

Citlivosť PCR: Napuženie množstva DNA amplifikovateľnej v PCR za vzniku amplifónu detekovateľného na géle

Magnetický nosič bol vhodný pre izoláciu DNA kompatibilný s PCR.