

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 BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ V KYSANÝCH
MLÉČNÝCH VÝROBCÍCH
S VYUŽITÍM AMPLIFIKAČNÍCH METOD.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

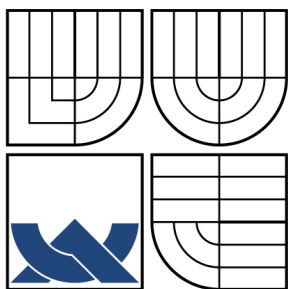
DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE

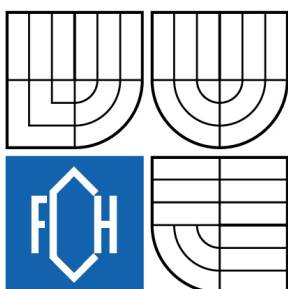
AUTHOR

MARTINA TYCOVÁ

BRNO 2008



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 BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ V KYSANÝCH MLÉČNÝCH VÝROBCÍCH S VYUŽITÍM AMPLIFIKAČNÍCH METOD.

IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA IN FERMENTED DAIRY PRODUCTS
USING AMPLIFICATION METHODS

DIPLOMOVÁ PRÁCE
DIPLOMA THESIS

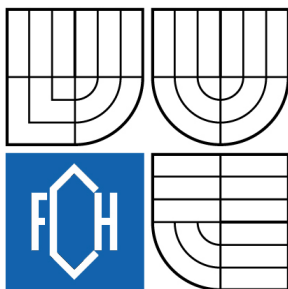
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

MARTINA TYCOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

doc. RNDr. ALENA ŠPANOVÁ, CSc.

BRNO 2008



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce

FCH-DIP0232/2007

Akademický rok: **2007/2008**

Ústav

Ústav chemie potravin a biotechnologií

Student(ka)

Tycová Martina

Studijní program

Chemie a technologie potravin (M2901)

Studijní obor

Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)

Vedoucí diplomové práce

doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

Konzultanti diplomové práce

Název diplomové práce:

Identifikace bakterií mléčného kvašení v kysaných mléčných výrobcích
s využitím amplifikačních metod.

Zadání diplomové práce:

- 1) Vypracujte literární přehled k dané problematice
- 2) Popište použité metody hodnocení
- 3) Zpracujte naměřené výsledky z experimentů
- 4) Zhodnoťte získané výsledky formou diskuse

Termín odevzdání diplomové práce: 16.5.2008

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

Martina Tycová
student(ka)

doc. RNDr. Alena Španová, CSc.
Vedoucí práce

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2007

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je molekulární diagnostická metoda, která umožňuje identifikaci bakterií mléčného kvašení používaných v potravinářském průmyslu. V této práci byla použita PCR pro identifikaci bakterií druhu *Streptococcus thermophilus* v 10-ti náhodně vybraných komerčně dostupných kysaných mléčných výrobcích a pro identifikaci druhu *Streptococcus thermophilus* v 25 lyofilizátech kmenů získaných ze Sbírký mlékařských kultur Laktoflóra (CCDM, Tábor, CZ). Druhově specifické PCR primery byly cíleně vybrány z oblastí 16S rDNA [1]. PCR produkty (968bp) byly detekovány použitím elektroforézy na 1,2 % agarózovém gelu. Bakteriální DNA byla izolována z hrubých lyzátů buněk magnetickými nosiči P(HEMA-co-GMA) obsahujícími karboxylové skupiny. DNA byla vratně navázána na jejich povrch v přítomnosti vysoce koncentrovaného polyethylenglykolu (PEG 6000) a chloridu sodného. Metoda fenolové extrakce DNA byla použita jako kontrolní. Pomocí metody PCR byly identifikovány bakterie druhu *Streptococcus thermophilus* ve všech analyzovaných vzorcích.

ABSTRACT

Polymerase chain reaction (PCR) is molecular diagnostic method which allows the identification of lactic acid bacteria used in food industry. In this work species-specific PCR primers (targeted on highly conserved 16S rDNA region) [1] were used for identification of bacteria of species *Streptococcus thermophilus* in 10 randomly commercially accessible fermented milk products and for identification of species *Streptococcus thermophilus* in 25 lyophilisates collected in Culture Collection of Dairy Microorganisms Laktoflora (CCDM, Tábor, Czech Republic). The PCR products (968 bp) were detected using electrophoresis in 1,2 % agarose gel. Bacterial DNA was isolated from crude cell lysates by magnetic carriers P(HEMA-co-GMA) containing carboxyl groups. DNA was reversibly bind on their surface in the presence of high concentrations of poly(ethylene glycol) (PEG 6000) and sodium chloride. Phenol extraction of DNA was used as control. *Streptococcus thermophilus* strains were identified using PCR in all analysed samples.

[1]Lick S., Dreschner K., Keller K.J. Appl. Environ. Microbiol. 67 (2001) 4137.

KLÍČOVÁ SLOVA

polymerázová řetězová reakce (PCR), *Streptococcus thermophilus*, kysané mléčné výrobky, magnetické nosiče, DNA izolace

KEYWORDS

polymerase chain reaction (PCR), *Streptococcus thermophilus*, fermented milk products, magnetic carriers, DNA isolation

TYCOVÁ, M. Identifikace bakterií mléčného kvašení v kysaných mléčných výrobcích s využitím amplifikačních metod. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 92 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala své školitelce doc. RNDr. Aleně Španové, CSc za odborné vedení a čas, který mi věnovala při vypracování této diplomové práce, a Ing. Radce Burdychové, Ph.D. z Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně za ochotu a pomoc při identifikaci bakteriálního rodu *Enterococcus*.

OBSAH

1. ÚVOD	9
1.1 CHARAKTERISTIKA BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ (BMK)	10
1.2 ROD <i>STREPTOCOCCUS</i>	12
1.2.1 <i>Taxonomie a fylogeneze</i>	12
1.2.2 <i>Obecná charakteristika streptokoků</i>	13
1.3 <i>STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS</i>	14
1.3.1 <i>Morfologie buněk a kolonií</i>	14
1.3.2 <i>Fyziologické vlastnosti</i>	14
1.3.3 <i>Výskyt, význam a využití</i>	16
1.4 PROBIOTIKA A PREBIOTIKA	16
1.5 IDENTIFIKACE BMK S VYUŽITÍM DNA AMPLIFIKACE	18
1.5.1 <i>Polymerázová řetězová reakce (PCR)</i>	18
1.5.1.1 Princip a účinnost PCR	18
1.5.1.2 Reakční podmínky PCR	21
1.5.1.3 Charakteristika a působení inhibitorů PCR	23
1.5.2 <i>Magnetické separační techniky a izolace DNA</i>	24
1.5.2.1 Princip bioseparace pomocí dvoufázového systému	25
1.5.2.2 Příprava magnetických nosičů	25
1.5.2.3 Vlastnosti magnetických nosičů	25
1.5.2.4 Využití magnetických nosičů	26
2. CÍL PRÁCE	28
3. MATERIÁL A METODY	29
3.1 KULTIVAČNÍ MÉDIA A ROZTOKY	29
3.1.1 <i>Kultivační média</i>	29
3.1.2 <i>Roztoky pro izolaci bakteriální DNA, přípravu hrubých lysátů bakteriálních buněk a agarózovou gelovou elektroforézu</i>	30
3.1.3 <i>Použité chemikálie</i>	33
3.1.4 <i>Komponenty PCR pro rod Lactobacillus</i>	33
3.1.5 <i>Komponenty PCR pro rod Streptococcus</i>	33
3.1.6 <i>Komponenty PCR při použití univerzálních primerů</i>	33
3.1.7 <i>Komponenty PCR pro rod Enterococcus</i>	34
3.2 BAKTERIÁLNÍ KULTURY	34
3.3 KYSANÉ MLÉČNÉ VÝROBKY	36
3.4 PŘÍSTROJE A POMŮCKY	36
3.5 METODY	38
3.5.1 <i>Kultivace bakteriálních buněk a ověření jejich čistoty</i>	38
3.5.1.1 Kultivace buněk druhu Lactobacillus paracasei ssp. paracasei a ověření jejich čistoty	38
3.5.1.2 Kultivace buněk druhu Streptococcus thermophilus a ověření jejich čistoty	38
3.5.1.3 Kultivace bakterií z lyofilizátů buněčných kultur kmenů Streptococcus thermophilus získaných ze Sbírký mlékařských kultur mikroorganismů (CCDM, Tábor) a ověření jejich čistoty	38
3.5.1.4 Kultivace buněk rodu Enterococcus na Bile esculin azide agaru a poté na krevním agaru	38

3.5.2	<i>Izolace bakteriální DNA metodou fenolové extrakce</i>	38
3.5.2.1	Příprava buněk pro izolaci DNA	39
3.5.2.2	Lyze buněk	39
3.5.2.3	Fenolová extrakce	39
3.5.2.4	Přesrážení DNA ethanolem	40
3.5.3	<i>Izolace DNA z tekutého mléčného výrobku</i>	40
3.5.4	<i>Izolace DNA pomocí magnetických nosičů</i>	41
3.5.4.1	Příprava směsi pro izolaci DNA magnetickými nosiči	41
3.5.4.2	Izolace DNA s využitím magnetických nosičů (reversibilní imobilizace na pevné fázi - SPRI)	41
3.5.5	<i>Příprava DNA matrice pro PCR z buněk jedné bakteriální kolonie</i>	42
3.5.5.1	Považení buněk	42
3.5.5.2	Alkalická lyze buněk	42
3.5.6	<i>Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA</i>	43
3.5.7	<i>Agarózová gelová elektroforéza bakteriální DNA</i>	43
3.5.8	<i>Polymerázová řetězová reakce</i>	44
3.5.8.1	Příprava PCR směsi	44
3.5.8.2	Provedení PCR reakce	45
3.5.9	<i>Agarózová gelová elektroforéza PCR produktu</i>	46
3.5.10	<i>EN-COCCUS test</i>	46
4.	VÝSLEDKY	48
4.1	STANOVENÍ CITLIVOSTI RODOVĚ SPECIFICKÉ PCR - DNA <i>LACTOBACILLUS PARACASEI</i> SUPS. <i>PARACASEI</i> CCDM 212/06	48
4.1.1	Kultivace v tekutém médiu a na pevném agaru s ověřením čistoty bakteriální kultury	48
4.1.2	<i>Izolace bakteriální DNA kmene Lactobacillus paracasei sups. paracasei CCDM212/06</i>	48
4.1.3	<i>Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty purifikované DNA kmene Lactobacillus paracasei sups. paracasei CCDM 212/06</i>	49
4.1.4	<i>Provedení rodově specifické PCR reakce s purifikovanou DNA kmene Lactobacillus paracasei subs. paracasei CCDM 212/06</i>	49
4.2	STANOVENÍ CITLIVOSTI DRUHOVĚ SPECIFICKÉ PCR - DNA <i>STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS</i> CCM 4757	50
4.2.1	Kultivace v tekutém médiu a na pevném agaru s ověřením čistoty buněk	50
4.2.2	<i>Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk kmene Streptococcus thermophilus CCM 4757</i>	50
4.2.3	<i>Druhově specifická PCR reakce s purifikovanou DNA Streptococcus thermophilus CCM 4757</i>	51
4.2.4	<i>Optimalizace PCR reakce pro kmen Streptococcus thermophilus CCM 4757</i>	52
4.3	IDENTIFIKACE BAKTERIÍ DRUHU <i>STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS</i> VE VYBRANÝCH MLÉČNÝCH VÝROBKÁCH POMOCÍ PCR	53
4.3.1	<i>Lyze buněk izolovaných z mléčných výrobků</i>	53
4.3.2	<i>Izolace DNA z HL buněk z mléčných výrobků pomocí magnetických nosičů a PCR specifická pro druh S. thermophilus</i>	53
4.3.2.1	Optimalizace PCR reakce s DNA izolovanou z mléčných výrobků I-X pomocí magnetického nosiče s použitím různých množství DNA matrice	54
4.4	IDENTIFIKACE BAKTERIÍ DRUHU <i>S. THERMOPHILUS</i> Z LYOFILIZÁTŮ BUNĚK	57
4.4.1	<i>Kontrola čistoty bakteriálních kultur kmenů Streptococcus thermophilus ze Sbírký mléčných mikroorganismů (CCDM)</i>	57

4.4.2	Identifikace bakterií druhu <i>S. thermophilus</i> z lyofilizátů DNA izolované magnetickými nosiči z 25 lyofilizátů.....	58
4.4.2.1	Lyze buněk izolovaných z lyofilizátů.....	58
4.4.2.2	Separace DNA z 25 lyofilizátů pomocí magnetických nosičů.....	59
4.4.2.3	PCR reakce s DNA 25 lyofilizátů izolovanou magnetickým nosičem.	62
4.4.2.4	Opakovaná PCR reakce se vzorky č. 1, 3 a 19 kmenů lyofilizátů s různým množstvím DNA matrice.....	64
4.4.3	Kontrola identifikace bakterií druhu <i>Streptococcus thermophilus</i> z lyofilizátů po amplifikaci DNA izolované fenolovou extrakcí.....	65
4.4.3.1	Izolace DNA z 25 lyofilizátů fenolovou extrakcí.....	65
4.4.4	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty purifikované DNA z lyofilizátů.....	67
4.4.4.1	PCR reakce s purifikovanou DNA izolovanou z lyofilizátů.....	67
4.4.4.2	PCR reakce se 100x vyředěnou purifikovanou DNA izolovanou z 25 lyofilizátů.....	69
4.4.4.3	Agarózová gelová elektroforéza 5 µl PCR produktů.....	70
4.4.4.4	PCR reakce s přečištěnou purifikovanou DNA izolovanou z lyofilizátů č. 1, 3, 9 a 19.....	72
4.4.4.5	PCR reakce s přečištěnou purifikovanou DNA izolovanou z lyofilizátů č. 1, 3, 9 a 19 s použitím univerzálních primerů.....	72
4.5	PCR REAKCE <i>S. THERMOPHILUS</i> Z BUNĚK JEDNÉ BAKTERIÁLNÍ KOLONIE.....	73
4.5.1	PCR reakce z buněk jedné bakteriální kolonie s přípravou DNA matrice považením.....	76
4.5.2	PCR reakce z buněk bakteriálních kolonií s přípravou DNA matrice prodlouženým považením.....	77
4.5.3	PCR reakce s koloniemi narostlými na Bile esculin azide agaru s použitím primerů Sterm 1 a Sterm 2.....	78
4.6	IDENTIFIKACE BAKTERIÍ RODU <i>ENTEROCOCCUS</i> Z LYOFILIZÁTŮ BUNĚK.....	79
4.6.1	Kultivace bakteriálních kultur lyofilizátů u vzorků 1, 3, 9 a 19 na Bile esculin azide agaru a krevním agaru.....	79
4.6.2	Provedení testu EN-COCCUS na vzorcích 1, 3, 9 a 19.....	79
4.6.3	PCR reakce s purifikovanou DNA izolovanou z 25 lyofilizátů s použitím primerů specifických pro rod <i>Enterococcus</i>	81
4.6.4	PCR reakce s 1 bakteriální kolonií ze vzorků 1, 3, 9 a 19.....	82
4.6.5	Ověření specifity použitých primerů.....	83
5.	DISKUZE.....	84
5.1	STANOVENÍ CITLIVOSTI RODOVĚ SPECIFICKÉ PCR - DNA <i>LACTOBACILLUS PARACASEI</i> SUPS. <i>PARACASEI</i> CCDM 212/06.....	84
5.2	STANOVENÍ CITLIVOSTI DRUHOVĚ SPECIFICKÉ PCR - DNA <i>STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS</i> CCM 4757.....	84
5.3	IDENTIFIKACE BAKTERIÍ DRUHU <i>S. THERMOPHILUS</i> VE VYBRANÝCH MLÉČNÝCH VÝROBCÍCH POMOCÍ PCR.....	84
5.4	IDENTIFIKACE BAKTERIÍ RODU <i>STREPTOCOCCUS</i> Z LYOFILIZÁTŮ BUNĚK.....	85
5.4.1	Identifikace bakterií rodu <i>Streptococcus thermophilus</i> z lyofilizátů buněk magnetickými nosiči.....	85
5.4.2	Kontrola identifikace bakterií druhu <i>Streptococcus thermophilus</i> z 25 lyofilizátů s využitím DNA izolované fenolovou extrakcí.....	85
5.5	PCR REAKCE Z BUNĚK JEDNÉ BAKTERIÁLNÍ KOLONIE.....	86
5.6	IDENTIFIKACE BAKTERIÍ RODU <i>ENTEROCOCCUS</i> Z LYOFILIZÁTŮ BUNĚK.....	87
6.	ZÁVĚR.....	88

7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	89
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	92
9.	SEZNAM PŘÍLOH	93

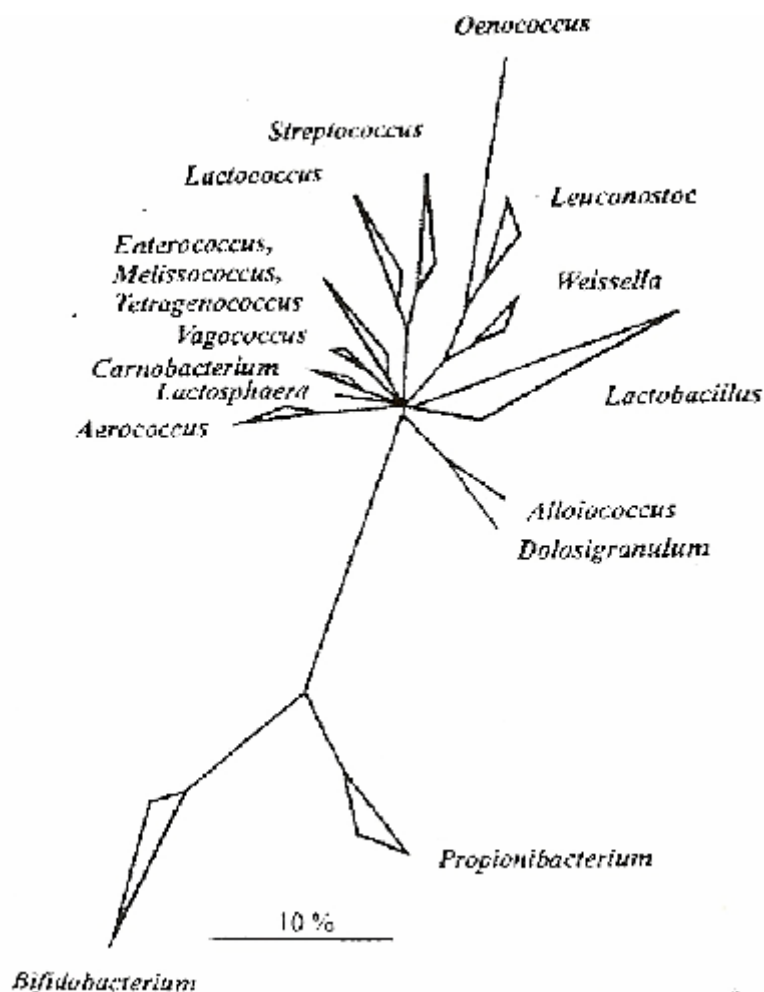
1. ÚVOD

Molekulárně biologické postupy založené na amplifikaci DNA in vitro se v posledních letech staly velmi užívanými metodami pro identifikaci mikroorganismů v potravinách. Identifikace bakterií v mléčných výrobcích je důležitá především pro kontrolu jejich kvality a to jak z pohledu možného nebezpečí kontaminace patogenními mikroorganismy tak i z důvodů identifikace mikroorganismů ze skupiny bakterií mléčného kvašení. Cílová DNA bývá často ve vzorcích analyzovaných většinou pro účely genotypizace nebo detekce mikroorganismů přítomna v tak nízkých koncentracích, že ji není možno po izolaci přímo detekovat. Proto je nezbytné zvýšit analytickou sensitivitu její mnohonásobnou replikací. Pro rychlou identifikaci mikroorganismů v potravinách se v současné době využívají molekulárně biologické postupy, např. polymerázová řetězová reakce (PCR). Výhodou PCR je její vysoká specifita, citlivost a rychlost. Při správné optimalizaci stačí k detekci v PCR jedna buňka. Její další nespornou výhodou je možnost prokazovat i nekultivovatelné mikroby. Nevýhodou PCR může být skutečnost, že se prokazují i mrtvé buňky přítomné ve vzorku. Vysoká citlivost PCR může vést k falešně pozitivním výsledkům, které mohou být způsobeny kontaminací složek reakční směsi nebo mikroorganismy z okolí. Velkým problémem jsou i falešně negativní výsledky zejména při analýze reálných vzorků, které jsou způsobeny přítomností inhibitorů PCR v analyzovaných vzorcích.

Používání stávajících izolačních postupů, vedoucích k purifikované DNA, jako je např. fenolová extrakce DNA, je časově náročné, a proto méně vhodné pro rutinní diagnostiku. K izolaci genomové DNA v čistotě vhodné pro následné použití v PCR byly s úspěchem použity magnetické nosiče v přítomnosti polyethylenglykolu (PEG 6000) a chloridu sodného. Magnetická separace pomáhá urychlit separaci a snižuje spotřebu organických rozpouštědel, která jsou v klasických metodách pro izolaci DNA používána.

1.1 Charakteristika bakterií mléčného kvašení (BMK)

Potravinářský mikrobiolog rozumí pod tímto pojmem zpravidla skupinu bakterií kokovitých jako i paličkovitých zahrnující některé druhy rodů: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Bifidobacterium* [9]. Fylogeneticky se BMK řadí do klostridiální fylogenetické vývojové větve grampozitivních bakterií (Obr. 1.1). Jejich DNA obsahuje méně než 55 % G+C [5]. Právě analýza DNA a zastoupení bází v ní (adenin - A; thymin - T; guanin - G; cytosin - C) je důvodem častých změn v taxonomii a nomenklatuře nejenom u BMK.



Obr. 1.1: Hlavní fylogenetická skupina BMK a jim příbuzné grampozitivní bakterie s nízkým (v horní části obrázku) a vysokým (ve spodní části obrázku) obsahem G+C v DNA [13].

Z potravinářsko-mikrobiologického hlediska má tato skupina nezanedbatelný potravinářsko-technologický funkční význam. V klasické monografii Dána Orla-Jensena (1919) pojednávající o BMK se hovoří: „Pravé bakterie mléčného kvašení tvoří velkou přirozenou skupinu nesporelujících grampozitivních koků a paliček, které fermentují sacharidy za fakultativně anaerobních (mikroaerofilních) podmínek a tvoří přitom hlavně kyselinu mléčnou“ [9].

BMK se nevyskytují pouze v mléce a fermentovaných mléčných produktech, nacházejí se i na intaktních a rozkládajících se rostlinách, ve střevech u lidí a zvířat.

BMK nemají výrazné proteolytické a lipolytické vlastnosti, ale ve svém metabolismu přece jen tvoří z bílkovin štěpné produkty, peptidy a aminokyseliny, které slouží jako živiny náročným BMK jako lehce využitelný zdroj dusíku [9]. Dalším významným selektivním faktorem BMK je rychlé snížení pH prostředí na hodnoty pH 4 a nižší. BMK vyžadují bohaté množství živin a růstových faktorů, které jim v přírodě poskytují intaktní a rozkládající se rostliny a potraviny. Na tyto bohaté zdroje si natolik přivykli, že nemají schopnost samy syntetizovat určité růstové faktory jako: aminokyseliny, vitamíny skupiny B a jiné [9]. Při jejich pěstování na umělých živných půdách anebo při fermentaci, zaměřené na získání maximálního množství biomasy, se musí proto do nich tyto látky přidávat ve formě kvasničného autolyzátu (extraktu), mléčné syrovátky a rostlinných šťáv (rajčatová, mrkvová) [9]. Tyto nároky BMK sahají tak daleko, že růst a metabolismus určitých BMK umožňuje za standardních podmínek přítomnost určitého množství určité aminokyseliny anebo určitého vitamínu B v prostředí.

Mléčné kvašení je společným znakem všech BMK. Pozoruhodné je, že probíhá stejným mechanismem jak u zmíněných bakterií, tak i ve svalové tkáni lidí a zvířat. Proto se někdy nazývá glykolýzou svalovou nebo depolymerační [11]. BMK můžeme třídit podle hlavních a vedlejších terminálních fermentačních produktů na homofermentativní, které fermentovaný sacharid přeměňují téměř výlučně na kyselinu mléčnou, a heterofermentativní přeměňující fermentovaný sacharid na kyselinu mléčnou (>50 %), kyselinu octovou, CO₂ a za určitých podmínek i na ethanol (Tab. 1.1).

Tab. 1.1: Rody BMK, jejich fermentační typ a produkty [9].

Rod	Typ fermentace	Hlavní produkty fermentace (molární poměr)	Konfigurace kyseliny mléčné
<i>Lactococcus</i>	Homoferm.	laktát	L(+)
<i>Streptococcus</i>	Homoferm.	laktát	L(+)
<i>Pediococcus</i>	Homoferm.	laktát	DL, L (+)
<i>Lactobacillus</i>	Homoferm.	laktát	
<i>Thermobacterium</i>	Homoferm.	laktát	D (-), L (+), DL
<i>Streptobacterium</i>	Homoferm.	laktát	D (-), L (+), DL
	Heteroferm.*	laktát : acetát 1:1	
<i>Betabacterium</i>	Heteroferm.	laktát : acetát : CO ₂ 1:1:1	DL
<i>Leuconostoc</i>	Heteroferm.	laktát : acetát : CO ₂ 1:1:1	D (-)
<i>Bifidobacterium</i>	Heteroferm.	Laktát : acetát 2:3	L (+)

* při fermentaci pentóz

Některé BMK (jako i *S. thermophilus*) používané jako zákvasy při výrobě fermentovaných výrobků mají schopnost autolýzy, což způsobuje uvolnění intracelulárních enzymů do okolí. Tento jev hraje velmi důležitou roli v průběhu zráního procesu fermentovaných výrobků. Například lyze kmene *Lactococcus lactis* v mezofilním zákvasu v sýrech má za následek zvýšenou produkci volných AK a tím pádem způsobí pokles hořkosti [29]. Jako klíčový krok počátku autolýzy je rozvoj vůně v mléčných fermentovaných výrobcích.

BMK významně prospívají lidskému zdraví a výživě. Jsou důležitou složkou společenství technologicky významných mikroorganismů., které se používají jako výrobní prostředky při fermentačních procesech v technologii kysaných a kvašených potravin a pochutin živočišného a rostlinného původu (čisté bakteriální kultury, zákysy, startéry). Konzervační vlastnosti BMK a jejich fermentačních produktů se využívají na prodloužení trvanlivosti potravin živočišného a rostlinného původu [9, 31].

1.2 Rod *Streptococcus*

1.2.1 Taxonomie a fylogeneze

Taxonomické zařazení bakterií rodu *Streptococcus* je následující [33]:

Doména: *Bacteria*

Oddělení: *Firmicutes*

Kmen: *Bacilli*

Třída: *Lactobacillales*

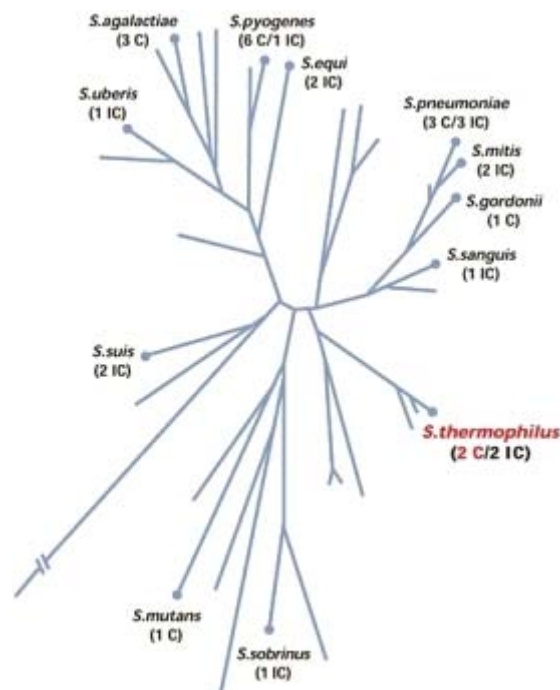
Řád: *Streptococcaceae*

Rod: *Streptococcus*

Druh: *Streptococcus thermophilus* a další druhy

Změny v klasifikaci a nomenklatuře zástupců rodu *Streptococcus* jsou důsledkem molekulárně taxonomických studií. Z rodu *Streptococcus* byly vyčleněny dva samostatné rody - *Enterococcus* (původně streptokoky sérologické skupiny D) a *Lactococcus* (původně streptokoky sérologické skupiny N). Rod *Streptococcus* nyní zahrnuje 58 druhů včetně poddruhů [18]. Rod *Streptococcus* podle novějšího pojetí klasifikace se rozděluje do tří skupin: pyogenní, orální a jiné streptokoky. Do skupiny pyogenních streptokoků patří *S. pyogenes*, *S. equi* ssp. *equi*, *S. equi* ssp. *zooepidemicus*, *S. dysgalactiae*, *S. canis* a *S. iniae*. Skupina orálních streptokoků obsahuje druhy vyskytující se převážně v ústní dutině a v horní části dýchacího traktu lidí a zvířat. Za zvláštních podmínek můžou v organismu způsobovat také endokarditidu a bakteriémii [9]. Do skupiny jiných streptokoků se řadí především mlékárensky významný druh *Streptococcus thermophilus*, který je významnou složkou čistých bakteriálních kultur používaných v mlékárenském průmyslu (tvrdé sýry, jogurt, tvaroh).

Ve fylogenetickém stromu bakterií je rod *Streptococcus* řazen do skupiny grampozitivních bakterií s nízkým obsahem G+C (viz Obr.1.1). Obsah G+C je 37 - 40 % (mol.) [20]. Na obrázku 1.2 je fylogenetický strom jednotlivých druhů.



Obr. 1.2: Fylogenetický strom jednotlivých druhů rodu *Streptococcus* [19].

1.2.2 Obecná charakteristika streptokoků

Buňky jsou okrouhlé anebo vejčité s průměrem $<2\mu\text{m}$. Rod *Streptococcus* zahrnuje většinou fakultativně anaerobní, katalázanegativní, grampozitivní koky v párech a řetězcích [18]. Dále se vyznačuje fakultativní anaerobiózou, netvoří spory a buňky nejsou pohyblivé [11]. Všechny druhy vyžadují komplexní přívod růstových faktorů [9]. U většiny streptokoků vstupuje laktóza stejně jako volná glukóza do buňky pomocí zvláštního transferázového systému (fosfoenolpyruvát - dependentní fosfotransferázový systém).

Streptokoky fermentují sacharidy hlavně na kyselinu mléčnou, ale netvoří významné množství plynu. Některé druhy fermentují i organické kyseliny (malónová, citrónová) a aminokyseliny (serin a arginin). Neredukují dusičnan na dusitan [9]. Jejich optimální teplota je kolem 37°C a nižší, s výjimkou termofilního druhu *Streptococcus thermophilus*.

Rod *Streptococcus* zahrnuje řadu patogenních druhů, které způsobují hnisavá onemocnění, spálu, anginu, zubní kazy apod. Patogenní druhy rodu *Streptococcus* tvoří enzymy, které rozkládají červené krvinky a způsobují tak hemolýzu. Částečný rozklad krvinek, projevující se na krevním agaru zelenými zónami kolem kolonií, se označuje jako α -hemolýza, úplný rozklad krvinek, projevující se jasnými zónami, se označuje jako β -hemolýza a jako γ -reakce se označuje skutečnost, že k rozkladu krvinek vůbec nedochází [8]. Zejména to je deoxyribonukleáza, která štěpí DNA, dále streptokináza, proteáza a lipáza. Vzájemné působení těchto faktorů umožňuje šíření infekce ve tkáních [11].

1.3 *Streptococcus thermophilus*

1.3.1 Morfologie buněk a kolonií

Streptococcus thermophilus tvoří ovoidní grampozitivní buňky o průměru 0,7 až 0,9 μm v párech až dlouhých řetízkách (až 50 buněk) [9]. Pokud rostou v tekutém médiu jsou uspořádány v párech, krátkých anebo delších řetízkách. Při nižší teplotě než je teplota optimální vytváří jen krátké řetízky nebo dvojice koků (viz obrázek 1.3). Na pevném agarózovém médiu vytváří drobné bílé kolonie (viz obrázek 1.4).



Obr. 1.3: Mikroskopický snímek bakterie *Streptococcus thermophilus* tvořící páry a řetízky [21].



Obr. 1.4: Mikroskopický snímek růstu kolonií na pevném agarózovém médiu bakterie *Streptococcus thermophilus* [20].

1.3.2 Fyziologické vlastnosti

Tato bakterie patří do skupiny termofilních mléčných bakterií [19]. Velmi dobře roste při 37 °C, ale jeho optimální teplota je mezi 40 – 45 °C, minimální 21 – 19 °C a maximální při 52 °C. Dobře rostoucí kultury snášejí teplotu 67 až 68 °C po dobu 50 minut a virulentní kultury odumírají až za 15 minut při 80 °C. Roste v bujónu s obsahem 2,5 % NaCl, ale neroste při obsahu 4 % NaCl. V glukózovém bujónu se dosahuje hodnoty pH 4,5 – 4 [9]. Na krevním agaru netvoří hemolýzu.

V syntetických médiích je náročný na živiny (sacharidy) a růstové faktory (vitamíny skupiny B, aminokyseliny). V tabulce 1.2 jsou stanoveny požadavky na koncentraci AK potřebných pro maximální růst laktokoků a streptokoků.

Tab. 1.2: Minimální koncentrace AK potřebných pro maximální růst laktokoků a *S. thermophilus* ve Fordově médiu s laktózou za 17 hodin při 24 °C [9, upraveno].

Koncentrace AK v médiu (µg/ml)				
AK	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>L. lactis</i> sups. <i>cremoris</i>	<i>S. thermophilus</i>	Konc. volných AK v mléce
Glu	77	70	150	35,9
Leu	41	32	nz	1,2
Ile	33	32	nz	0,8
Val	27	41	nz	2,6
Arg	37	39	nz	1,6
Cys	s	27	80	n
Pro	nz	38	nz	8,8
His	23	14	60	2,8
Phe	21	6	nz	nz
Met	22	11	nz	n

n = nestanovené; nz = neznámé; s = stimuluje

Při výrobě fermentovaných kysaných mléčných nápojů a při výrobě sýrů je fermentace mléka a jeho bílkovin nepostradatelná. Například, při výrobě kysaného mléčného jogurtového nápoje je proteolytické působení nezbytné. Působením jogurtové kultury obsahující *S. thermophilus* a *Lb. delbrueckii* sups. *bulgaricus* dochází při teplotě 42 až 45 °C ke koagulaci kaseinu. Koagulace začíná při pH 5,3 a při pH 4,5 je ukončena. *S. thermophilus* je velmi náročný na obsah volných aminokyselin a jeho růst a metabolismus rychle ochabuje, pokud se v mléce tyto živiny rychle vyčerpají. Jeho partner v jogurtové kultuře však v dostatečné míře štěpí mléčné bílkoviny na volné aminokyseliny, čímž umožňuje další růst a metabolismus *S. thermophilus* [9]. Peptidázami *Lb. delbrueckii* sups. *bulgaricus* uvolněná aminokyselina threonin je významná pro vznik typické jogurtové vůně. Z threoninu vzniká působením threoninaldolázy, kterou produkuje *S. thermophilus*, acetaldehyd, který je v množství 20-40 mg/l nosnou vonnou látkou jogurtu [9].

S. thermophilus také může syntetizovat exopolysacharidy, které vytvářejí typickou, žádoucí, vazkou texturu a viskozitu fermentovaných mléčných výrobků. Kultury produkující tyto exopolysacharidy jsou zvláště důležité při výrobě jogurtů. Nedávno bylo prokázáno zlepšení funkčních vlastností nízkotučných sýrů Mozzarella [26]. Naopak fyziologická role exopolysacharidů *S. thermophilus* není dostatečně vysvětlena, ale ani se neprokázalo, zda jsou prospěšné pro růst či přežití bakterií v mléce [27].

S. thermophilus se vyznačuje se tvorbou dvou mléčných dehydrogenáz produkujících L-laktát, čím se liší od jiných bakterií mléčného kvašení, které mají více jak jednu dehydrogenázu, ale tvoří DL-laktát. Fermentuje glukózu, laktózu, manózu a fruktózu. Laktózu v buňce štěpí β-galaktosidázou na galaktózu a glukózu. Oproti laktokokům mléčného kvašení se však dále fermentuje podle glykolytické dráhy pouze glukóza [9]. Galaktóza se hromadí v produktu, pokud není fermentována jiným zástupcem BMK. *S. thermophilus* konvertuje laktózu homofermentativně na nejméně 90 % laktátu v metabolitech i při růstu v substrátu s limitovaným obsahem sacharidu. Jen malou část mění na acetát a formiát. Formiát potom stimuluje v jogurtové kultuře růst *Lactobacillus delbrueckii* sups. *bulgaricus* nebo *Lactobacillus acidiphilus*.

Nejvýhodnější prostředí pro pěstování *S. thermophilus* je mléko. Lakmusové mléko nejprve zžloutne, potom se sráží a postupně se zespedu redukuje. Mléko sráží při 30 - 45 °C do jednoho dne. Přitom tvoří jen o něco málo více kyseliny mléčné než *Lactococcus lactic*. Je extrémně citlivý na antibiotika, zvláště v mléce (mastitida) [12]. Jeho růst inhibuje 0,01 m. j. penicilinu a 5 mg streptomycinu v 1 ml [9]. Izoluje se z mléka inkubací při 45 – 50 °C s následným přeočkováním na médium s hydrolyzovaným kaseinem a fermentovatelným sacharidem (např. laktóza).

1.3.3 Výskyt, význam a využití

S. thermophilus se vyskytuje v mléce a mléčných produktech buď samostatně nebo jako složka čistých zákysových mlékárenských kultur používaných při výrobě jogurtů, tvarohů a sýrů s vysoko dohřívanou sýřeninou. Jako kontaminant se vyskytuje ve výměnících tepla pasterizačních strojů v posledních částech kontinuálních odpařovacích zařízení na mléko. Divoké kmeny *S. thermophilus* způsobují chyby při zrání tvrdých sýrů [9].

S. thermophilus je „obecně považován za bezpečný“ druh. Lidským organismem je přijímáno přes 10^{21} živých buněk ročně [19]. *S. thermophilus* má větší význam v potravinářském průmyslu od té doby, co se masivně používá k výrobě mléčných výrobků (roční obrat kolem 40 miliard USD). Je považován za druhou nejdůležitější průmyslovou mléčnou kulturu po *Lactococcus lactic* [19, 27, 30].

V mlékárenské mikrobiologii se často využívá pro svoji schopnost fermentovat laktózu na kyselinu mléčnou spolu s jinými bakteriemi mléčného kvašení ve formě termofilních zákysů. Tato vlastnost se uplatňuje při výrobě jogurtů a na rychlé zvýšení kyselosti, resp. snížení hodnoty pH ještě ve výrobníku při výrobě sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou [9, 27]. Tradičně se používá v kombinaci s *Lactobacillem delbrueckii* subsp. *bulgaricus* nebo *Lb. helveticus* pro výrobu jogurtů a tvrdých „vařených“ sýrů (ementál, gruyère, grana), při relativně vyšších teplotách výroby (45 °C) [19, 26].

Kvůli své citlivosti na antibiotika se také využívá v mlékárenské analytice na zjišťování přítomnosti inhibičních látek v mléce.

1.4 Probiotika a prebiotika

Probiotické mléčné výrobky zaznamenaly v posledních letech v mlékárenství značný rozmach. Označení „probiotické“ pochází z řečtiny, volně přeloženo znamená „pro život“ a je vlastně protikladem označení antibiotický. Fuller (1986), původce tohoto označení, definuje tento pojem jako „aktivní potravinový doplněk, který má pozitivní účinek na organismus hostitele (člověk nebo zvíře) tím, že zlepšuje složení a navozuje rovnováhu v jeho střevní mikroflóře“ [9]. Obecně se jedná o bakterie, které mají schopnost překonávat vliv nepříznivého prostředí v žaludku člověka, t.j. nízkou hodnotu pH, přítomnost HCl, proteolytických enzymů a zejména lysozymu, který způsobuje lyzi některých, včetně pravých jogurtových bakterií. V zažívacím traktu musí snášet žlučové kyseliny a nízké povrchové napětí [9]. Významným selekčním faktorem, který probiotické bakterie musí překonat, je pohyblivost (peristaltika) střev, potažmo rychlost, s kterou přechází potravinový materiál

trávicím a zažívacím traktem člověka. Právě přežívání jogurtových bakterií (jmenovitě *S. thermophilus* a *Lactobacillum delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) při průchodu lidským zažívacím traktem, je věnována velká pozornost. Přežívání obou bakteriálních druhů v lidských výkalech bylo vyšetřováno kultivací na selektivním médiu. Z 39 vzorků získaných ze 13 zdravých jedinců, kteří po dobu 12 dní konzumovali čerstvý jogurt, 32 vzorků obsahovalo živé buňky *S. thermophilus* (střední hodnota $6,3 \times 10^4$ KTJ/g ve výkalech) a 37 vzorků *L. delbrueckii* (střední hodnota $7,2 \times 10^4$ KTJ/g ve výkalech) [28].

V tabulce 1.3 je uveden přehled probiotických bakterií. Tyto bakterie musí být jednoznačně lidského původu a pro lidský organismus úplně neškodné. V probiotických produktech, např. v jogurtech nebo v acidofilním mléce, mají být k datu trvanlivosti anebo při dřívější spotřebě přítomné v koncentraci více jak 10^6 KTJ/ml. Jen v této vyšší koncentraci mají ve střevě požadovaný zdravý prospěšný účinek [9].

Tab. 1.3: Přehled druhů potencionálních probiotických mléčných bakterií a jejich výskyt v mléčných výrobcích [22, upraveno].

Bakterie (rod/druh)	Výskyt v mléčném výrobku
<i>Bifidobacterium</i>	
<i>B. bifidum</i>	upravené výrobky (A/B/C mléka)
<i>B. longum</i>	upravené výrobky
<i>B. infantis</i>	upravené výrobky
<i>Lactobacillus</i>	
<i>Lb. acidophilus</i>	jogurt, upravené výrobky (A/B/C mléka)
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	jogurt (převážně zákysová kultura)
<i>Lb. casei</i>	upravené výrobky (A/B/C mléka)
<i>Lb. brevis</i>	upravené výrobky, některé sýry
<i>Lb. helveticus</i>	upravené jogurtové výrobky, některé sýry
<i>Lactococcus</i>	
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	sýr, podmásli, kyselá smetana
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	sýr, podmásli, kyselá smetana
<i>Leuconostoc</i>	
<i>Ln. lactis</i>	podmásli, kefir, kyselá smetana
<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	podmásli, kefir, kyselá smetana
<i>Streptococcus</i>	
<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	jogurt (převážně zákysová kultura)

Jogurt je nejvíce studovanou mléčnou kulturou ohledně zdravotních výhod. Obecně uznávaný léčebný účinek jogurtových bakterií spočívá ve snížení symptomů laktóзовé intolerance [22, 31]. Vedle tradičních mléčných výrobků, jsou vyvíjeny unikátní kultivované mléčné výrobky (např. acidofilní jogurt, jogurtové nápoje, kefir, různé druhy dalších fermentovaných výrobků používající různé kmeny BMK) [22]. Bylo popsáno, že kombinace *S. thermophilus* a probiotických druhů bakterií má pozitivní efekt při dětských průjmech, enterokolitidách u předčasně narozených dětí a účinně působí i proti zánětu střev [27]. Bylo prokázáno, že *S. thermophilus* zlepšuje účinnost bifidobakterií v probiotických směsných kulturách a působí jako ochrana proti průjmům vyvolaným rotaviry [27].

Termín **prebiotika** je definován jako složka potravy, která nepodléhá rozkladu trávicími enzymy a nedotčeně prochází do tlustého střeva, kde stimuluje růst specifických mikroorganismů, které příznivě ovlivňují lidské zdraví [5]. Prebiotické složky (např.

nestravitelné cukry jako jsou inulin nebo oligofruktóza) jsou často používány v kombinaci s probiotickými mikroorganismy (nazýváno „symbiotické potraviny“) [22].

1.5 Identifikace BMK s využitím DNA amplifikace

Nejnovější metody identifikace bakterií mléčného kvašení využívají amplifikační technik. V této kapitole jsou popsány jen ty amplifikační techniky, které byly používány k vypracování této diplomové práce pro identifikaci vybraných mikroorganismů ze skupiny bakterií mléčného kvašení. Jedná se o polymerázovou řetězovou reakci (polymerase chain reaction, PCR) a o magnetické separační techniky pro izolaci DNA v kvalitě vhodné pro PCR.

1.5.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Kary Mullis roku 1983 objevil způsob, jak může pomocí dvou oligonukleotidů a enzymu DNA polymerázy amplifikovat určitý úsek DNA. Tato technika byla nazvaná polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction, PCR) a jejímu autorovi Kary Mullisovi byla za její objevení udělena v roce 1993 Nobelova cena za chemii. PCR reakce je v současnosti, díky svojí vysoké citlivosti, specifitě a rychlosti, jednou z nejvíce používaných technik v molekulární biologii [1]. Tato metoda umožňuje až 10^6 násobné pomnožení fragmentu DNA během 2-3 hodin [2]. PCR našla široké uplatnění nejen v základním výzkumu, při klonování a analýze DNA, ale také v aplikovaném výzkumu a laboratorní diagnostice [1].

1.5.1.1 Princip a účinnost PCR

Polymerázová řetězová reakce umožňuje selektivní amplifikaci (zmnožení) určité oblasti DNA způsobem podobným in vivo DNA replikaci, přičemž velikost amplifikovaného úseku DNA ohraničují 2 oligonukleotidy – primery [1].

Amplifikace DNA v PCR probíhá v opakovaných reakčních cyklech a **každý cyklus se skládá ze 3 opakujících se kroků:**

1) Denaturace

Při denaturaci při teplotách 94 – 95 °C dochází k oddělení jednotlivých vláken DNA templátu (matrice), což umožní hybridizaci primerů. Počáteční denaturace je potřebná zejména u komplexních DNA templátů (genomová DNA), aby došlo k úplnému přerušení vodíkových vazeb mezi DNA řetězci. Templátová DNA se už nikdy v následujících cyklech nerenaturuje, protože v reakci je velký nadbytek primerů, který obsadí komplementární sekvence. Krátké fragmenty DNA se denaturují lépe než dlouhé molekuly komplexní DNA [1].

2) Hybridizace (annealing)

V tomto kroku dochází k hybridizaci primerů k denaturovanému templátu DNA, při čem se uplatňují vodíkové vazby mezi komplementárními bázemi. Hybridizace probíhá při teplotě 40-72 °C, v závislosti na délce a sekvenci primerů.

Výběr teploty, při které se primer hybridizuje s templátem DNA – teploty annealingu – patří k nejkritičtějším krokům optimalizace PCR [1]. Pokud je teplota hybridizace příliš vysoká, primer „nenasedá“ na templát a neprobíhá tvorba produktu a naopak pokud je teplota annealingu příliš nízká, primer nasedá na nespecifické sekvence templátu a vznikají tak nespecifické produkty. Optimální teplota annealingu bývá blízká tzv. teplotě tání. Teplota tání je definována jako teplota, při které duplex primer/templát disociuje. Teplota tání závisí na složení a délce primerů a na dalších faktorech. Při výběru primerů je důležité, aby oba primery měly podobnou teplotu tání [1].

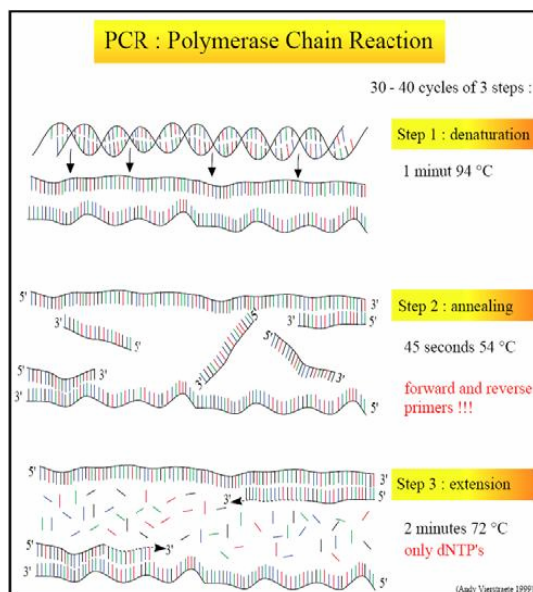
Kromě teploty annealingu je také důležité zvolit správnou dobu hybridizace. Pokud je v reakci relativní dostatek cílové sekvence, postačí 20 – 40 s. V komplexních templátech, kde je cílové sekvence v poměru k ostatní DNA velmi málo, je potřebné ponechat v prvních cyklech delší dobu hybridizace (např. 2 minuty), aby měly primery dostatek času najít danou komplementární sekvenci.

3) Syntéza komplementárního řetězce DNA (extenze, elongace)

Růst komplementárního DNA vlákna probíhá po dobu, kdy DNA polymeráza přisyntetizovává k 3'OH konci primerů nukleotidy podle sekvence templátu. Teplotu po dobu extenze určuje teplotní optimum použité DNA polymerázy (obvykle kolem 72 °C) a čas extenze určuje délku syntetizovaného produktu. V posledním cyklu je krok syntézy nového vlákna prodloužen, aby byla dokončena amplifikace všech produktů [5].

Denaturace, hybridizace a extenze tvoří první cyklus PCR. Jeden primer nasedá na jedno vlákno denaturovaného DNA templátu, druhý primer nasedá na druhé komplementární vlákno templátu. Úsek DNA ohraničený těmito primery se amplifikuje v opakovaných cyklech PCR a tím vznikne PCR produkt (Obr.1.5).

Za předpokladu 100 % účinnosti amplifikace lze ve všech 30-ti cyklech teoreticky získat $1,07 \times 10^9$ kopií DNA. Množství celkového produktu PCR roste s počtem cyklů exponenciálně a vypočítá se podle vztahu $x = x_0 \cdot 2^n$, kde „x“ je množství DNA produktu získané po „n“ cyklech, „ x_0 “ je množství DNA vložené do reakce. Číslo „2“ vyjadřuje teoretický předpoklad, že v každém cyklu se množství DNA zdvojnásobí (t.j. účinnost amplifikace je 100 %) [1] (Tab. 1.4). V praxi se ale hodnota účinnosti amplifikace „E“ pohybuje v exponenciální fázi reakce v rozmezí 0,5 - 0,9 (50 - 90 %). Vztah pro výpočet celkového množství produktu PCR má potom tvar $x = x_0 \cdot (1+E)^n$. Navíc, po určitém počtu cyklů, v závislosti na množství vloženého templátu a účinnosti amplifikace, přestává platit exponenciální závislost mezi množstvím PCR produktu a počtem cyklů. Po proběhnutí většího počtu cyklů dochází až k úplnému zastavení amplifikace a množství PCR produktu se už nezvyšuje, reakce je „nasyčená“, nastává plató. Čím je do reakce vloženo více DNA, tím více produktu se získá v exponenciální fázi reakce, ale zároveň se dříve dosáhne plató [1]. Důvodem plató efektu nemusí být vyčerpání, anebo degradace některých reakčních složek, ale také nahromadění produktu PCR, že z termodynamického důvodu dochází k přednostní reasociaci PCR produktů před vazbou primerů.



Obr. 1.5: Stručné schéma prvního cyklu PCR [6].

Tab. 1.4: Teoretický počet jednotlivých amplifikačních produktů PCR po ukončení různého počtu amplifikačních cyklů při 100 % účinnosti amplifikace. Jako templát byla vložena 1 dvojvláknová molekula DNA.

počet cyklů	Množství celkového produktu	počet cyklů	Množství celkového produktu
1	2	16	65536
2	4	17	131072
3	8	18	262144
4	16	19	524288
5	32	20	1048576
6	64	21	2097152
7	128	22	4194304
8	256	23	8388608
9	512	24	16777216
10	1024	25	33554432
11	2048	26	67108864
12	4096	27	134217728
13	8192	28	268435456
14	16384	29	536870912
15	32768	30	1073741824

Pokud reakci provádíme s novou templátovou DNA, novými primery nebo novou termostabilní DNA polymerázou, je třeba PCR optimalizovat. Optimalizace se provádí z důvodů potlačení nespecifické amplifikace a z důvodu zvýšení výtěžku požadovaného PCR produktu [4].

1.5.1.2 Reakční podmínky PCR

PCR reakce probíhá v termocykléru tj. zařízení, které zajišťuje optimální teplotní podmínky pro provádění PCR. U termocykléru lze naprogramovat průběh celého procesu čili počet cyklů, teplotu jednotlivých kroků, dobu trvání apod. [5]. Kvalitu termocykléru určuje to, jak přesně je schopný udržet nastavené teploty a jak rychle a přesně dokáže měnit teploty mezi jednotlivými kroky cyklu [1].

Reakční směs, obvykle o objemu 25 - 100 μl , obsahuje:

- **PCR voda** - používá se na doplnění PCR směsi na požadovaný objem. Nejvhodnější je voda o odporu 18 M Ω nebo voda pro injekce dle ČSN.
- **PCR pufr** - vytváří optimální prostředí pro DNA polymerázu [5]. Na udržení potřebného pH se jako tlumivý roztok používá obvykle Tris-HCl o koncentraci v PCR 10-50mM a pH 8,3. Nejdůležitější složkou základního reakčního roztoku jsou ionty Mg^{2+} (obvykle v podobě MgCl_2 , MgSO_4), které ovlivňují specifčnost i výtěžek PCR. Ionty hořčíku jsou potřebné na udržení enzymatické aktivity *Taq* DNA polymerázy, přičemž enzym vyžaduje dostupnost volných iontů [1]. Ionty jsou vázány nukleotidy nebo i jinými látkami, takže při zvýšené koncentraci těchto látek v reakci je nutné zvýšit i obsah iontů hořčíku, aby DNA polymeráza zůstala funkční. Obvyklá finální koncentrace iontů hořčíku bývá 1-5 mM. Různé kombinace templát/primer mohou mít různé požadavky na koncentraci Mg^{2+} , takže je potřeba jejich množství optimalizovat. Z tohoto důvodu Mg^{2+} často nebývají součástí základního reakčního pufru dodávaného výrobcem, ale jsou dodávány jako samostatný roztok, což umožňuje připravit sadu reakcí lišících se koncentrací Mg^{2+} .
- **dNTP** (3'-deoxynukleosid-5'-trifosfáty) - deoxynukleosidtrifosfáty představují základní stavební kameny pro výstavbu nového řetězce DNA. Standardní PCR reakce obsahuje ekvimolární množství každého nukleotidu dATP, dCTP, dGTP a dTTP o výsledné koncentraci 200-250 μM [4]. Zvýšená koncentrace dNTP (>4mM) inhibuje PCR reakci tím, že vyvazuje ionty Mg^{2+} .
- **primery** - jsou to 2 oligonukleotidy, které se skládají obvykle z 20 - 25 nukleotidů, které sekvencí odpovídají sekvencím úseku DNA určeného k amplifikaci. Obsahují obvykle 40-60 % G+C. Telota tání primerů bývá v rozmezí 55-80 °C. Pro její výpočet se užívá vzorce: $T_m (^{\circ}\text{C}) = 2(\text{počet A+T}) + 4(\text{počet G+C})$ [5]. Primery by neměly umožňovat vznik nežádoucí sekundární struktury, měly by mít vyvážený poměr G/C a A/T párů a vzájemně by neměly být komplementární čili neměly by tvořit Sumery. Optimální koncentrace se zpravidla pohybuje mezi 0,1 - 0,6 μM .

Pro identifikaci bakterií rodu *Lactobacillus* byly navrženy rodově specifické primery [7]:

- **Primer LbLMA 1-rev** 5'-CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC-3'

Jeho sekvence je odvozena z mezerníkové oblasti mezi geny pro 16S a 23S rRNA. Tento primer rodově specifický.

- **Primer R16-1** 5'-CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA-3'

Jeho sekvenční je odvozena z koncové sekvenční 16S rRNA genu a je tudíž primerem univerzálním. Pomocí těchto primerů se amplifikuje úsek DNA o velikosti **250bp** specifický pro rod *Lactobacillus*.

Při identifikaci bakterií druhu *Streptococcus thermophilus* byly popsány druhově specifické primery Stern 1 a Stern 2 [23]:

- **Stern 1** 5'-CAC TAT GCT CAG AAT ACA-3'
- **Stern 2** 5'-CGA ACA GCA TTG ATG TTA-3'

Pomocí těchto primerů se amplifikuje úsek DNA o velikosti **968bp** specifický pro druh *S. thermophilus*.

Pro ověření amplifikovatelnosti DNA byly navrženy univerzální primery DG74 a RW01 [32]:

- **DG74** 5'-AGG AGG TGA TCC AAC CGC A-3'
- **RW01** 5'-AAC TGG AGG AAG GTG GGG AT-3'

Pomocí těchto primerů se amplifikuje úsek DNA o velikosti **370bp** ze všech mikroorganismů domény Baktéria.

Při identifikaci bakterií rodu *Enterococcus* byly použity druhově specifické primery E1 a E2 [24]:

- **E1** 5'-TCA ACC GGG GAG GGT-3'
- **E2** 5'-ATT ACT AGC GAT TCC GG-3'

Pomocí těchto primerů se amplifikuje úsek o velikosti **733bp** specifický pro rod *Enterococcus*.

Existuje celá řada počítačových programů sestavených pro návrh vhodných primerů [3]. Mezi ně patří:

1. <http://www.chemie.uni-marburg.de/~becker/prim-gen.html>
2. <http://alces.med.umn.edu/VGC.html>
3. <http://www.ebi.ac.uk/biocat/biocat.html>

▪ **DNA polymeráza** - syntetizuje novou DNA ve směru 5'→3' podle sekvenční nukleotidů v komplementárním řetězci DNA od místa primeru navázaného na templát až po jeho konec [5]. Zpočátku byly experimenty s PCR uskutečněné s Klenovým fragmentem DNA polymerázy I z bakterie *Escherichia coli* [1]. Tento enzym byl však

při vyšších teplotách inaktivován a reakce probíhala při teplotě 37 °C, což vedlo k tvorbě mnoha nespecifických produktů.

V současné době se výhradně používají polymerázy izolované z termofilních mikroorganismů. Nejčastěji se používá *Taq* DNA polymeráza z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, která žije v horkých pramenech. Tato polymeráza disponuje pouze 5'→3' endonukleázovou aktivitou, tudíž se v nově syntetizovaném řetězci mohou vyskytovat chyby [4]. *Taq* DNA polymeráza má teplotní optimum okolo 75 - 80 °C, kdy je jedna molekula enzymu schopná přidat k primeru asi 150 nukleotidů za sekundu [1]. Při nižších teplotách aktivita *Taq* polymerázy klesá. Při teplotách nad 90 °C je enzym inaktivní, ale není denaturovaný, přičemž po snížení teploty dochází ke znovuoživení enzymatické aktivity [1]. DNA polymeráza se vyznačuje kromě polymerázové aktivity také exonukleázovými aktivitami. 3'exonukleázová aktivita umožňuje opravu chybně zařazeného nukleotidu a označuje se jako „opravná aktivita“.

Do reakční směsi o objemu 25 - 50 µl se standartně přidává 0,5 - 2,5 U *Taq* DNA polymerázy, směs tedy obsahuje 2×10^{12} - 10×10^{12} molekul tohoto enzymu [4].

- **DNA templát** - slouží jako matrice pro syntézu nových řetězců DNA. Obsahuje cílová místa pro primery a do PCR může být přidáván v jedno nebo dvouřetězcové formě [5]. Kvalita templátové DNA výrazně ovlivňuje účinnost amplifikace. Vzorek DNA by měl být dostatečně čistý, aby neobsahoval inhibitory PCR, přičemž má obsahovat přiměřené množství DNA. Někdy zředění vzorku vede, následkem zředění inhibitorů PCR přítomných ve vzorku, k lepšímu výsledku [1]. Amplifikace uzavřené kružnicové DNA je méně účinná než u lineární formy [4]. Typická množství bakteriální a plazmidové DNA přidávané do reakce jsou 10 ng, 1 ng a 1 pg [5].

1.5.1.3 Charakteristika a působení inhibitorů PCR

PCR je široce používána metoda v molekulární diagnostice pro detekci mikroorganismů v komplexních biologických vzorcích. Je však limitována přítomností složek, které jednak inhibují PCR nebo mohou snižovat účinnost amplifikace [5]. Inhibitory mohou vést k falešně negativním výsledkům PCR reakcí a k chybné diagnostice.

Látky, inhibující amplifikaci nukleových kyselin v průběhu PCR reakce, mohou být extracelulárního nebo intracelulárního charakteru. K intracelulárním inhibitorům, tj. inhibitorům přítomným uvnitř bakteriálních buněk, řadíme např. endogenní nukleázy (u stafylokoků, salmonel, kampylobakterů), peptidy (u kampylobakterů), proteinázy, polysacharidy. Extracelulární inhibitory, tj. inhibitory nacházející se ve vzorcích mimo bakteriální buňky, obecně zahrnují komponenty a reagenty vzorků např. krev (hemoglobin, IgG), močovina, heparin, potraviny a jejich složky (Ca^{2+} v mléce, mléčné proteinázy, glykogen, tuky), složky životního prostředí (humínové kyseliny, těžké kovy), složky kultivačních médií (žlučové kyseliny a soli), detergenty, ionty, antibiotika, proteiny, minerální oleje a další [5].

Podle mechanismu inhibice rozdělujeme inhibitory do tří skupin. Zařazení do těchto skupin není absolutní, protože inhibitory mohou působit více jak jedním způsobem v závislosti na chemických, enzymatických a fyzikálních podmínkách reakce [5].

Inhibitory obvykle působí následujícími mechanismy:

- **zabraňují dostatečně účinné buněčné lyzi nutné k uvolnění DNA**

Základní podmínkou amplifikace DNA je, že dojde k lyzi buněk a k uvolnění nukleových kyselin, které jsou dále podrobeny amplifikaci. Porušení integrity buněčné stěny nemusí být dostatečné a tudíž nedojde k uvolnění DNA pro amplifikaci. Nedostatečná lyze buněk může nastat jak v důsledku nevhodně volených reakčních podmínek tak i v důsledku inaktivace nebo nízké kvality lytických enzymů [5]. Při práci s hrubými lyzáty buněk někdy dochází k nedostatečnému oddělení uvolněné DNA od strukturálních proteinů a proteinů, vázaných se na DNA, a výsledkem je inhibice PCR. Proteolytické enzymy, denaturační činidla či fenolové látky obsažené ve vzorcích mohou degradovat enzymy používané pro lyzi buněk.

- **degradují cílové nukleové kyseliny nebo primery, popřípadě obsazují jejich vazebná místa**

Degradace cílové DNA nebo primerů způsobuje selhání reakce. Degradace DNA může nastat vlivem fyzikálních, chemických nebo enzymatických procesů. Rozpadá se hlavně z důvodů neenzymatické hydrolýzy, neenzymatické methylace, oxidačního poškození a enzymatické degradace [5]. Nukleázy mohou vstoupit do reakce z vnějšího prostředí díky neopatrné manipulaci se vzorkem, mohou být přítomny v cílovém mikroorganismu nebo v ostatních bakteriích přítomných ve vzorku. Nespecifické autodegradace mohou rovněž nastat, jsou-li v buňkách přítomny restriční endonukleázy [5].

- **inaktivují termostabilní DNA polymerázu (degradací nebo tvorbou komplexu s enzymem)**

Jako příčina inhibice je často uváděna interference s lytickými enzymy, které působí na DNA a proteiny a které ovlivňují vazbu mezi cílovou DNA a polymerázou. Proteolytické enzymy a denaturační činidla mohou také inaktivovat polymerázu, a proto musí být ihned po buněčné lyzi inaktivovány. Močovina může způsobit inhibici přímou denaturací polymeráz [5]. Fenolické látky ze vzorků, nebo zbytky po fenolové extrakci DNA mohou inhibovat reakci vyvázáním nebo denaturací polymerázy. Sýrové proteiny byly objeveny jako inaktivátory *Taq* polymerázy. Lze je odstranit pomocí extrakce horkým roztokem NaOH. Bakteriální proteázy a nukleázy, stejně jako degradační produkty buněk, žlučové kyseliny, soli žlučových kyselin a další faktory mohou zabránit amplifikaci (fyzikálně-chemická inhibice a enzymatická degradace) [5]. Výběrem vhodné polymerázy je možné účinněji amplifikovat nukleové kyseliny z určitého biologického materiálu bez nutnosti specifické úpravy vzorku před PCR.

1.5.2 Magnetické separační techniky a izolace DNA

Magnetické separační techniky využívající velmi malé magnetické částice s vázanými afinitními ligandy představují nový progresivní trend v oblasti separačních technik.

Magnetické separace jsou jednou z možností, jak v některých případech urychlit nebo usnadnit některé běžně používané separační a purifikační postupy. Jejich použití může být zvláště výhodné při práci v heterogenních systémech, zejména pro izolaci minoritních složek z komplexních systémů bez předchozí (nebo jen částečné) purifikaci.

1.5.2.1 Princip bioseparace pomocí dvoufázového systému

Mezi významné separační metody patří extrakce, tj. rozdělování látek mezi dvě nemísitelné fáze. Princip extrakce je primárně založen na chemických vlastnostech, jako je hydrofobicita a hydrofilita jednotlivých látek a jejich vzájemných interakcí [10]. Dvoufázový vodný systém je alternativou tradičních extrakčních technik, založených na rozdělování látek mezi organickou a vodnou fází. Tradiční dvoufázové systémy používané k bioseparaci jsou složeny ze dvou nemísitelných polymerů ve vodném roztoku, například PEG/NaCl, dextran/PEG (polyethylenglycol; $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$) [10]. Obě fáze obsahují zejména vodu a to ze 70-90 %. Nemísitelnost jednotlivých fází je přisuzována rozdílu hustoty vodných roztoků v jednotlivých fázích. Ve dvoufázovém systému horní fázi tvoří převážně poly-ethylenglykol. Tento jev je pravděpodobně způsoben hydrofobním prostředím a methylenovými skupinami polyethylenglykolu [10].

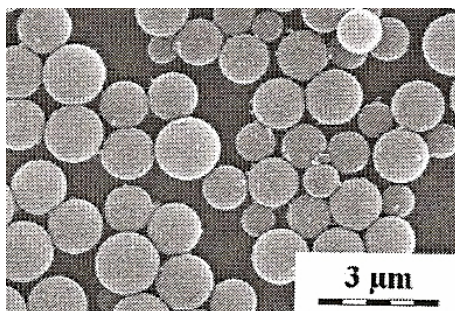
Individuální DNA řetězec zaujímá tvar podlouhlé spirály, pokud je rozpuštěn ve vodném solném roztoku [17]. Za určitých nepříznivých podmínek, molekula DNA může podlehnout strukturnímu přechodu z rozbaleného spirálovitého tvaru do zhrouceného stavu. Tento přechod je indukován polyethylenglykolem (PEG) ve směsi rozpouštědla obsahující tlumící sůl, vodu a methanol [17].

1.5.2.2 Příprava magnetických nosičů

V této diplomové práci byly použity magnetické mikročástice poly(2-hydroxyethyl methakrylát-co-glycidyl methakrylát (P(HEMA-co-GMA)) (1/1,w/w) o velikosti 2,2 μm , které byly připraveny na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR v Praze. Magnetické částice byly získány disperzní kopolymerací 2-hydroxymethakrylátu a glycidyl methakrylátu v prostředí toluenu/2-methylpropan-1-olu a koloidní olejové kyseliny, která pokrývala povrch magnetitu Fe_3O_4 ($\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$), který tvoří magnetické jádro. Hydroxylové skupiny na povrchu mikročástic byly oxidovány 2 % vodným roztokem manganistanu draselného v kyselém prostředí (2mol/l H_2SO_4) na karboxylové skupiny [16]. Obsah karboxylových skupin byl 0,764 mmol/l $-\text{COOH/g}$ [14]. Jako kontrola bylo použito magnetické sklo (2 mg/ml).

1.5.2.3 Vlastnosti magnetických nosičů

Magnetické částice (Obr.1.6) používané k izolaci DNA jsou superparamagnetické látky, tzn. že vykazují magnetické vlastnosti pouze v přítomnosti vnějšího magnetického pole. Většinou nemají zbytkový magnetismus a tudíž se bez přítomnosti vnějšího magnetického pole neshlukují a vytváří homogenní suspenzi. Ze vzorku lze nosiče odstranit pomocí magnetického separátoru [10].



Obr. 1.6: Mikroskopický snímek magnetických částic.

Nosič pro izolaci DNA musí splňovat následující podmínky:

4. být chemicky stabilní v podmínkách vyžadovaných pro vazbu DNA na nosič
5. být odolný k mikroorganismům a enzymové degradaci
6. být rigidní, nerozpustný ve vodě, hydrofilní, nejlépe sférického tvaru
7. obsahovat dostatečný počet skupin k navázání ligandu
8. mít dostatečně velký specifický povrch
9. docházet k minimálním nespecifickým sorpcím na nosič
10. mít v případě magnetických nosičů velmi nízký zbytkový magnetismus po odstranění vnějšího magnetického pole
11. mít nízkou cenu, umožňovat snadnou manipulovatelnost
12. nesmí interferovat v PCR

1.5.2.4 Využití magnetických nosičů

Od počátku 70.let se mnohé magnetické separace začaly uplatňovat v řadě aplikací a různých oblastech biotechnologie. Magnetické částice se staly atraktivní pro využití hlavně v biologii a lékařství pro diagnostiku a terapeutická použití. V diagnostice, magnetické senzory a magnetické nanočástice jsou zaměřeny na detekci individuálních nádorových buněk v jejich počátečním stádiu [16]. Navíc, magnetické částice jsou užitečné v genomové analýze, kde se molekulární metody stávají stále důležitější [15]. Reverzibilní imobilizace na pevné fázi (SPRI) na magnetických částicích s funkčními karboxylovými skupinami je velice vhodná například pro izolaci DNA fragmentů. Porovnáním s běžnými metodami, práce s magnetickými částicemi je rychlá jednoduchá, citlivá, bezpečná a DNA se získá ve vysokém výtěžku a čistotě [15]. Toto dělá SPRI slibnou také pro identifikaci patogenních bakterií v potravinářském průmyslu.

Magnetické částice našly uplatnění v řadě aplikací [10]:

13. imobilizace enzymů a jejich následné využití
14. izolace enzymů a jejich inhibitorů
15. izolace protilátek a antigenů
16. magnetická imobilizace léčiv a jejich následné využití k léčebným účelům
17. odstraňování těžkých kovů, především v laboratorních podmínkách
18. separace organických xenobiotik jako jsou karcinogeny a mutageny
19. možné použití k imunopurifikaci a následně v imunologických testech
20. využití k buněčné separaci
21. izolace a purifikace DNA v molekulární diagnostice

2. CÍL PRÁCE

1. Amplifikovat specifický PCR produkt a stanovit citlivost PCR s využitím rodově specifické PCR *Lactobacillus* a druhově specifické PCR *Streptococcus thermophilus*.
2. S využitím magnetických nosičů izolovat celkovou DNA z 10 vybraných mléčných kysaných výrobků a použít ji pro prokázání přítomnosti DNA *S. thermophilus* druhově specifickou PCR.
3. Prokázat přítomnost bakterií druhu *S. thermophilus* v 25 lyofilizátech kmenů *S. thermophilus* sbírky Laktoflóra. K tomu použít DNA izolovanou magnetickým nosičem a DNA izolovanou fenolovou extrakcí.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Kultivační média a roztoky

3.1.1 Kultivační média

- **MRS médium**

MRS médium (Oxoid, England) se připraví podle návodu výrobce. Sterilovat v autoklávu při 121 °C/15 minut. Poté se sterilně přidá glukóza (LACHEMA, CZ) v množství odpovídající výsledné koncentraci 5 g/l.

- **MRS agar**

MRS médium se připraví podle návodu výrobce. Přidá se agaróza (15 g/l, Invitrogen, Scotland, UK). Sterilizovat se v autoklávu při 121 °C/15 minut. Poté se sterilně přidá glukóza v množství odpovídající výsledné koncentraci 5 g/l.

- **M17 médium**

18,63 g M17 broth (Oxoid, England) nasypat do 475 ml destilované vody. Sterilovat v autoklávu při 121 °C/15 minut. Poté sterilně přidat 25 ml 10 % roztoku laktózy (LACHEMA, CZ), rozplnit do alikvotů a uchovávat v ledničce.

- **M17 agar**

37,25 g M17 broth rozpustit v 950 ml destilované vody a poté přidat 12 g agarózy. Sterilovat v autoklávu při 121 °C/15 minut. Poté sterilně přidat 50 ml 10 % roztoku laktózy a rozlít na Petriho misky.

- **Bile esculin azide agar**

56,2 g Bile esculin azide agar (Biokar, Francie) rozpustit v 1 l destilované nebo deionizované vody. Pomalu přivést k varu a míchat až do úplného rozpuštění. Rozplnit do alikvotů a sterilovat v autoklávu při 121 °C/15 minut. Poté rozlít na Petriho misky.

- **Krevní agar**

Byl dodán již ve formě utuženého agaru na Petriho miskách od firmy Merck spol. s.r.o. (Německo)

3.1.2 Roztoky pro izolaci bakteriální DNA, přípravu hrubých lyzátů bakteriálních buněk a agarózovou gelovou elektroforézu

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

202,225 g EDTA (Serva, Heidelberg, SRN) nasypat do 800 ml destilované vody, umístit na magnetickou míchačku. pH upravit přidáním asi 20 g NaOH v peletkách. Nejprve přidat 15 g a potom zbytek za kontroly pH. EDTA se rozpustí v pH 8,0. Doplnit destilovanou vodou do 1 l. Roztok je možné přefiltrovat. Sterilizovat v autoklávu. Rozplnit do alikvotů.

- **70 % ethanol**

Smíchat 70 ml 96 % ethanolu a 26 ml destilované vody.

- **Lyzační roztok A (10 mM Tris pH 7,8, 5 mM EDTA pH 8,0)**

Smíchat 1 ml 1M Tris o pH 7,8 (PENTA, Chrudim), 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 98 ml destilované vody. Sterilizovat v autoklávu.

- **Lyzační roztok B (10 mM Tris pH 7,8, 5 mM EDTA pH 8,0, lysozym 3 mg/ml)**

Sterilně smíchat 1 ml 1M Tris (pH 7,8), 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 98 ml destilované vody. Před použitím do roztoku přidat lysozym (DIFCO LABORATORIES, Detroit, USA) v množství 3 mg/ml. Připravuje se vždy čerstvý.

- **5 M NaCl**

58,4 g NaCl rozpustit ve 150 ml destilované vody. Doplnit destilovanou vodou do 200 ml. Sterilizovat v autoklávu.

- **1 M NaOH**

40 g NaOH rozpustit v 800 ml destilované vody. Doplnit do 1 l. Rozplnit do alikvotů. Sterilizovat v autoklávu.

- **3 M octan sodný, pH 5,2**

408,1 g trihydrátu octanu (LACHEMA,CZ) sodného rozpustit v 800 ml destilované vody. Upravit pH na 5,2 ledovou kyselinou octovou. Doplnit destilovanou vodou do 1 l. Rozplnit do alikvotů. Sterilizovat v autoklávu.

- **40 % PEG**

40 g PEG 6000 (Fluka, Germany) rozpustit v 60 ml sterilní destilované vody. Doplnit sterilní destilovanou vodou do 100 ml. Sterilizovat v autoklávu při 121 °C/15 minut. Uchovávat při 4 °C.

- **SDS (10 %, 20 %)**

10 (20) g SDS (Sigma, St. Lois, USA) rozpustit v 90 (80) ml destilované vody. V případě pomalého rozpouštění zahřát na 68 °C. Upravit pH na 7,0 několika kapkami koncentrované HCl. Doplnit destilovanou vodou do 100 ml. Nemusí se sterilizovat. Při vážení práškového SDS je nutno používat ústenku.

- **5 x TBE pufr**

54 g Tris-báze (PENTA, Chrudim) a 27,5 g kyseliny borité (Lachema, ČR) rozpustit v 600 ml destilované vody. Přidat 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0. Upravit pH na 8,3 pomocí 1 M NaOH. Doplnit destilovanou vodou do 1 l. Lze přefiltrovat a sterilizovat v autoklávu. Před použitím se 10 x naředí na výslednou koncentraci 45 mM Tris, 45 mM kyselina boritá a 1 mM EDTA.

- **10 x TE pufr**

10 ml 1 M Tris-báze pH 8,0 a 2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 rozpustit v 900 ml destilované vody, upravit pH na 8,0 pomocí 1 M NaOH. Doplnit destilovanou vodou do 1 l. Rozplnit do alikvotů. Připravit sterilně nebo sterilizovat v autoklávu při 121 °C/15 minut. Před použitím se 10x zředí sterilní destilovanou vodou na výslednou koncentraci 0,01 M Tris a 0,001 M EDTA.

- **1 M Tris pH 7,8**

12,1 g Tris-báze rozpustit v 80 ml destilované vody. Upravit pH pomocí koncentrované kyseliny HCl. Doplnit destilovanou vodou do 100 ml. Sterilizovat v autoklávu.

- **CIZ (chloroform-izoamylalkohol)**

Směs chloroformu a izoamylalkoholu (LACHEMA, CZ) v poměru 24:1.

- **Fenol pH 7,8**

Destilovaný fenol (LACHEMA, CZ) nasycený v TE pufru, pH 7,8.

- **Proteináza K (1mg/ml, 100 µg/ml) - Sigma, St. Lois, USA**

- **RNáza A (100 µg/ml) - Sigma, St. Lois, USA**

- **Nanášecí pufr (2,5 % Ficoll 400) - Top-Bio, Praha, CZ**

- **Magnetické částice Fkol 77ox (2 mg/ml) - Ústav makromolekulární chemie akademie věd, Praha, CZ**

- **Standard Malamité - Malamité v.o.s.**

- **Ethidiumbromid (500 µg/ml) - Sigma, St. Lois, USA**

- **PCR komponenty - Top. Bio, Praha, CZ (není-li uvedeno jinak)**

3.1.3 Použité chemikálie

Běžné chemikálie v čistotě p.a. byly získány z dostupných zdrojů.

3.1.4 Komponenty PCR pro rod *Lactobacillus*

- PCR voda
- Reakční pufr kompletní pro *Taq* DNA polymerázu 1.1 (10 x koncentrovaný)
- dNTP směs (10mM)
- primer LbLMA 1 (10 pmol/μl) - Generi-Biotech, Hradec Králové, CZ
- primer R 16-1 (10 pmol/μl) - Generi-Biotech, Hradec Králové, CZ
- *Taq* 1.1 polymeráza (1U/μl)

3.1.5 Komponenty PCR pro rod *Streptococcus*

- PCR voda
- Reakční pufr kompletní pro *Taq* DNA polymerázu 1.1 (10 x koncentrovaný)
- dNTP směs (10mM)
- Sterm 1 (10 pmol/μl) - Generi-Biotech, Hradec Králové, CZ
- Sterm 2 (10 pmol/μl) - Generi-Biotech, Hradec Králové, CZ
- *Taq* 1.1 polymeráza (1U/μl)

3.1.6 Komponenty PCR při použití univerzálních primerů

- PCR voda
- Reakční pufr kompletní pro *Taq* DNA polymerázu 1.1 (10 x koncentrovaný)
- dNTP směs (10mM)
- DG 74 (10 pmol/μl) - Generi-Biotech, Hradec Králové, CZ
- RW 01 (10 pmol/μl) - Generi-Biotech, Hradec Králové, CZ
- *Taq* 1.1 polymeráza (1U/μl)
- Hořečnaté ionty v podobě $MgCl_2$

3.1.7 Komponenty PCR pro rod *Enterococcus*

- HotStar Taq DNA PCR směs* - Qiagen, Německo
- E1 (10 pmol/μl) - Generi-Biotech, Hradec Králové, CZ
- E2 (10 pmol/μl) - Generi-Biotech, Hradec Králové, CZ

*Pro PCR byla použita HotStar *Taq* DNA PCR směs, která obsahuje HotStar *Taq* DNA polymerasu. Tato polymerasa je modifikovanou formou *Taq* DNA polymerasy. V PCR směsi je v inaktivovaném stavu, takže nemá žádnou polymerasovou aktivitu. Absence polymerasové aktivity brání extenzi nespecificky připojených primerů a vzniku primerových dimerů, které se jinak tvoří při nízkých teplotách na počátku PCR a během prvního PCR cyklu. HotStar *Taq* DNA polymerasa je aktivována až po 10 minutové inkubaci při 94 °C [34].

3.2 Bakteriální kultury

V experimentech byly použity bakteriální kmeny *S. thermophilus* získané ze Sbírký mlékařských kultur Laktoflora (CCDM, Tábor) a České sbírky mikroorganismů (CCM, Brno). Jednotlivé druhy použitých kmenů jsou uvedeny v tabulce 3.1. Mikroorganismy získané z České sbírky mikroorganismů byly použity jako referenční. Dále byla použita chromozomální DNA izolovaná z druhu *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* 212/06 pro přípravu hmotnostních standardů.

Tab. 3.1: Použité bakteriální kmeny

Název kultury	Sbírkové číslo - CCDM	Označení pro dipl. práci
<i>Streptococcus thermophilus</i>	33	1
<i>Streptococcus thermophilus</i>	45	2
<i>Streptococcus thermophilus</i>	439	3
<i>Streptococcus thermophilus</i>	440	4
<i>Streptococcus thermophilus</i>	487	5
<i>Streptococcus thermophilus</i>	490	6
<i>Streptococcus thermophilus</i>	534b	7
<i>Streptococcus thermophilus</i>	712	8
<i>Streptococcus thermophilus</i>	713	9
<i>Streptococcus thermophilus</i>	769	10
<i>Streptococcus thermophilus</i>	786	11
<i>Streptococcus thermophilus</i>	954	12
<i>Streptococcus thermophilus</i>	955	13
<i>Streptococcus thermophilus</i>	957	14
<i>Streptococcus thermophilus</i>	1008	15
<i>Streptococcus thermophilus</i>	1011	16
<i>Streptococcus thermophilus</i>	1012	17
<i>Streptococcus thermophilus</i>	1013	18
<i>Streptococcus thermophilus</i>	1014	19
<i>Streptococcus thermophilus</i>	1015	20
<i>Streptococcus thermophilus</i>	1022	21
<i>Streptococcus thermophilus</i>	1032	22
<i>Streptococcus thermophilus</i>	1033	23
<i>Streptococcus thermophilus</i>	1042	24
<i>Streptococcus thermophilus</i>	1045	25
<i>Lactobacillus paracasei</i> subs. <i>paracasei</i>	212/06	
Název kultury	Sbírkové číslo - CCM	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	4757	

CCM...Czech Collection of Microorganisms

CCDM...Culture Collection of Dairy Microorganisms

3.3 Kysané mléčné výrobky

Pro tuto diplomovou práci bylo zakoupeno 10 náhodně komerčně vybraných kysaných mléčných výrobků z prodejní sítě (v tabulce 3.2).

Tab. 3.2: Druhy mléčných výrobků.

č. vzorku	Název mléčného výrobku	Výrobce
I.	Chocoňský smetanový jogurt - bílý	Chocoňská mlékárna s.r.o.
II.	Smetanový jogurt z Valašska - borůvka	Mlékárna Valašské Meziříčí s.r.o.
III.	Florian - borůvka	OLMA s.r.o., Olomouc
IV.	Activia - sladká bílá	Danone a.s.
V.	Jogobella - jahoda	Zott GmbH & Co
VI.	Selský jogurt - borůvka	Hollandia Karlovy Vary a.s.
VII.	Bio jogurt - jahoda	OLMA s.r.o., Olomouc
VIII.	Dobrá máma - rozmixované jahody	Danone a.s.
IX.	Jihočeský zákys	Madeta a.s.
X.	Acidofilní mléko plnotučné	Mlékárna Valašské Meziříčí s.r.o.

3.4 Přístroje a pomůcky

- Laboratorní váhy (Kern & Sohn, Německo)
- Centrifuga mini Spin 14 500 min⁻¹ (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Centrifuga mini Spin 13 400 min⁻¹ (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Exikátor (KIF LAB Freiburg, Německo)
- Fotoaparát Polaroid CD34 na film T667 (Cambridge, Velká Británie)
- Fotoaparát Canon PC 1193 (Japonsko)
- Mikropipety Discovery HTL o objemu 10, 20, 200 a 1000 µl (Polsko)
- Mikrovlnná trouba SMW 5020 (SENCOR, ČR)
- Magnet s magnetickým pásem (DYNAL, Oslo, Norsko)
- Očkovací box (Fatran, ČR)
- Spektrofotometr Spekol 1300 (Jena, Německo)
- Termostat – Mini incubator (Labnet, USA)
- Termostat FTC 901 (VELP SCIENTIFICA, Miláno, Itálie)
- Minicycler PTC 100 (MJ Research, USA)

- Termocykler PTC 200 (BIO-RAD Lab., USA)
- Transiluminátor TVR 3121 (Spectroline, USA)
- Zařízení pro elektroforézu Easy-Cast, model B1 (Owl Scientific, USA)
- Zařízení pro elektroforézu Mini gel unit 7x10 cm (Hoefer, USA)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Lighting Volt Power Supply, model OSP-300 (Owl Scientific, USA)
- Běžné laboratorní sklo, umělohmotný laboratorní materiál a pomůcky

3.5 Metody

3.5.1 Kultivace bakteriálních buněk a ověření jejich čistoty

3.5.1.1 Kultivace buněk druhu *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* a ověření jejich čistoty

Z kultur uchovávaných při – 80 °C se bakteriální buňky vyočkují do tekutého média MRS s 0,5 % glukózou a kultivují se 24 hodin při teplotě 30 °C. Bakteriální kultura narostlá v tekutém živném médiu se křížovým roztěrem přenese na Petriho misku s agarem MRS a kultivuje se 24 hodin při 30 °C. Vzhled kolonií na misce se zkontroluje vizuálně.

3.5.1.2 Kultivace buněk druhu *Streptococcus thermophilus* a ověření jejich čistoty

Z kultur uchovávaných při – 80 °C se bakteriální buňky vyočkují do tekutého média M17 s 10 % roztokem laktózy a kultivují se 24 hodin při teplotě 37 °C. Bakteriální kultura narostlá v tekutém živném médiu se křížovým roztěrem přenese na Petriho misku s agarem M17 a kultivuje se 24 hodin při 37 °C. Vzhled kolonií na misce se zkontroluje vizuálně.

3.5.1.3 Kultivace bakterií z lyofilizátů buněčných kultur kmenů *Streptococcus thermophilus* získaných ze Sbírky mlékařských kultur mikroorganismů (CCDM, Tábor) a ověření jejich čistoty

Do vialek s lyofilizátem buněk se přidá 3 - 5 ml tekutého M17 média a dobře se rozsuspenduje. Z takto připravené kultury lze odebrat 1 ml buněk pro izolaci magnetickými nosiči bez předchozí kultivace. Zbytek ve vialkách se kultivuje 24 hodin při 37 °C. Poté se narostlá kultura přepipetuje do 10 ml tekutého M17 média ve zkumavce v množství 1-3 % objemových a nechá se kultivovat při 37 °C 24-48 hodin. Bakteriální kultura narostlá v tekutém živném médiu se křížovým roztěrem přenese na Petriho misku s agarem M17 a kultivuje se 24-48 hodin při 37 °C. Vzhled kolonií se na misce zkontroluje vizuálně.

3.5.1.4 Kultivace buněk rodu *Enterococcus* na Bile esculin azide agaru a poté na krevním agaru

Bakteriální kultura narostlá v tekutém živném médiu (v našem případě v médiu M17) se křížovým roztěrem přenese na Petriho misku s Bile esculin azide agarem a kultivuje se při 37 °C po dobu 24 až 72 hodin. Vzhled na misce se zkontroluje vizuálně, přičemž kolonie enterokoků tvoří malé průsvitné kolonie obklopené černým halo. Jedna z těchto narostlých kolonií byla vypíchnuta a kličkou rozetřena na krevní agar, kde probíhala kultivace při 37 °C po dobu 24 hodin. Vzhled narostlých kolonií byl odečítán na přítomnost α , β či γ -hemolýze dle kapitoly 1.2.2.

3.5.2 Izolace bakteriální DNA metodou fenolové extrakce

Není-li uvedeno jinak, byly jednotlivé postupy provedeny podle návodů k laboratorním cvičením Speciální metody analýzy mikroorganismů I. (Španová a Rittich 2006). Nepublikováno.

3.5.2.1 Příprava buněk pro izolaci DNA

1 ml narostlé kultury buněk v tekutém živném médiu M17 se přenese do 1,5 ml zkumavky eppendorf a připravená směs se zcentrifuguje při 10 000 otáčkách po dobu 3 minut. Vzniklý supernatant se slije a sediment se nechá okapat.

3.5.2.2 Lyze buněk

1. Získaný sediment se resuspenduje v 1 ml lyzačního roztoku A (viz kapitola 2.1.2). Nejdříve se přidá 100 µl roztoku, dobře se promíchá a poté se přidá zbývajících 900 µl a suspenze se opět důkladně promíchá.
2. Suspenze se centrifuguje při 10 000 otáčkách po dobu 3 minut. Supernatant se opatrně slije a sediment se nechá dobře okapat. K sedimentu se poté přidá 500 µl lyzačního roztoku B a dokonale se resuspenduje.
3. Vzorky se inkubují při laboratorní teplotě za občasného promíchání po dobu 1 hodiny.
4. K suspenzi se přidá 25 µl 10 % SDS a 5 µl proteinázy K (100 µg/ml) a promíchá se.
5. Vzorky se inkubují při 55 °C do projasnění roztoku, případně až do druhého dne. Občas se promíchají.
6. Do zkumavky eppendorf se odebere 20 µl hrubého lyzátu buněk a uschová se v chladničce pro gelovou elektroforézu.
7. Ke zbývajicímu roztoku se přidá 10 ml RNázy A (100 µg/ml) a po promíchání se inkubuje při 37 °C 30 minut.

Pokud analýza nenavazuje bezprostředně po izolaci, tak se vzorky uchovávají v mrazničce, aby se předešlo možné degradaci DNA.

Takto upravené vzorky DNA obsahují velké množství proteinů a fragmentů RNA, proto se provádí purifikace DNA metodou fenolové extrakce.

3.5.2.3 Fenolová extrakce

1. K lyzátu buněk se přidá stejný objem fenolu (předestilovaného, pH upraveno na 7,8). Směs se kývavým pohybem opatrně promíchává po dobu 4 minut. Důležité zaznamenávat čas.
2. Vzorek se centrifuguje při 14 000 otáčkách po dobu 3 minut.
3. Pomocí špičky s ustřiženým hrotem se odebere vodní fáze s DNA do sterilní eppendorfovy zkumavky. Nesmí dojít k odebrání proteinové mezivrstvy!
4. K vodní fázi s DNA se přidá 700 µl CIZ směsi a opatrně se kývavými pohyby promíchává 4 minuty.

5. Směs se centrifuguje při 14 000 otáčkách po dobu 3 minut.
6. Horní vodní fáze s DNA se odebere do sterilní eppendorfovy zkumavky.

3.5.2.4 Přesrážení DNA ethanolem

1. Pomocí pipety byl zjištěn přibližný objem vzorku DNA ve zkumavce.
2. Ke vzorku DNA byla přidána 1/10 objemu 3M octanu sodného a směs byla promíchána.
3. DNA se nechá vysrážet při -20 °C po dobu 15 minut.
4. Vzorek se centrifuguje při 14 000 otáčkách po dobu 15 minut. Supernatant se opatrně slije a dále se pracuje jen se sedimentem.
5. Sediment DNA se usuší v exikátoru po dobu asi 7 - 10 minut.
6. Usušený sediment DNA se rozpustí v 500 µl TE pufru.

Takto připravená DNA se použije pro agarózovou gelovou elektroforézu a pro spektrofotometrické měření. Uchovává se v ledničce.

3.5.3 Izolace DNA z tekutého mléčného výrobku

Vzorek výrobku se odebírá a dále zpracovává podle své konzistence.

- tekuté fermentované mléčné výrobky (nápoje) - bez prvotní úpravy
- jogurty - odebere se 10 g výrobku a přidá se 10 ml sterilní vody, vše se důkladně resuspenduje.

Další postup izolace je pro oba typy výrobků totožný.

1. Z tekutého mléčného výrobku je odebráno 2 x 1 ml vzorku do dvou 1,5 ml zkumavek a vzorky jsou centrifugovány při 14 000 otáčkách po dobu 5 minut.
2. Supernatant se opatrně jedním otočením slije a sediment se nechá dobře okapat.
3. Sediment se promyje v 1 ml sterilní vody.
4. Poté je vzorek opět centrifugován při 14 000 otáčkách po dobu 5 minut. Supernatant se opět opatrně jedním otočením slije a sediment se nechá okapat.

5. K sedimentu se přidá 1 ml lyzačního roztoku B (viz kapitoly 2.1.2), dobře se promíchá a hodinu se inkubuje při laboratorní teplotě.
6. Ke vzorku se přidá 50 μ l 20 % SDS (popř. 100 μ l 10 % SDS) a 5 μ l proteinázy K (1 mg/ml). Nechá se inkubovat do druhého dne při 55 °C.

Vzorek se v případě potřeby uchovává v mrazničce.

Z takto připravených hrubých lyzátů buněk se DNA izoluje metodou fenolové extrakce nebo pomocí magnetických nosičů. Přítomnost DNA v lyzátu buněk se ověřuje na 0,8 % agarózové gelové elektroforéze

3.5.4 Izolace DNA pomocí magnetických nosičů

3.5.4.1 Příprava směsi pro izolaci DNA magnetickými nosiči

Separační směs s nosiči je připravována v eppendorfových zkumavkách (1,5 - 2 ml) v různých objemech dle tabulky 3.3.

Tab. 3.3: Množství jednotlivých komponent pro přípravu separační směsi.

Komponenta (μ l)	Výsledná koncentrace PEG 6000		
	8 %		
voda	50	100	200
NaCl (5M)	100	200	400
PEG (40 %)	50	100	200
magn. částice (2 mg/ml)	25	50	100
vzorek (DNA, HL)	25	50	100
Výsledný objem (μl)	250	500	1000

Velmi důležité je pořadí smíchávání jednotlivých komponent separační směsi. Použitá pořadí jsou uvedena v tabulce 3.4.

Tab. 3.4: Pořadí komponent separační směsi.

pořadí	1.	2.	3.	4.	5.
pořadí 1	voda	NaCl	PEG	magn. částice	vzorek DNA
pořadí 2	voda	NaCl	vzorek DNA	PEG	magn. částice

3.5.4.2 Izolace DNA s využitím magnetických nosičů (reversibilní imobilizace na pevné fázi - SPRI)

1. Směs připravená dle tabulky 2.2 se promíchá a ponechá se inkubovat 15 minut při laboratorní teplotě.
2. Částice s navázanou DNA jsou odseparovány pomocí magnetu 15 minut za laboratorní teploty.

3. Supernatant se slije nebo odpipetuje a uvolní se magnet z magnetického pásu.
4. Zkumavka obsahující nosič s navázanou DNA se promyje 70 % ethanolem, jehož použité množství závisí na celkovém objemu vzorku (250 - 1000 μ l). Tento postup lze provést opakovaně nebo se nosič s DNA může odpipetovat do čisté zkumavky.
5. Částice s DNA jsou odseparovány magnetem 2 minuty za laboratorní teploty.
6. Ethanol se odpipetuje či slije a oddělí se magnetický pás.
7. Zkumavky se ponechají v horizontální poloze a krátce se vysuší při laboratorní teplotě nebo v termostatu po dobu asi 10 minut (do vypaření veškerého ethanolu).
8. Následně je DNA eluována do TE pufru 15 minut při laboratorní teplotě. Množství použitého TE pufru závisí na množství pipetovaného vzorku při přípravě separační směsi (25, 50 nebo 100 μ l TE pufru).
9. Eluovaná DNA po SPRI je přepipetována do čisté zkumavky.
10. Takto připravená DNA je použita na spektrofotometrické stanovení, agarózovou gelovou elektroforézu a do PCR.

3.5.5 Příprava DNA matrice pro PCR z buněk jedné bakteriální kolonie

3.5.5.1 Povaření buněk

1. Jednotlivá kolonie buněk narostlá na agarové misce je odebrána kličkou do 0,2 ml mikrozukavky a rozsuspendována ve 20 μ l PCR vody.
2. Směs je 10 minut povařena podle programu BOIL, poté zchlazena na ledu a krátce zcentrifugována.
3. 1 μ l lyzátu buněk je použit do PCR směsi jako DNA matrice.

3.5.5.2 Alkalická lyze buněk

1. Jednotlivá kolonie narostlá na agarové misce je odebrána kličkou do 0,2 ml mikrozukavky a rozsuspendována ve 20 μ l lyzačního roztoku (0,05 M NaOH, 0,25% SDS). Lyzační roztok se připravuje vždy čerstvý ze zásobního roztoku 1 M NaOH a 10 % SDS.
2. Směs je zahřívána 15 minut při teplotě 95 °C podle programu DENATURATE.
3. K lyzátu buněk je přidáno 180 μ l PCR vody. Lyzáť je zchlazen na ledu a krátce zcentrifugován.
4. 1 μ l lyzátu buněk je použit do PCR směsi jako DNA matrice.

3.5.6 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

1. Vzorek DNA 10 x ředěné v TE pufru se v celkovém objemu 100 μ l umístí do křemenné spektrofotometrické kyvety s optickou délkou 1 cm. Jako referenční vzorek se použije TE pufr.
2. Měření probíhá v rozmezí vlnových délek 220 - 320 nm.
3. Koncentrace DNA se stanoví z naměřené absorbance při vlnové délce 260 nm podle vztahu: $A_{260} = 1$ odpovídá koncentraci 50 μ g/ml (čili 50 ng/ μ l) DNA [25]:
4. Čistota DNA se stanoví z poměru hodnot absorbancí při vlnových délkách 260 nm a 280 nm: A_{260}/A_{280}

Absorpční maximum DNA leží v oblasti vlnové délky 260 nm, proteiny mají absorpční maximum v oblasti vlnové délky 280 nm. Pro určení čisté DNA je charakteristický poměr absorbancí $A_{260}/A_{280} = 1,8 - 2,0$. Pokud vzorek obsahuje proteiny, jsou hodnoty poměru menší než 1,8. Pokud vzorek obsahuje molekuly RNA, tak je poměr hodnot větší než 2,0. Pro kontrolu obsahu zbytků fenolu ve vzorku se ještě měří absorbance při vlnové délce 310 nm a pokud ve vzorku nejsou přítomny žádné zbytky fenolu, hodnoty absorbance jsou nulové. Není-li DNA dostatečně čistá, je třeba opakovat deproteinaci fenolem a srážení DNA ethanolem.

3.5.7 Agarózová gelová elektroforéza bakteriální DNA

1. Smícháním 0,4 g agarózy a 50 ml 0,5 x TBE pufru se připraví 0,8 % agarózový gel. Suspenze se důkladně rozvaří v mikrovlnné troubě za opakovaného míchání.
2. Roztok gelu se ochladí přibližně na teplotu 60 °C a rozlévá se do předem připravené elektroforetické vaničky a hřebínkem.
3. Gel se nechá ztuhnout na vodorovné podložce asi po dobu 1 hodiny za laboratorní teploty.
4. Před nanášením vzorků se ze zatuhlého gelu opatrně vytáhne hřebínek.
5. Na podložce z polyethylenu se smíchá určité množství DNA, vody a nanášecího STOP pufru. Zpravidla se jedná o 5 - 10 μ l DNA, 5 - 15 μ l vody a 5 μ l nanášecího STOP pufru pro detekci bakteriální DNA. Nanášecí STOP pufr obsahuje Ficoll, který způsobuje, že vzorek je těžší než voda, a proto nevymigruje z komůrky.
6. Pro určení množství DNA v hrubých lyzátech buněk se ze vzorku DNA o koncentraci 35 ng/ μ l (kmene *Lactobacillus*) připraví naředěním TE puftrem vzorky obsahující určité množství DNA (35, 70, 140, 280 a 350 ng) a přidá se STOP pufr a nanesou se na gel.
7. Vzorky DNA jsou opatrně naneseny do komůrek v agarózovém gelu postupně zprava doleva.

8. Gel se umístí do elektroforetické vany tak, aby záporně nabitá DNA putovala ke kladné elektrodě čili anodě. Gel se převrtává 0,5 x TBE pufrem přibližně do výšky 2 mm nad povrch gelu.
9. Elektroforéza probíhá zpravidla při napětí 60 V po dobu 1,5 hodiny. U jednotlivých výsledků jsou uvedeny použité hodnoty.
10. Po skončení gelové elektroforézy se gel barví roztokem ethidium bromidu o koncentraci 1 µg/ml po dobu 1 hodiny.
11. Obarvený gel se opláchne v destilované vodě a pozoruje se pod transiluminátorem v UV světle a fotografuje se Polaroid kamerou na film Polaroid 667.

3.5.8 Polymerázová řetězová reakce

3.5.8.1 Příprava PCR směsi

1. Všechny komponenty PCR reakce se před použitím vždy zkontrolují, opatrně promíchají a krátce centrifugují. Seřadí se ve stojánku v takovém pořadí, ve kterém se budou pipetovat. PCR směs se připravuje do 200 µl eppendorfových zkumavek.
2. Množství použitých PCR komponent jsou různé. Přesná množství jsou uvedena v tabulce 2.4, blíže pak vždy u jednotlivých výsledků. Celkový objem PCR směsi je roven 25 µl.
3. Při přípravě PCR směsi lze postupovat 2 způsoby. Při prvním způsobu se smíchají komponenty v určitém pořadí a jako poslední se přidá DNA matrice. Takto se analogicky postupuje u všech ostatních vzorků. Ve druhém případě je nejprve připravena směs komponent tzv. master mix. Master mix se připraví smícháním jednotlivých reakčních komponent vynásobených počtem vzorků a kontrol. 1 µl DNA matrice se vždy přidává k 24 µl master mix směsi až jako poslední.
4. Kontrola kontaminace reakčních komponent (negativní kontrola) se připraví smícháním 24 µl master mix směsi a 1 µl vody pro PCR, která nahradí DNA matici.
5. Jako kontrola specifity PCR reakce (pozitivní kontrola) se použije typový nebo sbírkový kmen z České sbírky mikroorganismů CCM Brno, ze kterého se DNA izoluje, purifikuje a ředí na potřebnou koncentraci.
6. Reakční komponenty se smíchávají v daném pořadí (viz tabulka 3.5)

Tab. 3.5: Složení jednotlivých PCR směsí.

Reakční komponenta	Množství (μl)
Složení PCR směsí pro druh <i>Lactobacillus paracasei</i> sups. <i>paracasei</i> CCDM 212/06	
PCR voda	do 25
10x reakční pufr kompletní	2,5
Směs dNTP (10 mM)	1
Primer LbLMA 1 (10 pmol/μl)	1
Primer RL 16-1 (10 pmol/μl)	1
DNA polymerasa 1.1 (1U/μl)	1-2
DNA matrice	1-2
Složení PCR směsí pro druh <i>Streptococcus thermophilus</i> (pro CCM i CCDM)	
PCR voda	do 25
10x reakční pufr kompletní	2,5
Směs dNTP (10 mM)	1
Primer Stern 1 (10 pmol/μl)	1
Primer Stern 2 (10 pmol/μl)	1
DNA polymerasa 1.1 (1U/μl)	1
DNA matrice	1-5
Složení PCR směsí při použití univerzálních primerů	
PCR voda	14,5
10x reakční pufr kompletní	2,5
Směs dNTP (10 mM)	1
Primer DG 74 (10 pmol/μl)	1
Primer RW 01 (10 pmol/μl)	1
DNA polymerasa 1.1 (1U/μl)	2
Hořčičnaté ionty (MgCl ₂)	2
DNA matrice	1
Složení PCR směsí pro rod <i>Enterococcus</i>	
Master mix	12,5
PCR voda	9,5
Primer E1 (10 pmol/μl)	1
Primer E2 (10 pmol/μl)	1

3.5.8.2 Provedení PCR reakce

1. Vzorky obsahující všechny složky PCR směsí se opatrně promíchají a krátce centrifugují. Zkumavky se umístí do termocykléru.
2. Termocyklér pracuje podle předem nastaveného programu viz tabulka 3.6.

Tab. 3.6: Programy pro průběh PCR reakcí rodu *Lactobacillus* (LBC ROD), *S. thermophilus* (STHER 30), rodu *Enterococcus* (Enterrod) a při použití univerzálních primerů (UNIV 30).

Program LBC ROD (kroky 1-3 se opakují 30x)		
Počáteční denaturace	94 °C	10 minut
Denaturace DNA	95 °C	30 sekund
Hybridizace primerů	55 °C	30 sekund
Syntéza řetězce DNA	72 °C	60 sekund (v posl.cyklu 7 minut)
Program STHER 30 (kroky 2-4 se opakují 30x)		
Počáteční denaturace	95 °C	5 minut
Denaturace DNA	95 °C	1 minutu
Hybridizace primerů	58 °C	1 minutu
Syntéza řetězce DNA	72 °C	2 minuty (v posl.cyklu 8 minut)
Program UNIV 30 (kroky 2-4 se opakují 28x)		
Počáteční denaturace	95 °C	5 minut
Denaturace DNA	95 °C	1 minutu
Hybridizace primerů	58 °C	1 minutu
Syntéza řetězce DNA	72 °C	2 minuty (v posl.cyklu 10 minut)
Program Enterrod (kroky 2-4 se opakují 28x)		
Počáteční denaturace	95 °C	15 minut
Denaturace DNA	95 °C	1 minutu
Hybridizace primerů	60 °C	1 minutu
Syntéza řetězce DNA	72 °C	1 minutu
Konečná syntéza řetězce DNA	95 °C	1 minutu

3.5.9 Agarózová gelová elektroforéza PCR produktu

Postupuje se stejným způsobem jako v kapitole 2.4.7. Pro identifikaci PCR produktu rodu *Lactobacillus* a pro PCR produkt, kde byly použity univerzální primery, se připravuje 1,8 % gel, v případě druhu *S. thermophilus* 1,2 % gel a v případě rodu *Enterococcus* 1 % gel. Na gel se nanáší 25 µl DNA a 5 µl nanášecího STOP pufru. Pro přesné určení velikosti amplifikovaného PCR produktu se na gel pro detekci vždy nanáší 5 µl standardu Malamité (o velikosti fragmentů 100 bp ladder: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500 bp).

3.5.10 EN-COCCUS test

Pracováno podle návodů od výrobce Pliva, Lachema, CZ.

Souprava EN-COCCUS test je určena pro rutinní druhovou identifikaci klinicky významných zástupců rodu *Enterococcus*. Souprava umožňuje provést identifikaci 36 kmenů, pomocí osmi biochemických testů: arginin, sorbóza, arabinóza, mannitol, sorbitol, melibióza, raffinóza a melezitóza. Souprava obsahuje mikrotitrační destičky, PE sáčky pro inkubaci a sterilní rámeček destičky s víčkem pro inkubaci.

1. Připraví se prázdný rámeček s víčkem.
2. Odříznou se 3 strany krycí fólie z transportní vaničky a vyjme se destička.

3. Pomocí skalpelu se odřízne počet stripů destičky, který odpovídá počtu testovaných kmenů.
4. Vyříznuté řady se vyjmou z destičky, sejme se ochranná Al fólie, řady se umístí do připraveného prázdného rámečku a překryjí se víčkem.
5. Do každé jamky příslušného řádku destičky se inokuluje 0,1 ml suspenze připravené podle návodu.
6. K jamkám sloupce H se přidají po inokulaci 2 kapky sterilního parafinového oleje.
7. Rámeček s naočkovanými řadami se vloží do inkubačního PE sáčku a EN-COCCUS test se vloží do termostatu na 37 °C na 24 hodin.
8. Poté se odečtou barevné reakce a zaznamenají do příslušných tabulek.

Postup při vyhodnocení (viz tabulka 3.7 a obrázek 3.1):

1. Výsledky, zaznamenané do formuláře pro záznam výsledků, jsou rozděleny do tří skupin (2 trojice a 1 dvojice testů) a v každé skupině jsou testům přiřazena čísla 1, 2 a 4.
2. Při výpočtu profilu se sečtou v každé skupině testů hodnoty čísel u testů s pozitivní reakcí (testům s negativní reakcí se přiřazuje hodnota nula).
3. Součet se запиše do příslušného políčka řádku „profil“ ve formuláři, kdy výsledné **3ciferné číslo = profil**.

Tab. 3.7: Příklad výpočtu profilu.

H	G	F	E	D	C	B	A	
ARG	SOE	ARA	MAN	SOR	MLB	RAF	MLZ	
1	2	4	1	2	4	1	2	
+	-	-	+	+	-	-	-	- EN-COCCUS test - číselné hodnoty testů - výsledky reakcí
1	(0)	(0)	1	2	(0)	(0)	(0)	- součet hodnot
1			3			0		- profil

V indexu nalezená identifikace, která odpovídá profilu 130, přísluší druhu *Enterococcus faecalis*. Interpretace barevných reakcí je znázorněna na obrázku 3.1.

		H	G	F	E	D	C	B	A
		ARG	SOE	ARA	MAN	SOR	MLB	RAF	MLZ
+	+	Yellow	Orange	Yellow	Orange	Yellow	Orange	Yellow	Orange
-	-	Orange	Red	Orange	Red	Orange	Red	Orange	Red

Obr. 3.1: Barevná škála reakcí.

4. VÝSLEDKY

4.1 Stanovení citlivosti rodově specifické PCR - DNA *Lactobacillus paracasei* sups. *paracasei* CCDM 212/06

4.1.1 Kultivace v tekutém médiu a na pevném agaru s ověřením čistoty bakteriální kultury

Po 18 hodinách kultivace v tekutém MRS médiu bakteriální kmen bakterií rodu *Lactobacillus paracasei* sups. *paracasei* CCDM 212/06 vytvářel mléčný zrnitý zákal (důkaz růstu buněk).

➤ Kmen rostl v zákalu.

Kultura *Lactobacillus paracasei* sups. *paracasei* CCDM 212/06 narostlá v tekutém médiu MRS byla naočkována křížovým roztěrem na plotny s utuhlým MRS agarem a po 24 hodinách kultivace při 37 °C byl vizuálně zkontrolován vzhled kolonií.

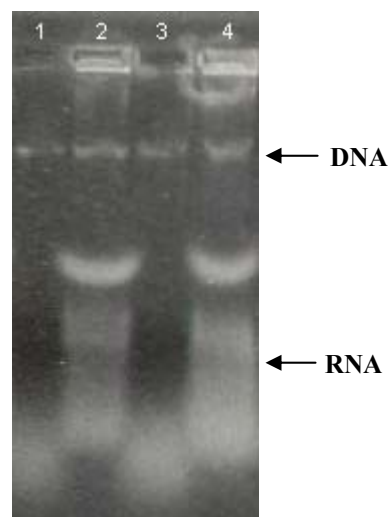
➤ Jednotlivé narostlé kolonie byly bílého lesklého vzhledu a stejné velikosti (z čehož lze předpokládat, že se pracuje s čistou kulturou).

4.1.2 Izolace bakteriální DNA kmene *Lactobacillus paracasei* sups. *paracasei* CCDM212/06

Bakteriální DNA byla izolována z hrubých lyzátů buněk, přečištěna metodou fenolové extrakce a přesrážena 96 % ethanolem. Přítomnost izolované DNA byla ověřena agarózovou gelovou elektroforézou na 0,8 % agarózovém gelu, která probíhala po dobu 2 hodin při napětí 60 V (obrázek 4.1).

Běh. č.	DNA	detekce DNA	poznámka
1	purifikovaná DNA	+	
2	HL buněk	+	*
3	purifikovaná DNA	+	
4	HL buněk	+	*

*HL = hrubý lyzát +...DNA detekována



Obr. 4.1: Agarózová gelová elektroforéza purifikované DNA a DNA z hrubého lyzátu buněk kmene *Lactobacillus paracasei* sups. *paracasei* CCDM 212/06.

➤ Na gelu byla vizualizovaná různá množství DNA ve všech vzorcích.

4.1.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty purifikované DNA kmene *Lactobacillus paracasei* sups. *paracasei* CCDM 212/06

Výsledky spektrofotometrického stanovení DNA jsou uvedeny v tabulce 4.1. Na základě spektrofotometrického měření byla stanovena koncentrace a čistota vzorku DNA. Koncentrace DNA byla vypočítána z naměřené absorbance při 260 nm na 23 ng/μl. Čistota DNA byla stanovena z poměru hodnot absorbancí při 260 nm a 280 nm jako 1,84.

Tab. 4.1: Spektrofotometrické stanovení purifikované bakteriální DNA.

A ₂₆₀ nm	A ₂₈₀ nm	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	koncentrace DNA (ng/μl)
0,46	0,25	1,84	23

- Byla izolována DNA o koncentraci 23 ng/μl v objemu 500 μl. Poměr hodnot absorbancí při 260 nm a 280 nm byl stanoven na 1,84.

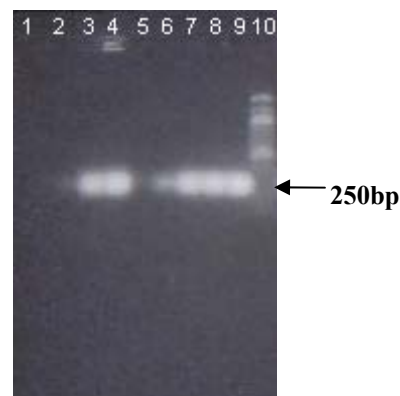
4.1.4 Provedení rodově specifické PCR reakce s purifikovanou DNA kmene *Lactobacillus paracasei* subs. *paracasei* CCDM 212/06

Vzorek purifikované DNA o koncentraci 10 ng/μl byl naředěn až na koncentraci 1 pg/μl TE pufrem. Vzorek hrubého lyzátu buněk byl naředěn TE pufrem bez původního stanovení koncentrace 10x, 100x a 1000x. Při smíchávání PCR komponent bylo pipetováno po 0,5 μl primerů LbLMA 1 a RL 16-1, po 1 μl Taq 1.1 polymerázy a DNA matrice. Detekce probíhala na 1,8 % gelu při napětí 60 V po dobu 2 hodin. Výsledky agarózové gelové elektroforézy PCR produktů jsou uvedeny na obrázku 4.2.

běh č.	DNA	detekce PCR produktu	poznámky
1.	neg.kontrola	-	
2.	1000x řed.HL	+	
3.	100x řed.HL	+	
4.	10x řed.HL	+	*
5.	1 pg/μl	-	
6.	10 pg/μl	+	
7.	100 pg/μl	+	
8.	1 ng/μl	+	
9.	10 ng/μl	+	
10.	standard	+	

+...PCR produkt byl detekován -...PCR produkt nebyl detekován

* zřejmě uvíznutí HL v komůrce



Obr. 4.2: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů (250bp) amplifikovaných z různého množství purifikované DNA *Lactobacillus paracasei* sups. *paracasei* CCDM 212/06 a ředěného hrubého lyzátu buněk.

- V PCR se amplifikovala jak DNA v hrubém lyzátu buněk tak purifikovaná DNA. Nejmenší množství DNA amplifikované v PCR směsi a detekované na gelu je 10 pg. U 10x zředěného hrubého lyzátu je zřejmě uvíznutí viskózního vzorku v komůrce.

4.2 Stanovení citlivosti druhově specifické PCR - DNA *Streptococcus thermophilus* CCM 4757

4.2.1 Kultivace v tekutém médiu a na pevném agaru s ověřením čistoty buněk

Po 18 hodinách kultivace v tekutém M17 médiu s laktózou bakteriální kmen *S. thermophilus* CCM 4757 vytvářel mléčný zrnitý zákal (důkaz růstu buněk).

➤ Kmen rostl v zákalu.

Kultura *S. thermophilus* CCM 4757 narostlá v tekutém médiu M17 s laktózou byla naočkována křížovým roztěrem na plotny s utuhlým M17 agarem a po 24 hodinách kultivace při 37 °C byl vizuálně zkontrolován vzhled kolonií.

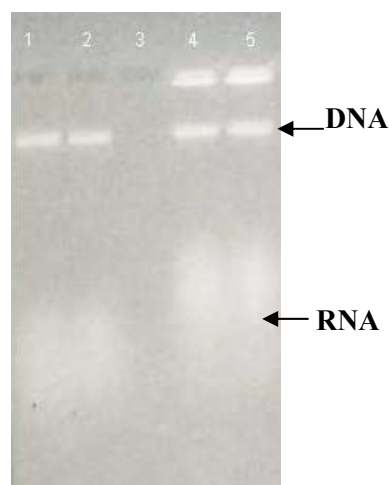
➤ Jednotlivé narostlé kolonie byly bílého lesklého vzhledu a stejné velikosti (z čehož lze předpokládat, že se pracuje s čistou kulturou).

4.2.2 Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk kmene *Streptococcus thermophilus* CCM 4757

Bakteriální DNA byla izolována z hrubých lyzátů buněk, přečištěna metodou fenolové extrakce a přesrážena 96 % ethanolem. Přítomnost izolované bakteriální DNA byla ověřena agarózovou gelovou elektroforézou na 0,8 % agarózovém gelu, která probíhala po dobu 1,5 hodiny při napětí 60 V (obrázek 4.3).

Běh č.	DNA	detekce	pozn.
1.	purif. DNA 1	+	
2.	purif. DNA 2	+	
3.	/	/	
4.	hrubý lyzát 1	+	
5.	hrubý lyzát 2	+	

+...bakteriální DNA byla detekována



Obr.4.3: Agarózová gelová elektroforéza purifikované DNA a DNA z hrubých lyzátů buněk kmene *Streptococcus thermophilus* CCM 4757.

➤ Lyze bakteriálního kmene *Streptococcus thermophilus* CCM 4757 proběhla úspěšně. U hrubých lyzátů došlo k uvíznutí viskózních vzorků v komůrkách. Byla izolována relativně intaktní DNA.

4.2.3 Druhově specifická PCR reakce s purifikovanou DNA *Streptococcus thermophilus* CCM 4757

Vzorky DNA č.1 a 2 byly vyizolovány ze stejného hrubého lyzátu. U vzorku 1 purifikované DNA byla spektrofotometricky stanovena koncentrace DNA, koncentrace se upravila na 10 ng/μl a dále desítkovým ředěním byl vzorek naředěn až na koncentraci 1 fg/μl. U vzorku č.2 purifikované DNA byl vzorek ředěn TE pufrem. Tento postup byl opakován 8x. Množství přidávaných primerů Strem 1 a Strem 2, též DNA matrice do PCR směsi činilo 1 μl. Gelová elektroforéza probíhala 2 hodiny při napětí 50 V na 1,2 % gelu (obrázek 4.4).

Řada 1

Běh č.	DNA	Detekce PCR produktu
1.	vzorek 1-neředěný	+
2.	vzorek 1-10 ng/μl	+
3.	vzorek 1-1 ng/μl	+
4.	vzorek 1-100 pg/μl	+
5.	vzorek 1-10 pg/μl	+
6.	vzorek 1-1 pg/μl	-
7.	vzorek 1-100 fg/μl	-
8.	vzorek 1-10 fg/μl	-
9.	vzorek 1-1 fg/μl	-
10.	standard	+
11.	NK	-

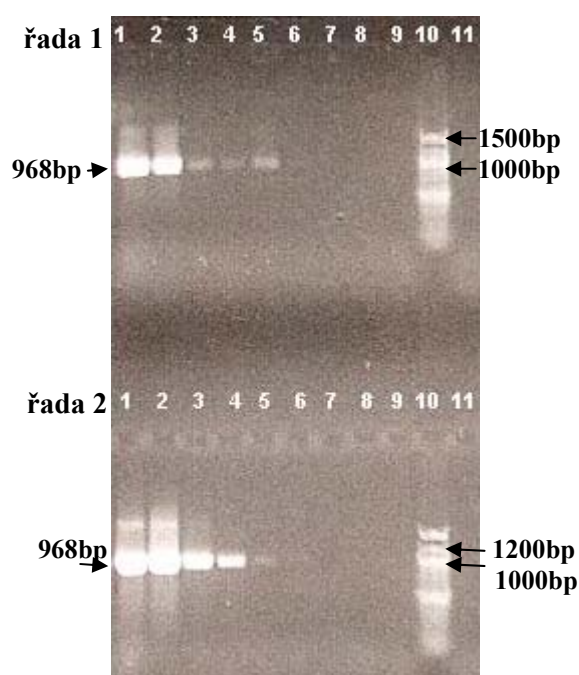
Řada 2

Běh č.	DNA	Detekce PCR produktu
1.	vzorek 2-neředěný	+
2.	10 x zředěná	+
3.	100 x zředěná	+
4.	10 ³ x zředěná	+
5.	10 ⁴ x zředěná	+
6.	10 ⁵ x zředěná	-
7.	10 ⁶ x zředěná	-
8.	10 ⁷ x zředěná	-
9.	10 ⁸ x zředěná	-
10.	standard	+
11.	NK	-

+...PCR produkt byl detekován

-...PCR produkt nebyl detekován

NK...negativní kontrola



Obr. 4.4: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů (968bp) vzorku č.1 v 1. řadě a vzorku č.2 ve 2. řadě specifických pro druh *Streptococcus thermophilus* CCM 4757.

- Citlivost PCR reakce s použitím 1 μl primerů pro druh *Streptococcus thermophilus* CCM 4757 byla stanovena na 10 pg.

4.2.4 Optimalizace PCR reakce pro kmen *Streptococcus thermophilus* CCM 4757

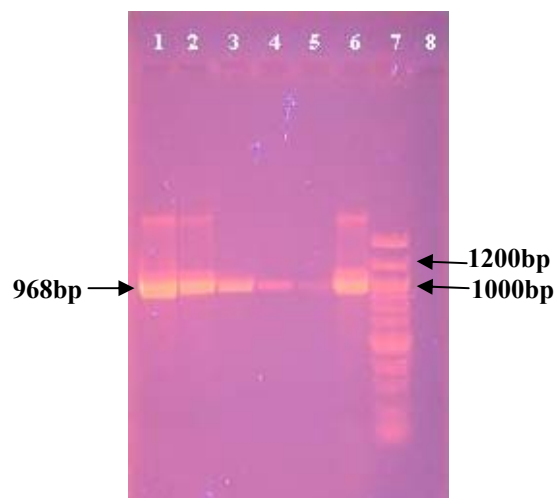
Množství použitých primerů Sterm 1 a Sterm 2 bylo 0,5 μ l a DNA matrice 1 μ l. Gelová elektroforéza probíhala 2 hodiny při 60 V na 1,2 % gelu (viz obrázek 4.5).

Běh č.	PCR produkt	detekce PCR produktu
1.	vzorek 1-10 ng/ μ l	+
2.	vzorek 1-1 ng/ μ l	+
3.	vzorek 1-100 pg/ μ l	+
4.	vzorek 1-10 pg/ μ l	+
5.	vzorek 1-1pg/ μ l	+
6.	PK	+
7.	standard	+
8.	NK	-

+...PCR produkt byl detekován

-...PCR produkt nebyl detekován

NK...negativní kontrola PK...negativní kontrola



Obr. 4.5: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů (968bp) kmene *Streptococcus thermophilus* CCM 4757.

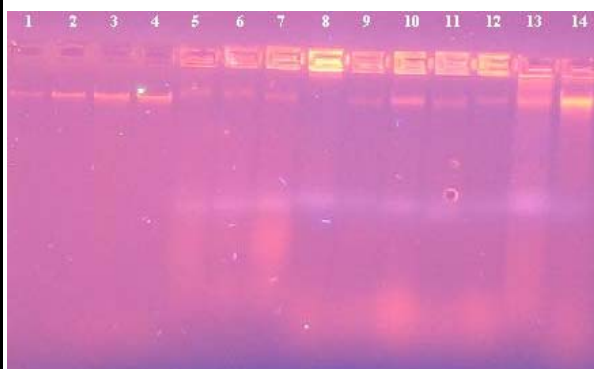
- Byla amplifikována různá množství DNA. S použitím 0,5 μ l primerů (10pmol/ μ l) byl detekován PCR produkt po amplifikaci 1 pg DNA.

4.3 Identifikace bakterií druhu *Streptococcus thermophilus* ve vybraných mléčných výrobcích pomocí PCR

4.3.1 Lyze buněk izolovaných z mléčných výrobků

U náhodně vybraných 10 různých mléčných výrobků o různém obsahu tuku zakoupených v prodejní síti (tabulka 3.2) byla provedena lyze buněk dle kapitoly 3.5.3 (s použitím 50 μ l 10 % SDS). Úspěšnost lyze buněk byla zkontrolována gelovou elektroforézou na 0,8 % gelu při napětí 50 V po dobu 2 hodin (obrázek 4.6).

Běh č.	HL buněk z výrobku	detekce DNA	Množství DNA(ng)
1.	70 ng	+	*
2.	140 ng	+	*
3.	280 ng	+	*
4.	350 ng	+	*
5.	vzorek I	+	70
6.	vzorek II	+	70
7.	vzorek III	+	70
8.	vzorek IV	+	70
9.	vzorek V	+	70
10.	vzorek VI	+	280
11.	vzorek VII	+	70
12.	vzorek VIII	+	70
13.	vzorek IX	+	350
14.	vzorek X	+	350



* hmotnostní standardy

HL = hrubý lyzát

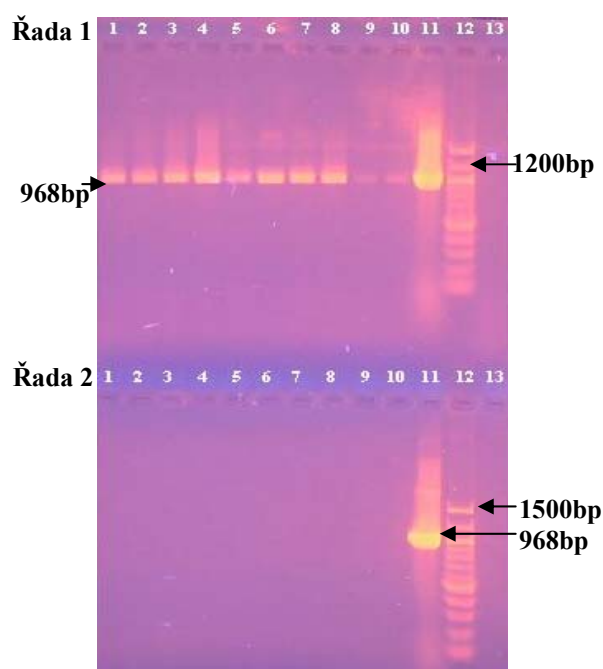
+...DNA byla detekována

Obr. 4.6: Agarózová gelová elektroforéza DNA z hrubých lyzátů buněk izolovaných z mléčných výrobků I-X.

- Ve všech vzorcích byla vizualizována různá malá množství DNA, která v převaze odpovídají koncentraci hmotnostního standardu 70 ng. U vzorků IX a X (keřirová mléka) došlo k izolaci většího množství DNA než 350 ng.

4.3.2 Izolace DNA z HL buněk z mléčných výrobků pomocí magnetických nosičů a PCR specifická pro druh *S. thermophilus*

Izolace DNA pomocí magnetických nosičů probíhala dle kapitoly 3.5.4. Při přípravě směsi pro izolaci DNA magnetickými nosiči byla výsledná koncentrace PEG 6000 8 % a výsledný objem činil 500 μ l (blíže v tabulce 3.3). Smíchání reakčních komponent směsi proběhlo dle tabulky 3.4., pořadí 2. S DNA v eluátech a supernatantech byla provedena PCR reakce dle programu SHER 30. Množství použitých primerů Sterm 1 a 2 bylo 1 μ l, množství DNA matrice 2 μ l. Detekce PCR produktu probíhala na 1,2 % gelu při napětí 60 V a po dobu 180 minut (viz obrázek 4.7).



Řada 1			Řada 2		
Běh č.	Eluovaná DNA	detekce PCR produktu	Běh č.	DNA v supernatantu	detekce PCR produktu
1.	I	+	1.	I	-
2.	II	+	2.	II	-
3.	III	+	3.	III	-
4.	IV	+	4.	IV	-
5.	V	+	5.	V	-
6.	VI	+	6.	VI	-
7.	VII	+	7.	VII	-
8.	VIII	+	8.	VIII	-
9.	IX	+	9.	IX	-
10.	X	+	10.	X	-
11.	PK	+	11.	PK	+
12.	standard	-	12.	standard	+
13.	NK	-	13.	NK	-

+/-...PCR produkt detekován/nedetekován; PK...pozitivní kontrola; NK...negativní kontrola

Obr. 4.7: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů (968bp) DNA izolované z eluátů a supernatantů z mléčných výrobků I-X magnetickým nosičem.

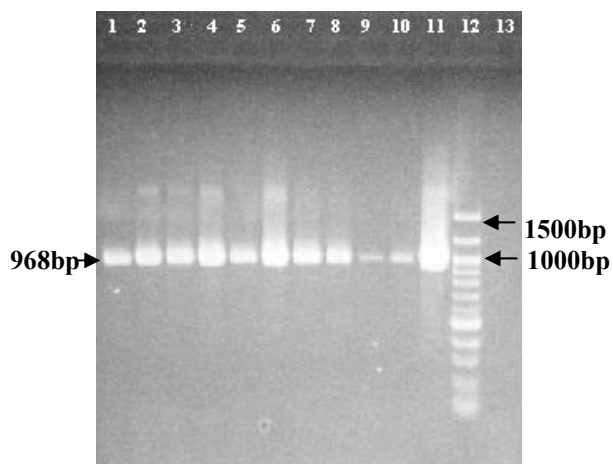
- Amplifikovala se DNA z eluátů všech 10 vzorků mléčných výrobků (specifický PCR produkt 968 bp). Naopak po amplifikaci DNA ze supernatantů nebyly detekovány PCR produktu.

4.3.2.1 Optimalizace PCR reakce s DNA izolovanou z mléčných výrobků I-X pomocí magnetického nosiče s použitím různých množství DNA matrice

Množství použitých primerů pro pozitivní kontrolu bylo sníženo na 0,5 μ l, pro DNA matici bylo použito také 0,5 μ l. U vzorků izolovaných z mléčných výrobků bylo smícháno po 1 μ l každého z primerů a DNA matrice byla přidávána nejprve v množství 1 μ l (viz obrázek 4.8),

poté 2 μ l a nakonec v množství 3 μ l (viz obrázek 4.9). Gelová elektroforéza probíhala 150 minut, při napětí 60 V na 1,2 % gelu.

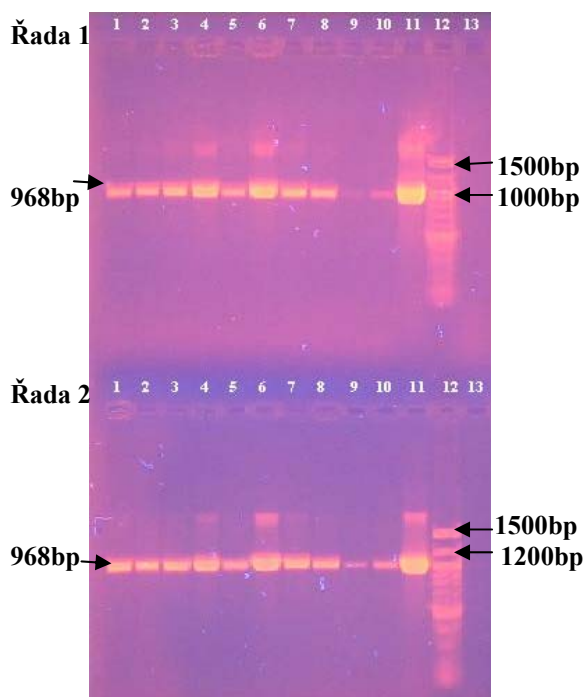
Běh č.	DNA po SPRI vzorku	detekce PCR produktu
1.	I	+
2.	II	+
3.	III	+
4.	IV	+
5.	V	+
6.	VI	+
7.	VII	+
8.	VIII	+
9.	IX	+
10.	X	+
11.	PK	+
12.	standard	+
13.	NK	-



+...PCR produkt detekován
 -...PCR produkt nedetekován
 PK...pozitivní kontrola
 NK...negativní kontrola

Obr. 4.8: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů s použitím 1 μ l DNA matrice z 10 mléčných výrobků.

Řada 1 - 2 μ l DNA matrice		
Běh č.	DNA po SPRI vzorku	detekce PCR produktu
1.	I	+
2.	II	+
3.	III	+
4.	IV	+
5.	V	+
6.	VI	+
7.	VII	+
8.	VIII	+
9.	IX	+
10.	X	+
11.	PK	+
12.	standard	+
13.	NK	-
Řada 2 - 3 μ l DNA matrice		
1.	I	+
2.	II	+
3.	III	+
4.	IV	+
5.	V	+
6.	VI	+
7.	VII	+
8.	VIII	+
9.	IX	+
10.	X	+
11.	PK	+
12.	standard	+
13.	NK	-



+...PCR produkt detekován
 -...PCR produkt nedetekován
 PK...pozitivní kontrola
 NK...negativní kontrola

Obr.4.9: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů s použitím 2 μ l a 3 μ l DNA matrice z 10 mléčných výrobků.

- Amplifikovala se DNA (v množství 1, 2 a 3 μ l) po SPRI a byly detekovány specifické amplikony různé intenzity (velikosti 968 bp) u všech deseti analyzovaných vzorků mléčných výrobků.

4.4 Identifikace bakterií druhu *S. thermophilus* z lyofilizátů buněk

4.4.1 Kontrola čistoty bakteriálních kultur kmenů *Streptococcus thermophilus* ze Sbírký mléčných mikroorganismů (CCDM)

Lyofilizáty buněk byly kultivovány dle postupu v kapitole 3.5.1.3. Ověření, zda-li je bakteriální kultura čistá, proběhlo metodou křížového roztěru na Petriho miskách, kdy v tabulce 4.2 jsou uvedeny jednotlivé popisy vzhledu bakteriálních kolonií.

Tab. 4.2: Křížový roztěr bakteriálních kultur kmenů *Streptococcus thermophilus* ze Sbírký mléčných mikroorganismů (CCDM).

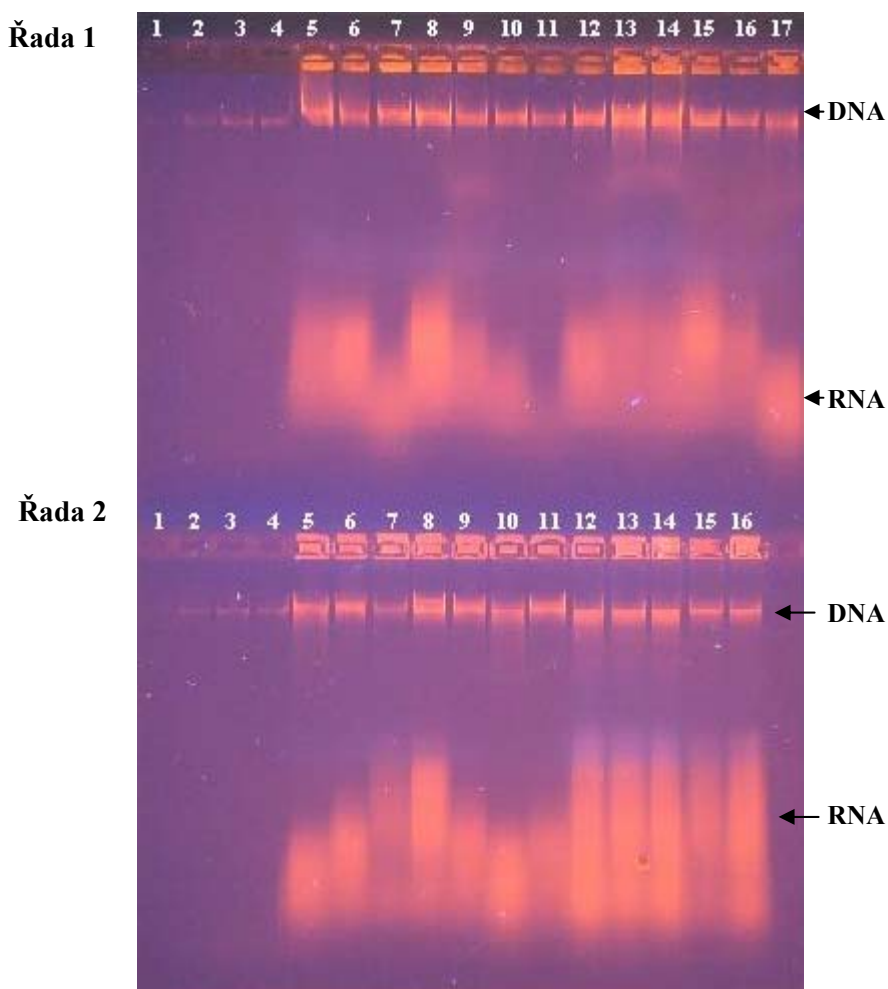
Ozn. vzorku	Kontrola vzhledu jednotlivých kolonií	Opak. křížový roztěr
1	Lesklé bílé kolonie; velké + malé	ANO
2	Lesklé bílé kolonie; velké	
3	Lesklé bílé kolonie; velké + malé	ANO
4	Lesklé bílé kolonie; velké	
5	Lesklé bílé kolonie; velké + malé; šedé malé kolonie	ANO
6	Lesklé bílé kolonie; velké	
7	Lesklé bílé kolonie; velké	
8	Lesklé bílé kolonie; velké	
9	Lesklé bílé kolonie; velké + malé	ANO
10	Lesklé bílé kolonie; velké + malé	ANO
11	Lesklé bílé kolonie; velké + malé	ANO
12	Lesklé bílé kolonie; velké; šedé malé kolonie	ANO
13	Lesklé bílé kolonie; velké + malé	ANO
14	Lesklé bílé kolonie; velké; žluté kolonie - infekce	ANO
15	Lesklé bílé kolonie; velké + malé	ANO
16	Lesklé bílé kolonie; velké; šedé malé kolonie	ANO
17	Lesklé bílé kolonie; velké	
18	Lesklé bílé kolonie; velké + malé	ANO
19	Lesklé bílé kolonie; velké + malé	ANO
20	Lesklé bílé kolonie; velké + malé	ANO
21	Lesklé bílé kolonie; velké + malé	ANO
22	Lesklé bílé kolonie; velké + malé; šedé malé kolonie	ANO
23	Lesklé bílé kolonie; velké + malé	ANO
24	Lesklé bílé kolonie; velké + malé	ANO
25	Lesklé bílé kolonie; velké + malé	ANO

- Většina z narostlých kolonií byla lesklá a bílé barvy. Kolonie narostly jak velké tak i malé (pravděpodobně jedná o směsné kultury). Při opakovaném křížovém roztěru, kdy byla na Petriho misku očkovaná vždy jedna ze spekulativních kolonií, narostly kolonie stejné velikosti i barvy. Bylo potvrzeno, že se jedná o směsné bakteriální kultury.

4.4.2 Identifikace bakterií druhu *S. thermophilus* z lyofilizátů DNA izolované magnetickými nosiči z 25 lyofilizátů

4.4.2.1 Lyze buněk izolovaných z lyofilizátů

Izolace proběhla dle kapitoly 3.5.2.2 a lyofilizáty byly rozsuspendovány ve 4 ml tekutého M17 média. Byl odebrán 1 ml kultury a provedena lyze buněk. Na obrázku 4.10 je znázorněna gelová elektroforéza DNA z hrubých lyzátů buněk, která probíhala 120 minut, při napětí 60 V na 0,8 % gelu.



Řada 1			Řada 2		
Běh č.	HL	Množství DNA (ng)	Běh č.	HL	Množství DNA (ng)
1.	35 ng *	-	1.	35 ng *	-
2.	140 ng *	+	2.	140 ng *	+
3.	280 ng *	+	3.	280 ng *	+
4.	350 ng *	+	4.	350 ng *	+
5.	HL 1	+	5.	HL 14	+
6.	HL 2	+	6.	HL 15	+
7.	HL 3	+	7.	HL 16	+
8.	HL 4	+	8.	HL 17	+
9.	HL 5	+	9.	HL 18	+
10.	HL 6	+	10.	HL 19	+
11.	HL 7	+	11.	HL 20	+
12.	HL 8	+	12.	HL 21	+
13.	HL 9	+	13.	HL 22	+
14.	HL 10	+	14.	HL 23	+
15.	HL 11	+	15.	HL 24	+
16.	HL 12	+	16.	HL 25	+
17.	HL 13	+			

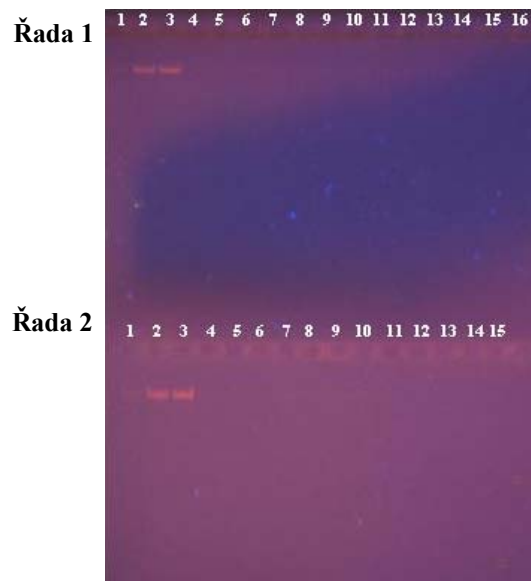
HL = hrubý lyzát +/-...DNA detekována/nedetekována *hmotnostní standard

Obr. 4.10: Agarózová gelová elektroforéza DNA z hrubých lyzátů připravených z 25 lyofilizátů kmenů *Streptococcus thermophilus*.

- Hrubé lyzáty 25 lyofilizátů buněk ze Sbírký mléčných mikroorganismů (CCDM, Tábor) se podařilo zlyzovat. U všech 25 vzorků bylo množství DNA větší než 35 ng/μl. DNA nebyla degradovaná. Také byla silně detekována RNA.

4.4.2.2 Separace DNA z 25 lyofilizátů pomocí magnetických nosičů

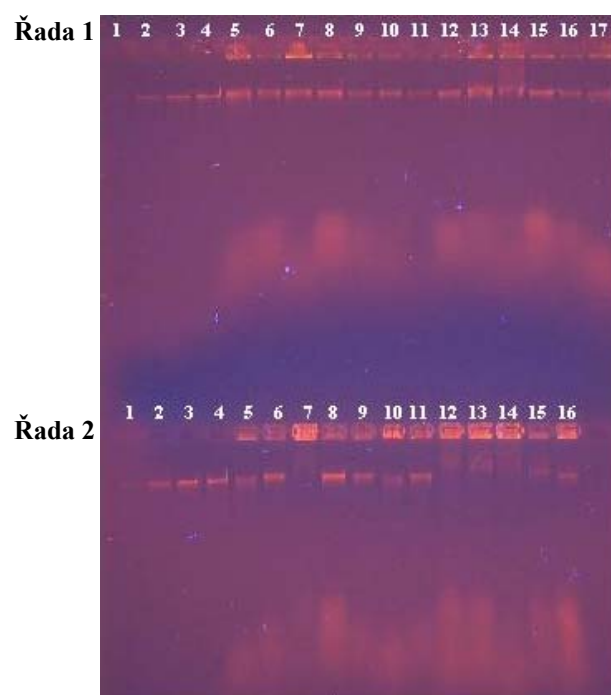
Celkový objem separační směsi činil 500 μl a komponenty byly smíchány dle pořadí 2 v tabulce 3.4. Gelová elektroforéza probíhala na 0,8 % gelu, při 60 V a po dobu 120 minut. Na gel bylo nanášeno 10 μl DNA (jak v případě eluátu tak i v případě supernatantu), 5 μl TE pufru a 3 μl STOP pufru. Hmotnostní standardy pro eluáty byly na gel nanášeny v množství 35, 280 a 350 ng. Výsledky detekce DNA v fluátech jsou uvedeny na obrázku 4.11 U supernatantů byla detekce intenzivnější (viz obrázek 4.12).



Řada 1			Řada 2		
Běh. č	eluát	Detekce DNA	Běh.č.	eluát	Detekce DNA
1.	35 ng *	-	1.	35 ng *	-
2.	280 ng *	+	2.	280 ng *	+
3.	350 ng *	+	3.	350 ng *	+
4.	1	-	4.	14	-
5.	2	-	5.	15	-
6.	3	-	6.	16	-
7.	4	-	7.	17	-
8.	5	-	8.	18	-
9.	6	-	9.	19	-
10.	7	-	10.	20	-
11.	8	-	11.	21	-
12.	9	-	12.	22	-
13.	10	-	13.	23	-
14.	11	-	14.	24	-
15.	12	-	15.	25	-
16.	13	-			

* hm. standardy +/-...DNA detekována/nedetkována

Obr. 4.11: Agarózová gelová elektroforéza DNA po izolaci magnetickými nosiči z 25 lyofilizátů.



Řada 1			Řada 2		
Běh č.	supernatant	Detekce DNA	Běh č.	supernatant	Detekce DNA
1.	35 ng *	-	1.	35 ng *	-
2.	140 ng *	+	2.	140 ng *	+
3.	280 ng *	+	3.	280 ng *	+
4.	350 ng *	+	4.	350 ng *	+
5.	1	+	5.	14	+
6.	2	+	6.	15	+
7.	3	+	7.	16	+
8.	4	+	8.	17	+
9.	5	+	9.	18	+
10.	6	+	10.	19	+
11.	7	+	11.	20	+
12.	8	+	12.	21	+
13.	9	+	13.	22	+
14.	10	+	14.	23	+
15.	11	+	15.	24	+
16.	12	+	16.	25	+
17.	13	+			

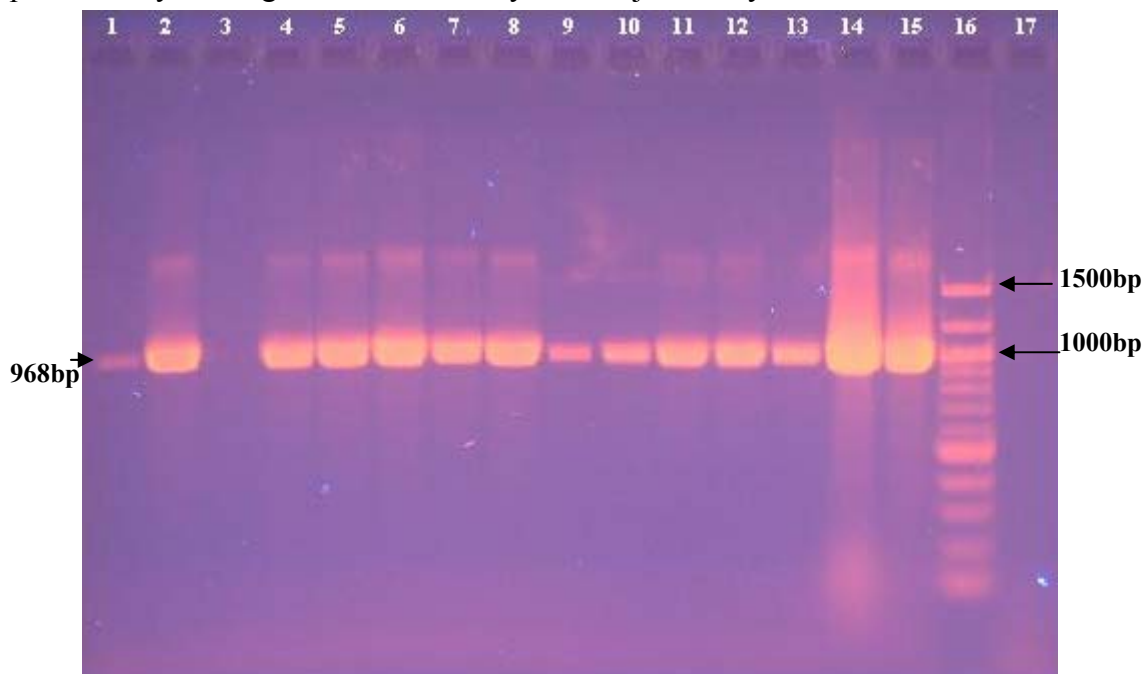
* hmotnostní standard +/-...DNA/hmot. standard detekován/nedetekován

Obr.4.12: Agarózová gelová elektroforéza DNA supernatantů po izolaci magnetickými nosiči z 25 lyofilizátů.

- U všech vzorků supernatantů byla detekována DNA o různých intenzitách. Naopak u žádného ze vzorků eluátů se nebyla detekována DNA.

4.4.2.3 PCR reakce s DNA 25 lyofilizátů izolovanou magnetickým nosičem.

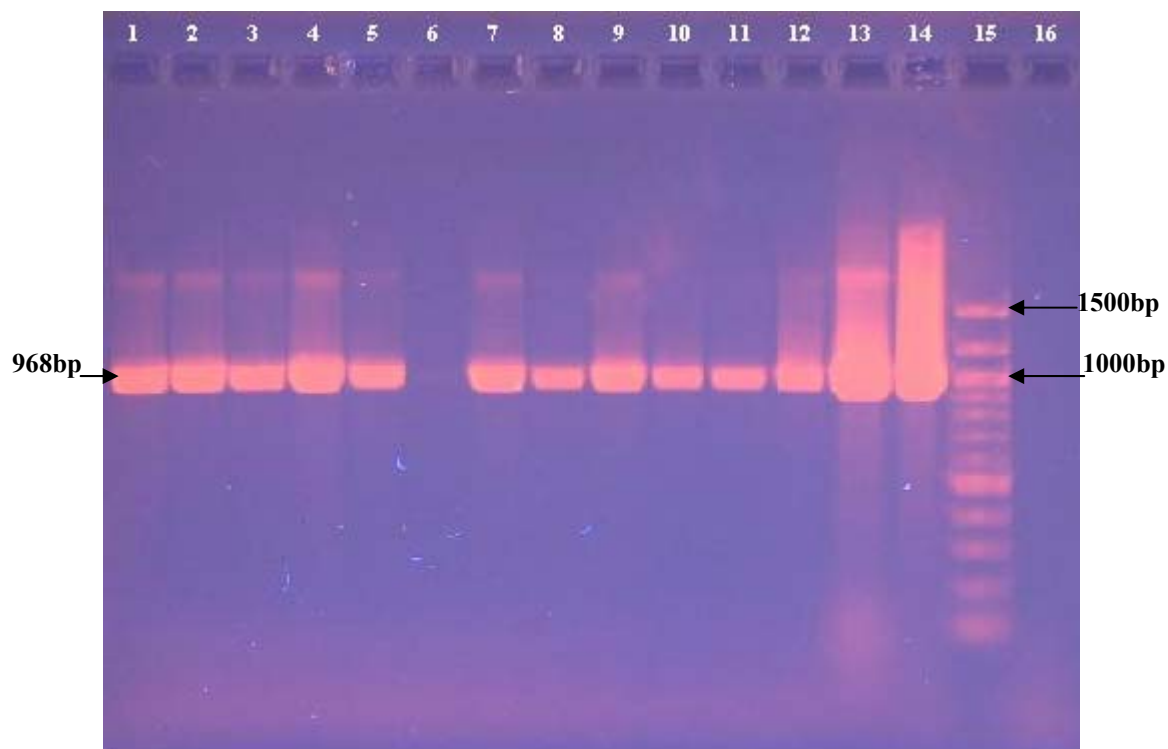
Pro PCR směs byly pipetovány 2 μ l DNA matrice z eluátů a po 1 μ l primerů Sterm 1 a 2. Pro pozitivní kontrolu i pozitivní kontrolu 10x ředěnou bylo použito 0,5 μ l DNA matrice. PCR reakce proběhla dle programu SHER 30 a detekce na 1,2 % gelu probíhala 150 minut při 60 V. Výsledek gelové elektroforézy zobrazují obrázky 4.13 a 4.14.



Běh č.	DNA po SPRI vzorku	Detekce PCR produktu
1.	1	+
2.	2	+
3.	3	-
4.	4	+
5.	5	+
6.	6	+
7.	7	+
8.	8	+
9.	9	+
10.	10	+
11.	11	+
12.	12	+
13.	13	+
14.	PK	+
15.	PK 10 x ředěná	+
16.	standard	+
17.	NK	-

PK = pozitivní kontrola NK = negativní kontrola
+...PCR produkt byl detekován -...PCR produkt nebyl detekován

Obr. 4.13: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů DNA z eluátů vzorků č.1-13 kmenů lyofilizátů izolovaných metodou magnetických nosičů.



Běh č.	DNA po SPRI vzorku	Detekce PCR produktu
1.	14	+
2.	15	+
3.	16	+
4.	17	+
5.	18	+
6.	19	-
7.	20	+
8.	21	+
9.	22	+
10.	23	+
11.	24	+
12.	25	+
13.	PK	+
14.	PK 10 x ředěná	+
15.	standard	+
16.	NK	-

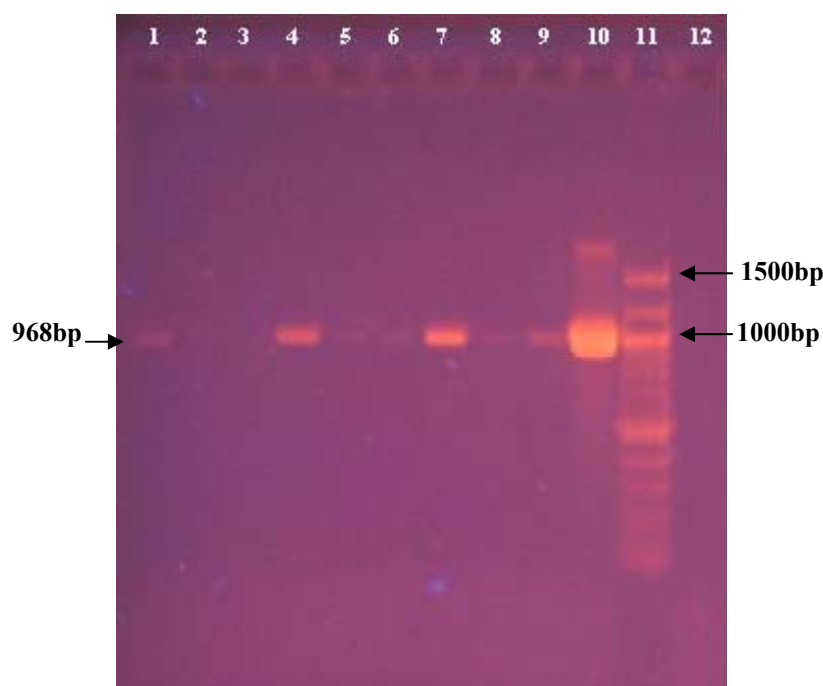
PK = pozitivní kontrola NK = negativní kontrola
 +...PCR produkt byl detekován -...PCR produkt nebyl detekován

Obr. 4.14: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů DNA z eluátů vzorků č.14-25 kmenů lyofilizátů izolovaných metodou magnetických nosičů.

- Amplifikace DNA z eluátů (po SPRI) proběhla úspěšně u všech vzorků kromě vzorku 3 a 19. Amplikon odpovídal velikosti 968bp-specifický pro druh *S. thermophilus*. PCR produkty u vzorků 1, 9, 10 a 13 byly detekovány nižší intenzitou.

4.4.2.4 Opakovaná PCR reakce se vzorky č. 1, 3 a 19 kmenů lyofilizátů s různým množstvím DNA matrice

U vzorků 1, 3 a 19 bylo použito jako DNA matrice vzestupné množství 1 μ l, 2 μ l a 5 μ l. Amplifikace proběhla dle programu SHER 30 a gelová elektroforéza probíhala při 60 V, 150 minut na 1,2 % gelu. Na obrázku 4.15 je zobrazen výsledek gelové elektroforézy PCR produktů pro různá množství DNA matrice a na obrázku 4.16 je výsledek pouze s použitím 5 μ l DNA matrice.



Běh. č	Vzorek DNA matrice (μ l)	Detekce PCR produktu
1.	1 – 1 μ l	+
2.	3 – 1 μ l	-
3.	19 – 1 μ l	-
4.	1 – 2 μ l	+
5.	3 – 2 μ l	+
6.	19 – 2 μ l	+
7.	1 – 5 μ l	+
8.	3 – 5 μ l	+
9.	19 – 5 μ l	+
10.	PK 10x ředěná	+
11.	Standard	+
12.	NK	-

PK...pozitivní kontrola NK...negativní kontrola

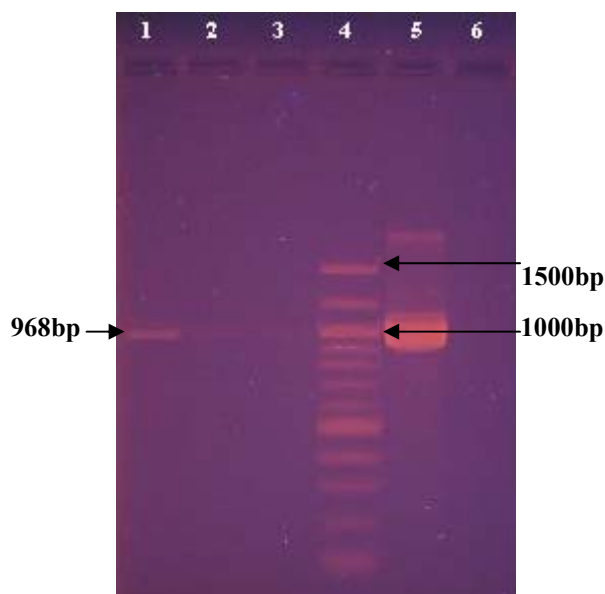
+...PCR produkt detekován

-...PCR produkt nedetekován

Obr. 4.15: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů DNA z eluátů kmenů lyofilizátů č. 1, 3 a 19 s použitím 1, 2 a 5 μ l DNA matrice.

Běh. č	Vzorek DNA matrice (μ l)	Detekce PCR produktu
1.	1 – 5 μ l	+
2.	3 – 5 μ l	+
3.	19 – 5 μ l	+
4.	PK 10x ředěná	+
5.	Standard	+
6.	NK	-

PK...pozitivní kontrola
 NK...negativní kontrola
 +...PCR produkt detekován
 -...PCR produkt nedetekována



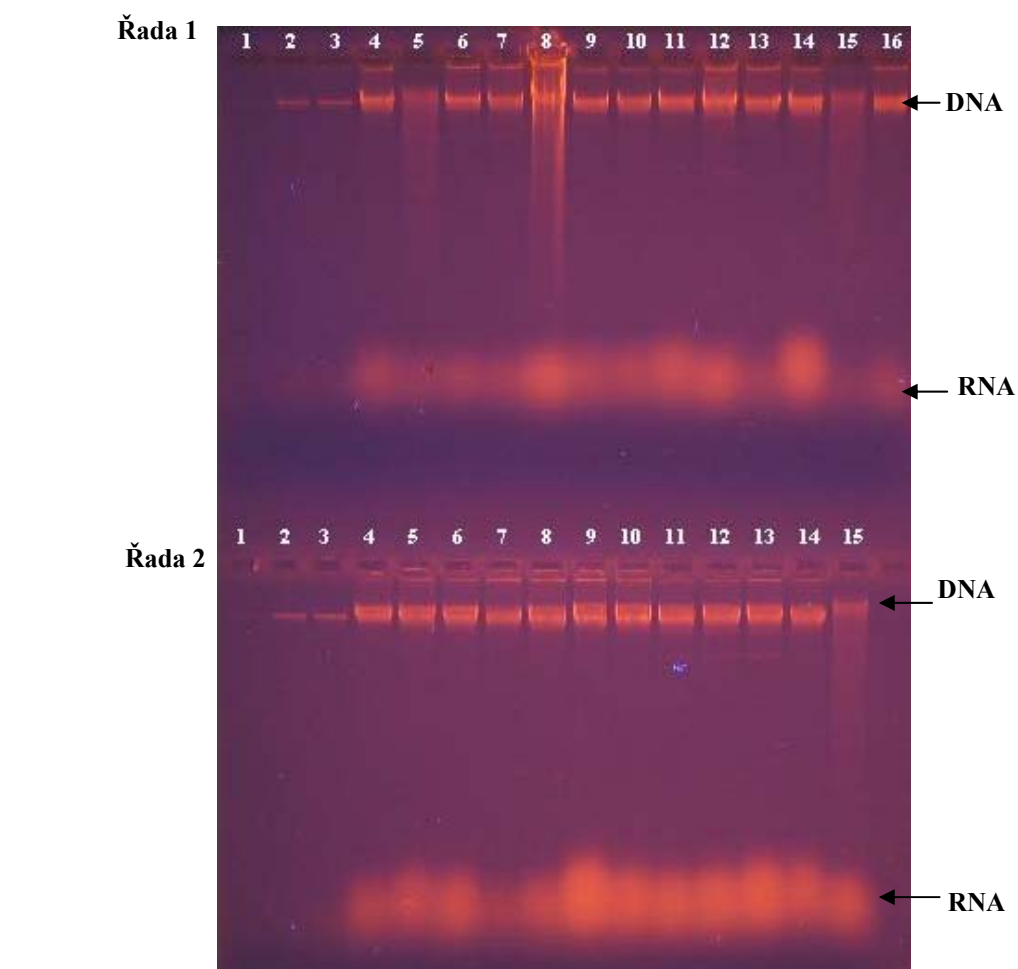
Obr. 4.16: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů DNA z eluátů kmenů lyofilizátů č. 1, 3 a 19 s použitím 5 μ l DNA matrice.

- Všechny vzorky se amplifikovaly s různou intenzitou, kdy u vzorků 9 a 19 je intenzita PCR produktů detekce velice slabá i přes použití 5 μ l DNA matrice. Amplifikovala se různá množství DNA. PCR produkt u vzorku 1 byl nejintenzivnější. Při použití 5 μ l DNA matrice se amplifikovaly amplikony v největším množství.

4.4.3 Kontrola identifikace bakterií druhu *Streptococcus thermophilus* z lyofilizátů po amplifikaci DNA izolované fenolovou extrakcí

4.4.3.1 Izolace DNA z 25 lyofilizátů fenolovou extrakcí

Purifikovaná DNA byla připravena dle kapitoly 3.5.2. Gelová elektroforéza probíhala probíhala na 0,8 % gelu, při 60 V po dobu 120 minut. Na obrázku 4.17 je výsledek gelové elektroforézy.



Řada 1			Řada 2		
Běh č.	Purif. DNA	detekce	Běh č.	Purif. DNA	detekce
1.	35 ng *	-	1.	35 ng *	-
2.	280 ng *	+	2.	280 ng *	+
3.	350 ng *	+	3.	350 ng *	+
4.	DNA 1	+	4.	DNA 14	+
5.	DNA 2	+	5.	DNA 15	+
6.	DNA 3	+	6.	DNA 16	+
7.	DNA 4	+	7.	DNA 17	+
8.	DNA 5	+	8.	DNA 18	+
9.	DNA 6	+	9.	DNA 19	+
10.	DNA 7	+	10.	DNA 20	+
11.	DNA 8	+	11.	DNA 21	+
12.	DNA 9	+	12.	DNA 22	+
13.	DNA 10	+	13.	DNA 23	+
14.	DNA 11	+	14.	DNA 24	+
15.	DNA 12	+	15.	DNA 25	+
16.	DNA 13	+			

+/-

...purif. DNA detekována/nedetkována * hmotnostní standard

Obr. 4.17: Agarózová gelová elektroforéza purifikované DNA kmenů *Streptococcus thermophilus* ze Sbírký mléčných mikroorganismů.

- Ze vzorků se podařilo izolovat DNA o vyšší množství než 350 ng. Též byla u každého vzorku detekována RNA. DNA je relativně intaktní s výjimkou vzorku č. 5, kde je částečně degradovaná.

4.4.4 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty purifikované DNA z lyofilizátů.

Spektrofotometrické stanovení probíhalo dle kapitoly 3.5.6. Naměřené hodnoty absorbancí při různých vlnových délkách, vypočítané koncentrace DNA jsou uvedeny v tabulce 4.3.

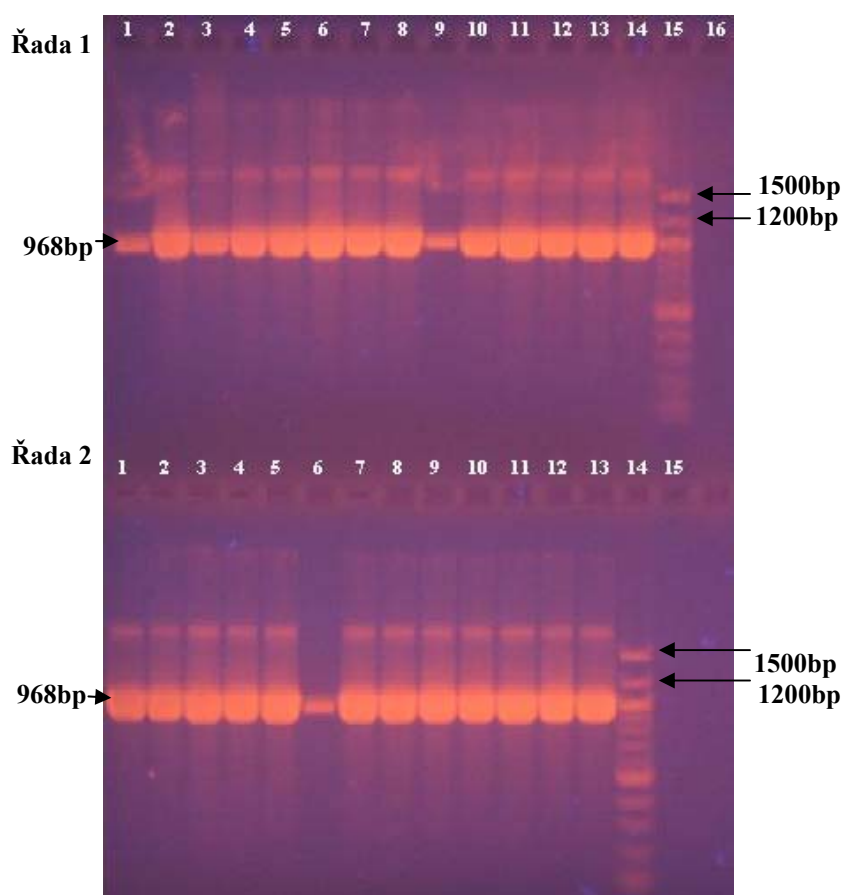
Tab. 4.3: Naměřené hodnoty absorbancí a stanovení přibližné koncentrace DNA.

č. vzorku	A _{260 nm}	konc. DNA (ng/μl)
1	0,708	35,40
2	0,740	37,00
3	0,635	31,75
4	0,745	37,25
5	0,886	44,30
6	0,762	38,10
7	0,928	46,40
8	0,530	26,50
9	0,796	39,80
10	0,851	42,55
11	0,839	41,95
12	0,991	49,55
13	0,928	46,40
14	0,870	43,50
15	0,807	40,35
16	0,793	39,65
17	0,721	36,05
18	0,670	33,50
19	0,845	42,25
20	0,815	40,75
21	0,721	36,05
22	0,772	38,60
23	0,728	36,40
24	0,790	39,50
25	0,812	40,60

- U všech vzorků byla stanovena koncentrace DNA vyšší než je 10 ng/μl.

4.4.4.1 PCR reakce s purifikovanou DNA izolovanou z lyofilizátů

Vzorky purifikované DNA izolované z lyofilizátů byly naředěny na koncentraci 10 ng/μl. Gelová elektroforéza probíhala při napětí 50 V po dobu 150 minut na 1,2 % gelu (viz obrázek 4.18).



Řada 1			Řada 2		
Běh. č	DNA	Detekce PCR produktu	Běh.č.	DNA	Detekce PCR produktu
1.	purif. DNA 1	+	1.	purif. DNA 14	+
2.	purif. DNA 2	+	2.	purif. DNA 15	+
3.	purif. DNA 3	+	3.	purif. DNA 16	+
4.	purif. DNA 4	+	4.	purif. DNA 17	+
5.	purif. DNA 5	+	5.	purif. DNA 18	+
6.	purif. DNA 6	+	6.	purif. DNA 19	+
7.	purif. DNA 7	+	7.	purif. DNA 20	+
8.	purif. DNA 8	+	8.	purif. DNA 21	+
9.	purif. DNA 9	+	9.	purif. DNA 22	+
10.	purif. DNA 10	+	10.	purif. DNA 23	+
11.	purif. DNA 11	+	11.	purif. DNA 24	+
12.	purif. DNA 12	+	12.	purif. DNA 25	+
13.	purif. DNA 13	+	13.	PK 10x řed.	+
14.	PK 10x řed.	+	14.	standard	+
15.	standard	+	15.	NK	-
16.	NK	-			

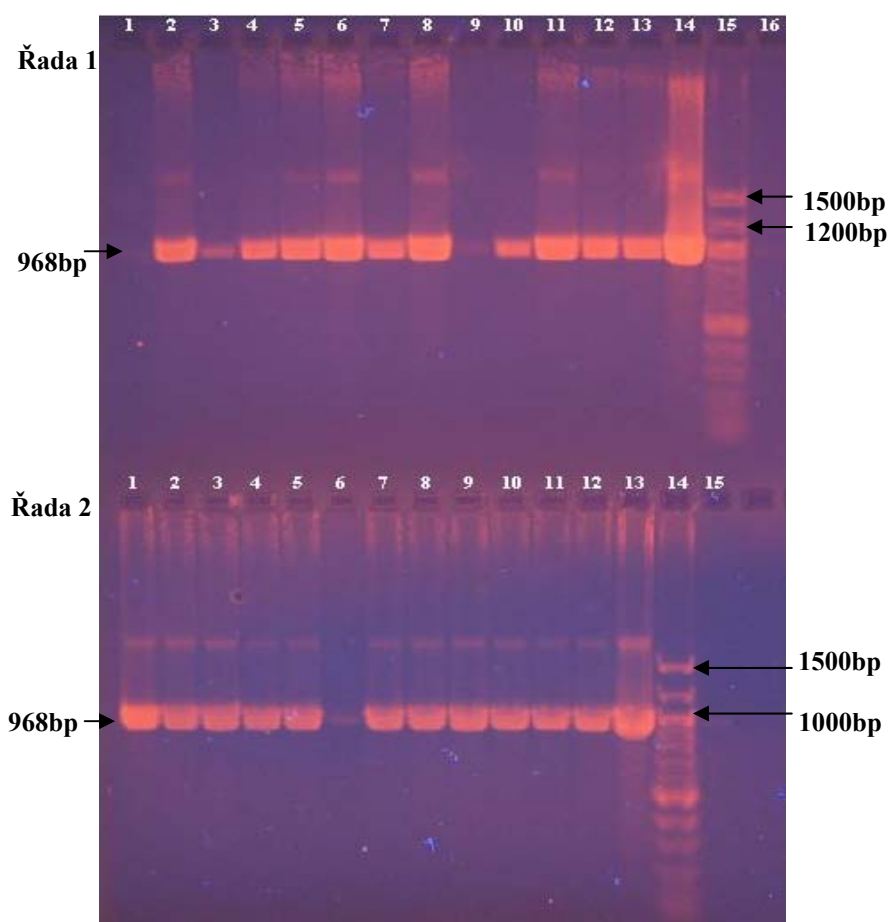
PK...pozitivní kotrola NK...negativní kotrola +/-...PCR produkt detekován/nedetekován

Obr. 4.18: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů purifikované DNA 25 kmenů z lyofilizátů.

- U všech vzorků se amplifikoval intenzivní PCR produkt. U vzorků 1, 3, 9 a 19 je intenzita PCR produktu množství výrazněji menší.

4.4.4.2 PCR reakce se 100x vyředěnou purifikovanou DNA izolovanou z 25 lyofilizátů

Purifikovaná DNA byla z počáteční koncentrace 10 ng/μl vyředěna 100x. Gelová elektroforéza probíhala na 1,2 % gelu při napětí 50 V po dobu 180minut (viz obrázek 4.19).



Řada 1			Řada 2		
Běh. č	Purif. DNA	Detekce PCR produktu	Běh.č.	Purif. DNA	Detekce PCR produktu
1.	1*	+	1.	14*	+
2.	2*	+	2.	15*	+
3.	3*	+	3.	16*	+
4.	4*	+	4.	17*	+
5.	5*	+	5.	18*	+
6.	6*	+	6.	19*	+
7.	7*	+	7.	20*	+
8.	8*	+	8.	21*	+
9.	9*	+	9.	22*	+
10.	10*	+	10.	23*	+
11.	11*	+	11.	24*	+
12.	12*	+	12.	25*	+
13.	13*	+	13.	PK 10x řed.	+
14.	PK 10x řed.	+	14.	standard	+
15.	standard	+	15.	NK	-
16.	NK	-			

PK...pozitivní kotrola

NK...negativní kontrola

+...PCR produkt detekován

-...PCR produkt nedetekován

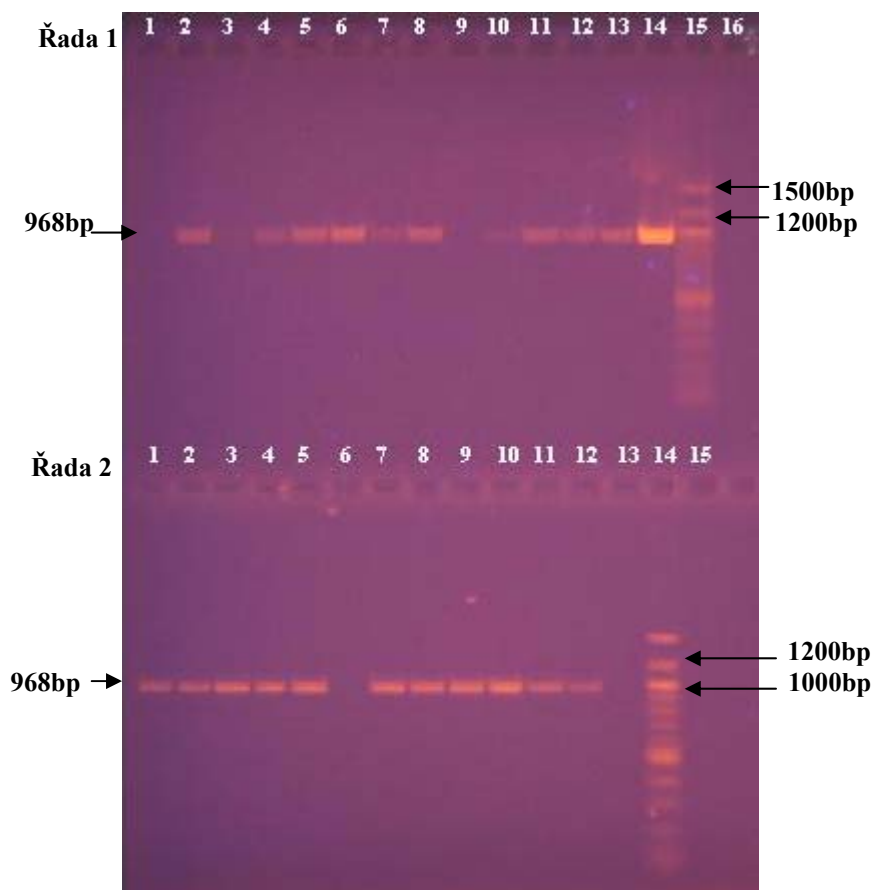
*vzorky 100x ředěny

Obr. 4.19: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů 100x vyředěné purifikované DNA 25 kmenů lyofilizátů.

- Všechny vzorky 100x vyředěné purifikované DNA se amplifikovaly s výjimkou vzorků 1, 3, 9 a 19, u nichž nebyly PCR produkty detekovány téměř vůbec nebo intenzita byla slabá.

4.4.4.3 Agarózová gelová elektroforéza 5 μ l PCR produktů

Objem 25 μ l PCR směsi byl smíchán s 5 μ l STOP pufru, ale na gel byly nanášeny pouze 5 μ l této PCR směsi. Gelová elektroforéza probíhala na 1,2 % gelu při napětí 50 V po dobu 3 hodin (viz obrázek 4.20).



Řada 1			Řada 2		
Běh. č.	DNA	Detekce PCR produktu	Běh.č.	DNA	Detekce PCR produktu
1.	purif. DNA 1*	-	1.	purif. DNA 14*	+
2.	purif. DNA 2*	+	2.	purif. DNA 15*	+
3.	purif. DNA 3*	-	3.	purif. DNA 16*	+
4.	purif. DNA 4*	+	4.	purif. DNA 17*	+
5.	purif. DNA 5*	+	5.	purif. DNA 18*	+
6.	purif. DNA 6*	+	6.	purif. DNA 19*	-
7.	purif. DNA 7*	+	7.	purif. DNA 20*	+
8.	purif. DNA 8*	+	8.	purif. DNA 21*	+
9.	purif. DNA 9*	-	9.	purif. DNA 22*	+
10.	purif. DNA 10*	+	10.	purif. DNA 23*	+
11.	purif. DNA 11*	+	11.	purif. DNA 24*	+
12.	purif. DNA 12*	+	12.	purif. DNA 25*	+
13.	purif. DNA 13*	+	13.	PK 10x řed.**	-
14.	PK 10x řed.	+	14.	standard	+
15.	standard	+	15.	NK	-
16.	NK	-			

PK...pozitivní kontrola NK...negativní kontrola +/-...PCR produkt detekován/nedetekován
 *vzorky 100x ředěny a na gel byly nanášeny 5 μ l PCR směsi **zřejmě chyba při přípravě PCR směsi

Obr. 4.20: Agarózová gelová elektroforéza 5 μ l PCR produktů

- U všech vzorků došlo k vizualizaci PCR produktu s výjimkou vzorků 1, 3, 9 a 19. Intenzita detekce PCR produktu byla výrazně nižší při použití 5 µl PCR směsi při nanášení na gel oproti nanášení 25 µl.

4.4.4.4 PCR reakce s přečištěnou purifikovanou DNA izolovanou z lyofilizátů č.1, 3, 9 a 19.

Již purifikované vzorky DNA 1, 3, 9 a 19 byly ještě jednou přečištěny fenolovou extrakcí a přesráženy ethanolem a dále byly použity do PCR jako DNA matrice. Gelová elektroforéza probíhala na 1,2 % gelu při napětí 60 V a po dobu 2,5 hodiny (viz obrázek 4.21).

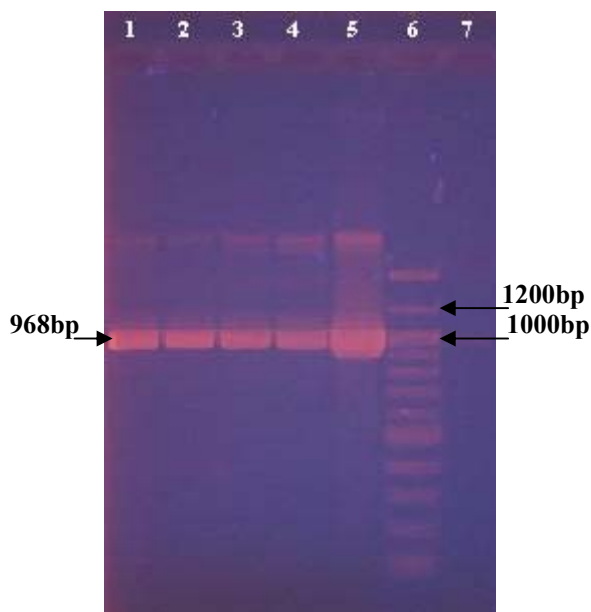
Běh. č	DNA matrice	Detekce PCR produktu
1.	Přeč. vzorek 1	+
2.	Přeč. vzorek 3	+
3.	Přeč. vzorek 9	+
4.	Přeč. vzorek 19	+
5.	PK 10x ředěná	+
6.	Standard	+
7.	NK	-

PK...pozitivní kontrola

NK...negativní kontrola

+...PCR produkt detekován

-...PCR produkt nedetekován



Obr. 4.21: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů přečištěné purifikované DNA vzorků 1, 3, 9 a 19 z lyofilizátů.

- Všechny vzorky byly úspěšně amplifikovány s přibližně stejnou intenzitou.

4.4.4.5 PCR reakce s přečištěnou purifikovanou DNA izolovanou z lyofilizátů č. 1, 3, 9 a 19 s použitím univerzálních primerů

Pro PCR reakci byly použity pouze vzorky DNA 1, 3, 9 a 19 (pravděpodobně směsi). Tyto vzorky byly ještě jednou přečištěny fenolovou extrakcí a přesráženy ethanolem. Použité primery pro tuto reakci byly Db 74 a RW 01 a program UNIV30. Touto reakcí byl amplifikován PCR produkt o velikosti 370bp. Gelová elektroforéza probíhala na 1,8 % gelu při napětí 60 V po dobu 2,5 hodiny (viz obrázek 4.22).

Běh. č	DNA matrice	Detekce PCR produktu
1.	Vzorek 1 *	+
2.	Vzorek 3 *	+
3.	Vzorek 9 *	+
4.	Vzorek 19 *	+
5.	PK 10x ředěná	+
6.	Standard	+
7.	NK	-

PK...pozitivní kontrola

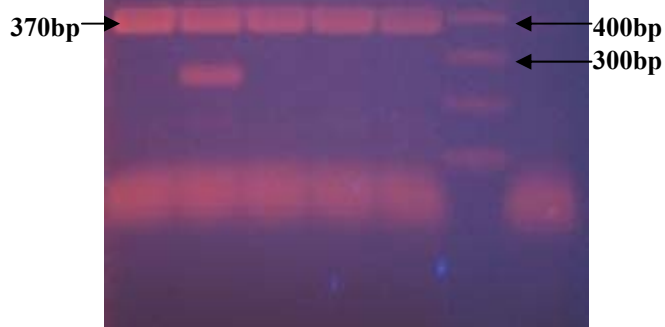
NK...negativní kontrola

+...PCR produkt detekován

-...PCR produkt nedetekován

*přečištěná purifikovaná DNA

370bp

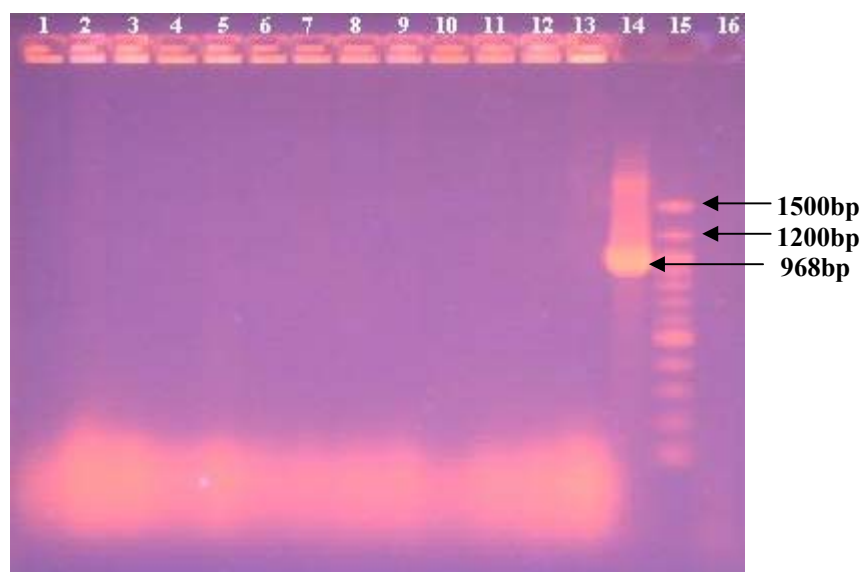


Obr. 4.22: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů přečištěné purifikované DNA z lyofilizátů vzorků 1, 3, 9 a 19 s použitím univerzálních primerů.

- U všech vzorků přečištěné purifikované DNA se amplifikovaly PCR produkty o velikosti 370bp o různých intenzitách. Detekovány byly též nespecifické produkty.

4.5 PCR reakce *S. thermophilus* z buněk jedné bakteriální kolonie

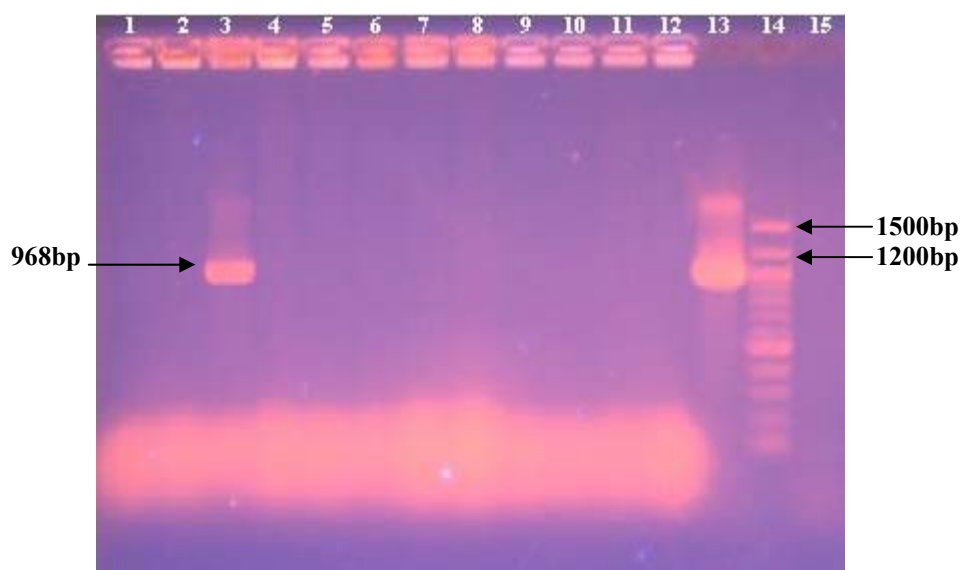
Z narostlých kolonií na Petriho miskách byla vždy kličkou sterilně odebrána jedna bílá lesklá velká kolonie, která byla rozsuspendována v PCR směsi. PCR reakce proběhla podle programu SHER 30. Do pozitivní kontroly o koncentraci 10 ng/μl bylo použito 0,5 μl DNA matrice. Gelová elektroforéza probíhala při 60 V, po dobu 150 minut na 1,2 % gelu. Výsledek je zobrazen na obrázcích 4.23 a 4.24.



Běh č.	kolonie	Detekce PCR produktu
1.	vzorek č. 1	-
2.	vzorek č. 2	-
3.	vzorek č. 3	-
4.	vzorek č. 4	-
5.	vzorek č. 5	-
6.	vzorek č. 6	-
7.	vzorek č. 7	-
8.	vzorek č. 8	-
9.	vzorek č. 9	-
10.	vzorek č. 10	-
11.	vzorek č. 11	-
12.	vzorek č. 12	-
13.	vzorek č. 13	-
14.	PK	+
15.	standard	+
16.	NK	-

NK...negativní kontrola PK...pozitivní kontrola
 -...PCR produkt nedetekován +...PCR produkt detekován

Obr. 4.23: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů s 1 bakteriální kolonií vzorků č.1-13 jako DNA matricí.



Běh č.	kolonie	Detekce PCR produktu
1.	vzorek č. 14	-
2.	vzorek č. 15	-
3.	vzorek č. 16	+
4.	vzorek č. 17	-
5.	vzorek č. 18	-
6.	vzorek č. 19	-
7.	vzorek č. 20	-
8.	vzorek č. 21	-
9.	vzorek č. 22	-
10.	vzorek č. 23	-
11.	vzorek č. 24	-
12.	vzorek č. 25	-
13.	PK	+
14.	standard	+
15.	NK	-

NK...negativní kontrola PK...pozitivní kontrola

-...PCR produkt nedetekován

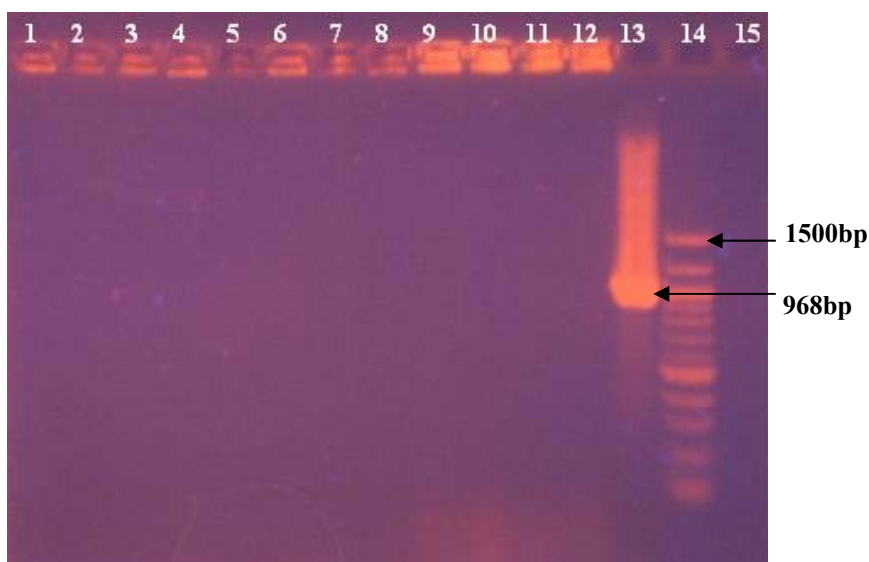
+...PCR produkt detekován

Obr. 4.24: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů s 1 bakteriální kolonií vzorků 14-25 jako DNA maticí.

- PCR produkty se nepodařilo detekovat, pouze v případě vzorku 16. Z obrázků gelové elektroforézy je zřejmé, že viskózní DNA uvízla v komůrkách.

4.5.1 PCR reakce z buněk jedné bakteriální kolonie s přípravou DNA matrice povařením

Různorodé narostlé kolonie (velké a bílé - B, malé šedé - Š, celé spektrum - *) na agaru M17 na Petriho miskách byly jednotlivě odebrány u vzorků 1, 3, 9 a 19 a rozsuspendovány ve vodě. Další postup probíhal podle kapitoly 3.5.5.1. PCR reakce proběhla podle programu STHERR 30 a gelová elektroforéza probíhala na 1,2 % gelu při napětí 60 V a po dobu 2 hodin (viz obrázek 4.25).



Běh. č	PCR produkt	Detekce PCR produktu
1.	Vzorek č.1 B	-
2.	Vzorek č.3 B	-
3.	Vzorek č.9 B	-
4.	Vzorek č.19 B	-
5.	Vzorek č.1 Š	-
6.	Vzorek č.3 Š	-
7.	Vzorek č.9 Š	-
8.	Vzorek č.19 Š	-
9.	Vzorek č.1 *	-
10.	Vzorek č.3 *	-
11.	Vzorek č.9 *	-
12.	Vzorek č.19 *	-
13.	PK	+
14.	Standard	+
15.	NK	-

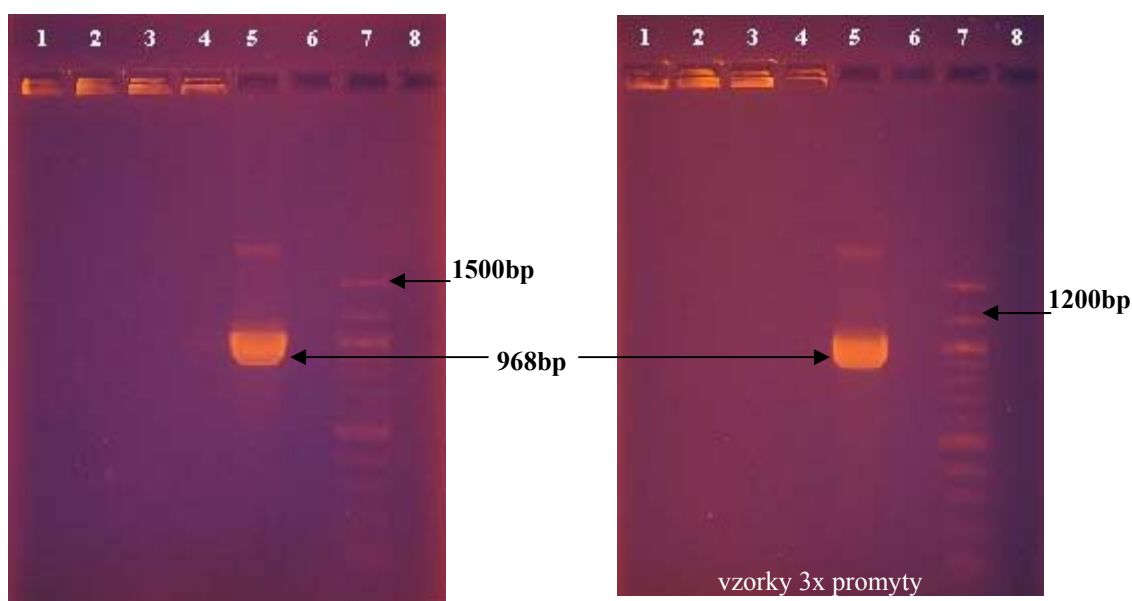
PK...pozitivní kontrola NK...negativní kontrola +/-...PCR produkt detekován/nedetekován

Obr. 4.25: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů s 1 bakteriální kolonií vzorků č.1, 3, 9 a 19 jako DNA matricí po povaření.

➤ U žádného ze vzorků se DNA neamplifikovala.

4.5.2 PCR reakce z buněk bakteriálních kolonií s přípravou DNA matrice prodlouženým povařením

Z narostlých Petriho misek byla kličkou odebrán větší počet kolonií u vzorků 1, 3, 15 a 16. Byly vytvořeny 2 série vzorků, u kterých se postupovalo odlišným způsobem. U první série se postupovalo podle kapitoly 3.5.5.1 (BOIL 45 minut), ale u druhé série byly vzorky ještě 3x promyty vodou a zcentrifugovány a teprve poté se postupovalo dle kapitoly 3.5.5.1 (BOIL 45 minut). V tomto experimentu byla zvolena ještě jedna pozitivní kontrola na přítomnost inhibitorů PCR v kultivovaném médiu, kdy se jako DNA matrice použil utuhlý agar M17 s laktózou. PCR reakce proběhla dle programu SHER 30 a gelová elektroforéza probíhala na 1,2 % gelu při napětí 60 V a po dobu 2,5 hodiny (viz obrázek 4.26).



Běh č.	DNA z kolonií	Detekce PCR produktu	Běh č.	DNA z kolonií	Detekce PCR produktu
1.	vzorek 1	-	1.	vzorek 1 *	-
2.	vzorek 3	-	2.	vzorek 3 *	-
3.	vzorek 15	-	3.	vzorek 15 *	-
4.	vzorek 16	-	4.	vzorek 16 *	-
5.	PK	+	5.	PK	+
6.	PK + agar	-	6.	PK + agar	-
7.	standard	+	7.	standard	+
8.	NK	-	8.	NK	-

+...PCR produkt detekován -...PCR produkt nedetekován

PK...pozitivní kontrola NK...negativní kontrola *...vzorky byly 3x promyty

Obr. 4.26: Agarózoová gelová elektroforéza PCR produktů vzorků č.1, 3, 15 a 16 s větším počtem bakteriálních kolonií jako DNA matricí po prodlouženém povaření.

- U žádného ze vzorků nebyl PCR produkt detekován. Je zřejmé, že v komůrkách gelu uvízly hrubé lyzáty buněk.

4.5.3 PCR reakce s koloniemi narostlými na Bile esculin azide agaru s použitím primerů Sterm 1 a Sterm 2

Jedna kolonie narostlá na vysoce specifickém Bile esculin azide agaru pro enterokoky byla vždy u vzorků 1, 3, 9 a 19 vypíchnuta a rozsuspendována ve vodě. Dále se postupovalo podle kapitoly 3.5.5.1. PCR reakce proběhla dle programu SHER 30 a gelová elektroforéza probíhala na 1,2 % gelu při napětí 60 V po dobu 2 hodiny (viz obrázek 4.27).

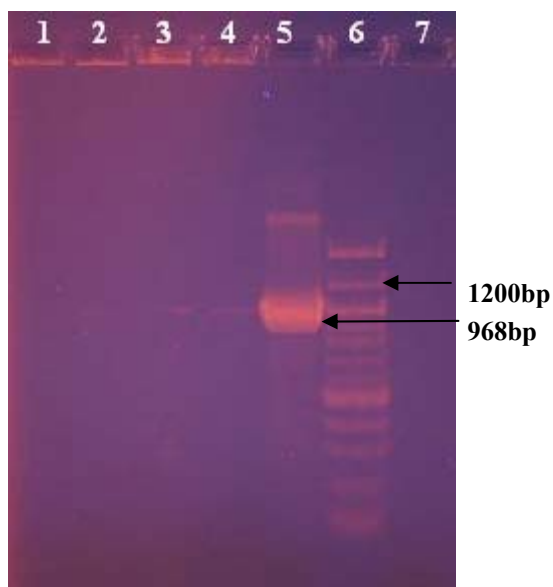
Běh. č	PCR produkt	Detekce PCR produktu
1.	Vzorek 1	-
2.	Vzorek 3	-
3.	Vzorek 9	-
4.	Vzorek 19	-
5.	PK	+
6.	standard	+
7.	NK	-

NK...negativní kontrola

PK...pozitivní kontrola

+...PCR produkt detekován

-...PCR produkt nedetekován



Obr. 4.27: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů vzorků č.1, 3, 9 a 19 s bakteriálními koloniemi narostlých na vysoce specifickém médiu pro enterokoky jako DNA matricí.

➤ Žádný z PCR produktů se neamplifikoval.

4.6 Identifikace bakterií rodu *Enterococcus* z lyofilizátů buněk

Při kultivaci buněk na médiu M17 ve větším počtu případů došlo k nárůstu kolonií, které nebyly stejné velikosti a někdy ani vzhledu. Purifikovaná DNA se jako PCR produkt u 4 vzorků vůbec neamplifikovala, anebo jen velmi nezřetelně. Vzorky musely být ještě jednou přečištěny a přesráženy ethanolem, aby se PCR produkt amplifikoval. Z těchto výsledků bylo usouzeno, že se pravděpodobně jedná o směsné kultury, a proto byla provedena ještě identifikace na přítomnost bakterií rodu *Enterococcus*.

4.6.1 Kultivace bakteriálních kultur lyofilizátů u vzorků 1, 3, 9 a 19 na Bile esculin azide agaru a krevním agaru

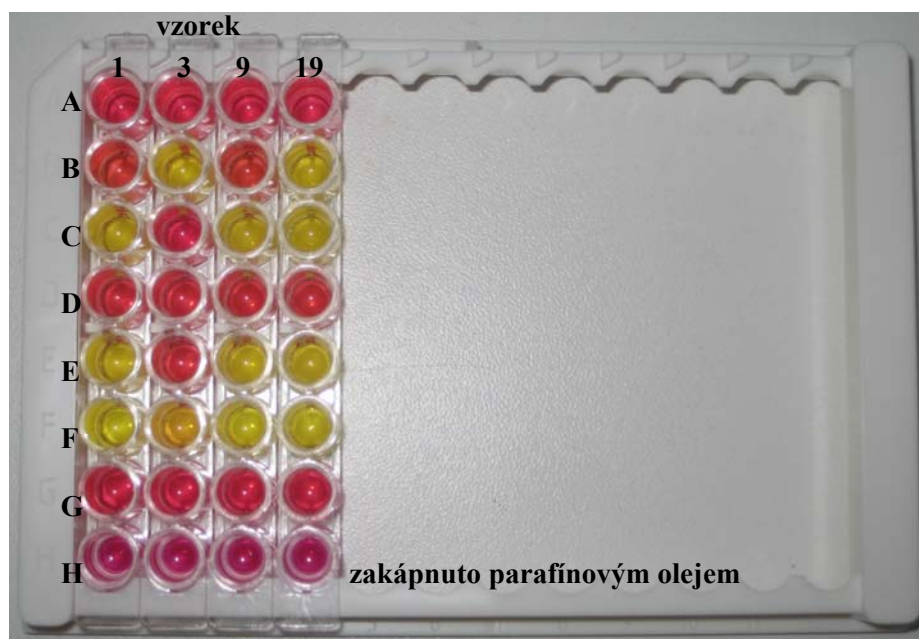
Kultivace proběhla podle kapitoly 3.5.1.4, kdy narostlá bakteriální kultura v tekutém médiu M17 byla kličkou sterilně přenesena a rozetřena na utuhlý Bile esculin azide agar. Narostly tmavé kolonie s černým halo, což potvrzuje skutečnost, že se jedná o rod *Enterococcus*. Bile esculin azide agar obsahuje azid sodný, který inhibuje růst G^- bakterií, a bakteriologickou žluč, která inhibuje růst G^+ mikroorganismů. Fekální streptokoci hydrolyzují esculin na glukózu a eskuletin a právě díky produkci eskuletinu vzniká černý komplex.

Vždy jedna kolonie narostlá na Bile esculin azide agaru byla přeočkována na utuhlý krevní agar. Kultivace probíhala po dobu 24 hodin při 37 °C.

- Růst na Bile esculin azide agaru se projevil vznikem černého halo kolem kolonií. Vzorky bez výjimky tvořily na krevním agaru α -hemolýzu - enzymy obsažené ve vzorku částečně rozkládaly krev. Prokázána přítomnost enterokoků ve všech vzorcích.

4.6.2 Provedení testu EN-COCCUS na vzorcích 1, 3, 9 a 19

Tento test byl proveden za účelem rychlé identifikace bakterií rodu *Enterococcus*. Z buněk narostlých na Petriho miskách u vzorků 1, 3, 9 a 19 se připravila podle návodu suspenze a dále bylo pokračováno dle kapitoly 3.5.10. Kultivace probíhala přes noc při 37 °C. Výsledek barevných reakcí je zobrazen na obrázku 4.28.



Obr. 4.28: Výsledné barevné reakce EN-COCUCUS testu.

Vyhodnocení probíhalo podle kapitoly 3.5.10 a výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.4. Příslušné profily patřící určitým druhům rodu *Enterococcus* byly odečteny z indexu, který je uveden v návodu od výrobce.

Tab.4.4: Vyhodnocení EN-COCCUS testu.

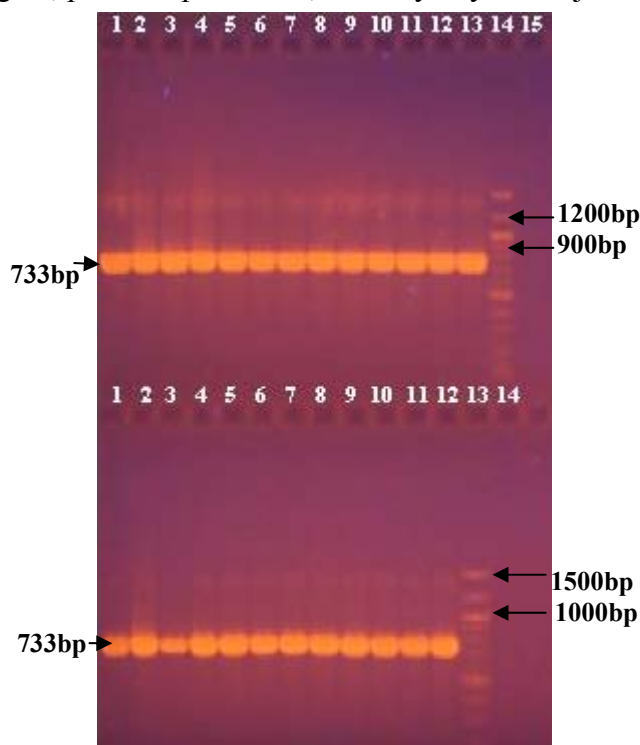
H ARG 1	G SOE 2	F ARA 4	E MAN 1	D SOR 2	C MLB 4	B RAF 1	A MLZ 2	vzorek
+	-	+	+	-	+	- +	-	1
+	-	+	-	-	-	+	-	3
+	-	+	+	-	+	- +	-	9
+	-	+	+	-	+	+	-	19
5			5			1 (0)		1
5			0			1		3
5			5			1 (0)		9
5			5			1		19
profil 551 (550)			Enterococcus faecium, mundtii...					1
profil 501			cross reakce *					3
profil 551 (550)			Enterococcus faecium, mundtii...					9
profil 551			Enterococcus faecium, mundtii...					19

* u vzorku 3 byly očekávány cross reakce z důvodu nedostatečné čistoty kultury

- Provedením EN-COCCUS testu bylo potvrzeno, že se jedná o bakterii rodu *Enterococcus* u vzorků lyofilizátů č. 1, 9 a 19. U vzorku č. 3 byla identifikována zkřížená reakce.

4.6.3 PCR reakce s purifikovanou DNA izolovanou z 25 lyofilizátů s použitím primerů specifických pro rod *Enterococcus*

Vzorky purifikované DNA naředěné na koncentraci 10 ng/μl byly použity jako DNA matrice do PCR směsi. PCR reakce proběhla dle programu Enterrod a agarózová gelová elektroforéza probíhala na 1 % gelu, při 60 V po dobu 2,5 hodiny. Výsledek je zobrazen na obrázku 4.29.



Řada 1			Řada 2		
Běh. č	DNA	Detekce PCR produktu	Běh.č.	DNA	Detekce PCR produktu
1.	vzorek 1	+	1.	vzorek 14	+
2.	vzorek 2	+	2.	vzorek 15	+
3.	vzorek 3	+	3.	vzorek 16	+
4.	vzorek 4	+	4.	vzorek 17	+
5.	vzorek 5	+	5.	vzorek 18	+
6.	vzorek 6	+	6.	vzorek 19	+
7.	vzorek 7	+	7.	vzorek 20	+
8.	vzorek 8	+	8.	vzorek 21	+
9.	vzorek 9	+	9.	vzorek 22	+
10.	vzorek 10	+	10.	vzorek 23	+
11.	vzorek 11	+	11.	vzorek 24	+
12.	vzorek 12	+	12.	vzorek 25	+
13.	vzorek 13	+	13.	standard	+
14.	standard	+	14.	NK	-
15.	NK	-			

NK...negativní kontrola +...PCR produkt detekován -...PCR produkt nedetekován

Obr. 4.29: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů (733bp) purifikované DNA 25 kmenů lyofilizátů s použitím primerů E1 a E2 specifických pro rod *Enterococcus*.

- Ve všech vzorcích se amplifikoval PCR produkt o velikosti 733bp specifický pro rod *Enterococcus* (byla potvrzena přítomnost rodu *Enterococcus* ve vzorcích).

4.6.4 PCR reakce s 1 bakteriální kolonií ze vzorků 1, 3, 9 a 19

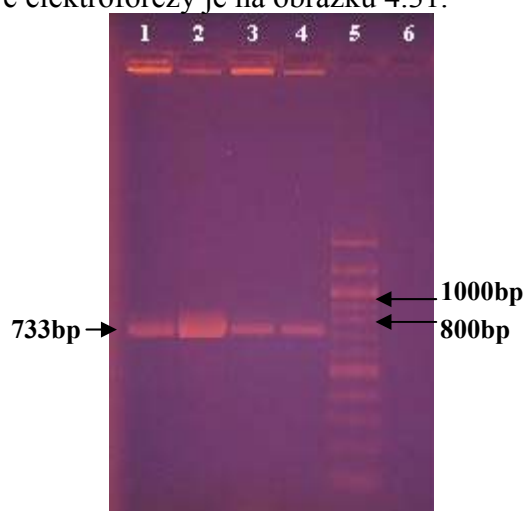
Z narostlých kolonií na Petriho miskách na Bile esculin azide agaru byla vždy vypíchnuta u vzorků 1, 3, 9 a 19 jedna kolonie s typickým černým halo a rozsuspendována ve 20 µl PCR vody (podle kapitoly 3.5.1.4) a dále byla povařena dle programu BOIL po dobu 15 minut. PCR reakce probíhala dle programu Enterrod. Agarózová gelová elektroforéza probíhala na 1 % gelu po dobu 2 hodin při napětí 60 V (viz obrázek 4.30). V druhém případě bylo se stejnými vzorky postupováno podle kapitoly 3.5.2.2 a vzorky byly po lyzi podrobeny PCR reakci dle programu Enterrod a výsledek gelové elektroforézy je na obrázku 4.31.

Běh. č	DNA matrice	Detekce PCR produktu
1.	Vzorek 1	+
2.	Vzorek 3	+
3.	Vzorek 9	+
4.	Vzorek 19	+
5.	standard	+
6.	NK	-

NK...negativní kontrola

+...PCR produkt detekován

-...PCR produkt nedetekován



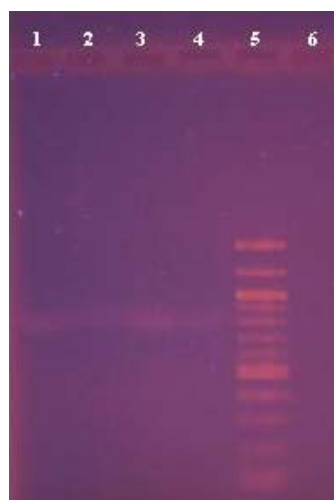
Obr. 4.30: : Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů vzorků č.1, 3, 9 a 19 s 1 bakteriální kolonií jako DNA matricí po povaření.

Běh. č	PCR produkt – DNA matrice	Detekce PCR produktu
1.	Vzorek 1	-
2.	Vzorek 3	-
3.	Vzorek 9	-
4.	Vzorek 19	-
5.	standard	+
6.	NK	-

NK...negativní kontrola

+...PCR produkt detekován

-...PCR produkt nedetekován



Obr. 4.31: : Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů vzorků č.1, 3, 9 a 19 s 1 bakteriální kolonií jako DNA matricí po lyzi.

- PCR produkty z kolonií se amplifikovaly pouze v případě po povaření, kde dávaly specifický PCR produkt pro rod *Enterococcus*.

4.6.5 Ověření specifity použitých primerů

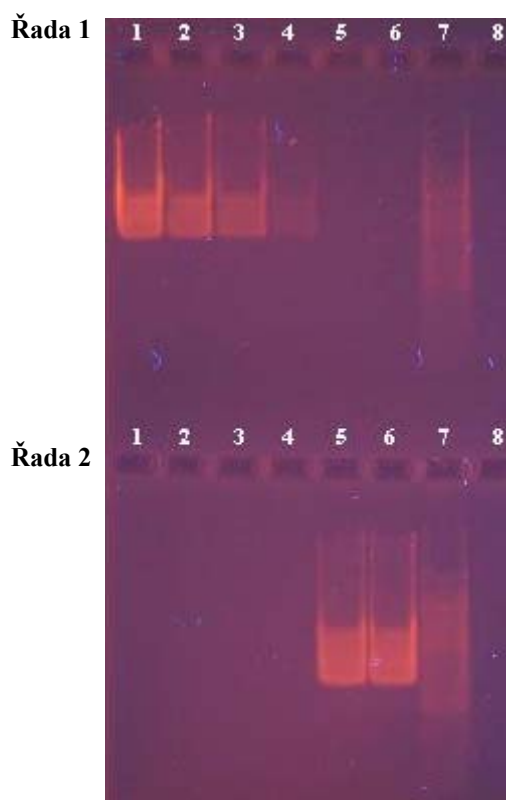
Experiment byl zaměřen na ověření specifity primerů Sterm 1 a Sterm 2 specifických pro druh *Streptococcus thermophilus* a primerů E1 a E2 specifických pro rod *Enterococcus*. Amplifikována byla DNA *S.thermophilus* CCM 4757 o koncentracích 10 ng/ml, 1 ng/ml, 100 pg/ml a 10 pg/ml (4 vzorky) a 10x ředěná rodu *Enterococcus* (2 vzorky získané od Dr. Burdychové). První PCR reakce proběhla za použití primerů Sterm 1 a Sterm 2 podle programu SHER 30. Druhá PCR reakce proběhla podle programu Enterrod s použitím primerů E1 a E2. Výsledek gelové elektroforézy, která probíhala na 1,1 % gelu při 60 V po dobu 2 hodin, je zobrazen na obrázku 4.32.

Běh č.	DNA matrice	Detekce PCR produktu
Řada 1 - primery Sterm 1 a Sterm 2		
1.	S 10 ng	+
2.	S 1 ng	+
3.	S 100 pg	+
4.	S 10 pg	+
5.	E 10x	-
6.	10xE	-
7.	standard	+
8.	NK	-
Řada 2 - primery E1 a E2		
1.	S 10 ng	-
2.	S 1 ng	-
3.	S 100 pg	-
4.	S 10 pg	-
5.	E 10x	+
6.	E 10x	+
7.	standard	+
8.	NK	-

NK...negativní kontrola

S - DNA *Streptococcus thermophilus*

E - DNA *Enterococcus*



Obr. 4.32: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů. Amplifikována byla DNA *Streptococcus thermophilus* (10 ng až 1 pg) a DNA *Enterococcus* (10x) s primery specifickými pro druh *S. thermophilus* (1.řada) a s primery specifickými pro rod *Enterococcus* (2.řada).

- Při použití primerů specifických pro rod *Streptococcus* se amplifikovaly pouze PCR produkty druhu *S. thermophilus*. Naopak při použití primerů specifických pro rod *Enterococcus* se amplifikovaly PCR produkty jen rodu *Enterococcus*. Ověření specifity primerů proběhlo úspěšně.

5. DISKUZE

5.1 Stanovení citlivosti rodově specifické PCR - DNA *Lactobacillus paracasei* sups. *paracasei* CCDM 212/06

Při naočkování druhu *Lactobacillus paracasei* sups. *paracasei* CCDM 212/06 do tekutého živného MRS média, se médium zakalilo (důkaz o nárůstu kultury). Při přeočkování na MRS agar a po kultivaci při 37 °C po dobu 24 hodin narostly kolonie bílého lesklého vzhledu o stejné velikosti, z čehož lze předpokládat, že pracujeme s čistou kulturou. Kultura byla zlyzována a přečištěna fenolovou extrakcí a přítomnost DNA v hrubých lyzátech buněk a v purifikované DNA byla ověřena gelovou elektroforézou na 0,8 % gelu. V hrubých lyzátech bylo detekováno velké množství RNA a purifikovaná DNA byla relativně intaktní [5]. U vzorků purifikované DNA byla spektrofotometricky změřena absorbance a vzorky byly naředěny na koncentraci 10 ng/μl. Čistota vzorku byla v rozmezí hodnot 1,8-2,0 čili vzorek byl dostatečně čistý a nebylo proto třeba opakovat fenolovou extrakci a přesrážení ethanolem. Rodově specifická PCR proběhla podle programu LBC rod s primery LbLMA 1 a RL 16-1, kdy se amplifikovaly PCR produkty o velikosti 250bp [7]. PCR produkty ředěných hrubých lyzátů se amplifikovaly bez výjimky s klesající intenzitou detekce přímo úměrně k vyššímu stupni zředění. Citlivost rodově specifické PCR byla stanovena na 10 pg.

5.2 Stanovení citlivosti druhově specifické PCR - DNA *Streptococcus thermophilus* CCM 4757

Z narostlých kolonií na M17 agaru s laktózou bylo usouzeno, že se jedná o čistou kulturu. Buňky byly zlyzovány a přečištěny fenolovou extrakcí, kde z agaróзовé gelové elektroforézy na 0,8 % gelu byla vizualizována DNA, jak v hrubých lyzátech buněk, tak i v purifikované DNA. PCR reakce proběhla podle programu SHER 30 s různým množstvím primerů Sterm 1 a Sterm 2 a velikost amplifikovaného PCR produktu byla 968bp [23]. Purifikovaná DNA byla naředěna až na množství v jednotkách femtogramů pro stanovení citlivosti druhově specifické PCR reakce. Při srovnání detekce stejných vzorků, u kterých bylo použito různé množství primerů (1 μl nebo 0,5 μl), došlo ke zvýšení detekce o jedno ředění. Čili při nejmenší detekci 10 pg, kde byl použit 1 μl primerů, stoupla na nejmenší detekované množství 1 pg s použitím 0,5 μl primerů. Rozdíly v detekovaných množstvích možná odráží variabilitu v přípravě směsí s malým množstvím DNA. Je také možné, že menší množství primerů vyvázalo menší množství Mg²⁺ iontů. Ionty Mg²⁺ jsou nezbytné pro správnou činnost DNA polymerázy [1].

5.3 Identifikace bakterií druhu *S. thermophilus* ve vybraných mléčných výrobcích pomocí PCR

Z hrubých lyzátů buněk 10 mléčných výrobků byla izolována DNA pomocí magnetického nosiče [10]. Množství DNA v elúatech bylo většinou 70 ng a na gelu bylo slabě vizualizované (DNA však byla amplifikována v PCR a to úspěšně). Amplifikovala se různá množství DNA. Hrubé lyzáty buněk kvůli své vysoké viskozitě uvízly v komůrkách. U vzorků IX a X lze rozpoznat jinou povahu hrubých lyzátů (jedná se o zákys a acidofilní

mléko). Hrubé lyzáty těchto vzorků neměly tak vysokou viskozitu, a proto je z obrázku gelové elektroforézy zřejmé menší uvíznutí vzorku v komůrce. Pravděpodobně vzhledem k přístupnější struktuře těchto mléčných výrobků se uvolnilo tak velké množství DNA. U vzorků I - III se při lyzi buněk při centrifugaci tvořily 3 vrstvy. Na dně zkumavky byl sediment buněk, následně vrstva sterilní vody a poté opět sediment buněk. Zřejmě to bylo způsobeno vyšším obsahem tuků v těchto jogurtech. Při gelové detekci DNA ze vzorků eluátů a supernatantů se neamplifikoval žádný ze vzorků (obrázek nebyl vložen do diplomové práce). PCR reakce probíhala podle programu SHER 30 s primery Sterm 1 a Sterm 2, kde velikost ampliconů odpovídá 968bp. PCR produkty s DNA matricí ze supernatantů nebyly detekovány u žádného ze vzorků. To svědčí o přítomnosti inhibitorů PCR v supernatantech [5]. Naopak se ale amplifikovala DNA z eluátů u všech vzorků z mléčných výrobků, ale nepodařilo se prokázat souvislost mezi zvyšujícím se množstvím použité DNA matrice a větší intenzitou detekce PCR produktu. Jako pozitivní kontrola byl použit kontrolní kmen *S. thermophilus* CCM 4757. Nepotvrdila se ani přítomnost inhibitorů PCR směsi ve vzorcích DNA eluované z magnetického nosiče. Specifický PCR produkt byl prokázán ve všech typech analyzovaných výrobků.

5.4 Identifikace bakterií rodu *Streptococcus* z lyofilizátů buněk

Po kultivaci na agaru M17 s laktózou narostly kolonie o různé velikosti a zabarvení. Při opakovaném křížovém roztěru, kdy byla na Petriho misku očkovaná vždy jedna ze spekulativních kolonií, už narostly kolonie stejné velikosti i barvy. Bylo potvrzeno, že se jedná o směsné bakteriální kultury, které dále nebyly přečišťovány. Další část práce byla proto zaměřena na identifikaci bakterií druhu *S. thermophilus*, ale i na ověření čistoty kultury.

5.4.1 Identifikace bakterií rodu *Streptococcus thermophilus* z lyofilizátů buněk magnetickými nosiči

Vzorky z lyofilizátů buněk kmenů *Streptococcus thermophilus* ze Sbírký mléčných mikroorganismů (CCDM, Tábor) byly bez předchozí kultivace lyzovány a separovány pomocí magnetických nosičů. Prokázala se tak vhodnost použití magnetických nosičů. Na gelové elektroforéze na 0,8 % gelu byla ověřena úspěšnost lyze, kde se u hrubých lyzátů amplifikovalo větší množství intaktní DNA než 35 ng/μl. U vzorků eluátů se DNA detekovat nepodařilo, ale u supernatantů byla DNA vizualizována v různém množství. Ve většině případech bylo množství DNA v supernatantech vyšší než 350 ng. PCR reakce probíhala podle programu SHER 30 s primery Sterm 1 a Sterm 2. Jako pozitivní kontrola byl použit kontrolní kmen *S. thermophilus* CCM 4757. PCR produkt se amplifikoval o velikosti 968bp [23] u všech vzorků s výjimkou 4 vzorků, u kterých byla intenzita PCR produktu velmi slabá i po zvýšení množství DNA matrice přidávané do PCR směsi.

5.4.2 Kontrola identifikace bakterií druhu *Streptococcus thermophilus* z 25 lyofilizátů s využitím DNA izolované fenolovou extrakcí

U lyzovaných vzorků byla na 0,8 % gelu ověřena přítomnost DNA, která ve všech případech mnohokrát přesahovalo hodnotu hmotnostního standardu 350 ng. U všech vzorků byla spektrofotometricky stanovena přibližná koncentrace purifikované DNA na hodnotu vyšší než

je 10 ng/μl. PCR reakce probíhala podle programu SHER 30 s primery Sterm 1 a Sterm 2. Jako pozitivní kontrola byl použit kontrolní kmen *S. thermophilus* CCM 4757. PCR produkty se amplifikovaly u všech vzorků o velikosti 968bp s vysokou intenzitou s výjimkou stejných čtyř vzorků, které se neamplifikovaly ani u separace magnetickými nosiči [23]. Po přečištění fenolovou extrakcí a přesrážení ethanolem u těchto 4 vzorků se již PCR produkty amplifikovaly o stejné intenzitě. Vzhledem k vysoké pravděpodobnosti, že vzorky jsou směsné, se přistoupilo k obecné identifikaci a zařazení těchto vzorků mezi doménu Bakterie použitím inverzních primerů. PCR reakce s primery DG 74 a RW 01 probíhala podle programu UNIV 30 [32] a detekovány byly amplikony u všech 4 problematických vzorků na 1,8 % gelu o velikosti PCR produktu 370bp, kde ale byly detekovány též nespecifické produkty, protože metoda ještě není zcela optimalizována.

Nezávisle oběmi metodami bylo potvrzeno, že byla izolována amplifikovatelná DNA. U stejných 4 vzorků byly opakovaně zaznamenány slabé detekce amplikonů jak u separace pomocí magnetických nosičů, tak u metody fenolové extrakce, kde k úspěšné amplifikaci pomohlo nové přečištění vzorků, protože ve vzorcích DNA byly inhibitory PCR [5].

5.5 PCR reakce z buněk jedné bakteriální kolonie

PCR reakce s koloniemi proběhla standardně podle programu SHER 30 s primery Sterm 1 a Sterm 2. Jako pozitivní kontrola byl použit kontrolní kmen *S. thermophilus* CCM 4757. Velikost amplikonu měla být 968bp. Při vnesení bakteriální kolonie do PCR směsi došlo k jejímu zakalení. Na gelu se to projevilo vznikem mléčného podbarvení jednotlivých komůrek gelu, které bylo pozorovatelné bez ozáření UV světlem. Při vnesení 1 kolonie do PCR směsi se PCR produkt nepodařilo detekovat, ale v komůrkách uvízly viskózní vzorky. Vybrané vzorky také byly podrobeny lyzi v programu BOIL či alkalické lyzi, ale výsledek nezaznamenal žádné zlepšení v amplifikaci. Vzorky také byly před PCR promývány několikrát sterilní vodou, kde by se dalo očekávat zlepšení detekce, protože četné inhibitory PCR reakce se ředěním či promýváním ředí také. Tím pádem je snížena jejich koncentrace ve vzorku a už nemusí mít negativní vliv na detekci PCR produktu [1]. Ani v tomto případě amplifikace nebyla úspěšná. Důvod je zřejmě v přítomnosti inhibitorů v médiu M17.

PCR reakce s koloniemi byla také testována na bakterie rodu *Enterococcus*. Kolonie narostlé na Bile esculin azide agaru byly kličkou vneseny do PCR vody a povařeny podle programu BOIL. PCR reakce probíhala s primery E1 a E2 dle programu Enterrod. Tento experiment byl proveden právě se 4 vzorky, které se opakovaně neamplifikovaly při předchozích testech. Z tohoto důvodu je na místě si myslet, že obsahují druh *Enterococcus*. Bile esculin azide agar je velmi specifické médium pro identifikace fekálních streptokoků a kolonie *S. thermophilus* na tomto agaru nenarostou. Odebrané kolonie narostlé na Bile esculin azide agaru potvrdily přítomnost enterokoků ve vzorcích. Amplikon se amplifikoval o velikosti 733bp. Pozitivní kontrola zde nebyla použita.

5.6 Identifikace bakterií rodu *Enterococcus* z lyofilizátů buněk

Při vyhodnocení EN-COCCUS testu došlo u vzorku 3 ke vzniku cross reakcí, protože kolonie narostlé na Petriho misce byly různých velikostí a nedalo se odebrat pouze kolonie stejného vzhledu na vytvoření suspenze, takže mohlo jít o směs a v takovém případě dochází ke cross reakcím, což je pravděpodobně příčinou neúspěšné identifikace. V tomto případě PCR reakce proběhla podle programu Enterrod s primery E1 a E2 na 1 % gelu, kde se amplifikoval PCR produkt o velikosti 733bp [24]. Úspěšná amplifikace u všech vzorků potvrdila, že se jedná o směsné kultury, kde je přítomen jak *Streptococcus thermophilus* tak i rod *Enterococcus*.

6. ZÁVĚR

V rámci diplomové práce byla zavedena metoda identifikace bakterií druhu *Streptococcus thermophilus* pomocí PCR.

První část práce byla zaměřena na přípravu pozitivní kontroly do PCR s primery druhově specifickými pro rod *S. thermophilus*, kde byla použita DNA kmene *Streptococcus thermophilus* CCM 4757 získaná z České sbírky mikroorganismů. Buňky byly lyzovány a přečištěny fenolovou extrakcí. Citlivost PCR reakce byla stanovena na 10 pg nebo 1 pg, dle množství použitých primerů.

V druhé části práce bylo analyzováno 10 mléčných kysaných výrobků BMK byly lyzovány a DNA separována magnetickým nosičem. PCR produkty ze supernatantů se neamplifikovaly. Eluáty použité jako DNA matrice do PCR směsi se amplifikovaly bez výjimky u všech vzorků. Jako pozitivní kontrola sloužila purifikovaná DNA kmene *S. thermophilus* CCM 4757. Jako nejoptimálnější množství DNA matrice byl určen 1 µl.

Třetí část této práce se soustředila na druhovou PCR identifikaci 25 bakterií *S. thermophilus* získaných ze sbírky mléčných kultur Laktoflóra ve formě lyofilizátů. U všech 25 kmenů se jednalo o směsné kultury, které nebyly pro další práci čištěny. DNA z lyzátů buněk byla separována jak magnetickými nosiči, tak byla přečištěna metodou fenolové extrakce, která složila pouze jako metoda kontrolní. Nezávisle na sobě obě metody potvrdily přítomnost bakterií druhu *S. thermophilus*, ale u obou metod se neamplifikovaly PCR produkty stejných vzorků (1, 3, 9 a 19). U separace magnetickými nosiči nepomohlo pro úspěšnou amplifikaci ani zvýšení množství DNA matrice. U fenolové extrakce stačilo vzorky přečistit. Tyto 4 vzorky byly také testovány v PCR pomocí univerzálních primerů, aby se ověřila jejich schopnost amplifikace, která byla potvrzena. Jako pozitivní kontrola sloužila purifikovaná DNA kmene *S. thermophilus* CCM 4757.

Vzhledem k podezření, že se jedná o směsné kultury, byly vzorky DNA podrobeny ještě PCR reakci specifické pro rod *Enterococcus* s vhodnými primery, kde se amplifikovaly PCR produkty u všech 25 kmenů.

Na závěr lze konstatovat, že ve všech vzorcích lyofilizátů byla prokázána přítomnost DNA jak druhu *S. thermophilus* tak i rodu *Enterococcus*, který nebyl dále druhově zařazen. Přítomnost bakterií rodu *Enterococcus* byla ověřena kultivačně na Bile esculin azide agaru, na krevním agaru a pomocí EN-COCCUS testu

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Čikoš Š., Koppel J., Kantíková M.: *Polymerázová reťazová reakcia a jej použitie v biologickom výskume a daignostike*. Košice: Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, 2001. 203 s. ISBN 80-968618-0-8.
- [2] Ruml T., Rumlová M., Pačes V.: *Genové inženýrství*. Praha: VŠCHT, 2002. 1. vydání. 270 s. ISBN 80-7080-499-8.
- [3] Králová B.: *Bioanalytické metody*. Praha: VŠCHT, 2001. 3. přepracované vydání. 254 s. ISBN 80-7080-449-1.
- [4] Doušková D.: *Molekulární diagnostika bakterií mléčného kvašení rodu Bifidobacterium*. Brno, 2007. 86 s. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity na Ústavu experimentální biologie. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.
- [5] Petrová K.: *Identifikace bakterií mléčného kvašení (BMK) v mléčných výrobcích s využitím metod amplifikace DNA*. Brno, 2004. 116 s. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity na Katedře mikrobiologie. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc.
- [6] VIERSTRAETE, Andy. *PCR to amplify the requested gene* [online]. 1999 [cit. 2008-04-05]. Dostupný z WWW: <<http://users.ugent.be/~avierstr/index.html>>.
- [7] Dubernet S., Desmasures N., Guéguen M.: *A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level*. 2002. FEMS Microbiol. Lett. 214-275.
- [8] Šilhánková L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Praha: Academia, 2002. 3.vydání. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [9] Görner F., Valík L': *Aplikovaná mikrobiológia potravín*. Bratislava: Malé centrum, 2004. 1.vydání. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [10] Němcová P.: *Využití magnetických nosičů při izolaci genomové DNA v kvalitě vhodné pro PCR*. Brno, 2006. 63 s. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity na Ústavu experimentální biologie. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.
- [11] Klaban V.: *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. Praha: Galén, 2005. 1. vydání. 654 s. ISBN 80-7262-341-9.
- [12] Frank, Hanns K.: *Dictionary of food microbiology*. Lancaster: Technomic publishing CO. Inc., 1992. 298 s. ISBN 1-56676-010-0.
- [13] Stiles M.E., Holzapfel W.H.: *Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy*. *Int. J. Food Microbiol.* 36: 1-29.

- [14] Křížová J., Španová A., Rittich B., Horák D.: *Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres for genomic DNA isolation*. Journal of Chromatography A, Amsterdam, Elsevier, Nizozemí. ISSN 0021-9673, 2005, vol. 1064, no. 1, s. 247-253.
- [15] Horák D., Rittich B., Španová A.: *Carboxyl-functionalized magnetic carrier for isolation and identification of DNA in dairy products*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials. 2007. 311: 249-254.
- [16] Horák D., Babič M., Macková H., Beneš M.J.: *Preparation and properties of magnetic nano- and micro-sized particles for biological and environmental separations*. Journal of Separation Science 30. 1751.
- [17] Kleideiter G., Nordmeier E.: *Poly(ethylene glycol)-induced DNA condensation in aqueous/methanol containing low-molecular-weight electrolyte solutions*. Elsevier, 1999. Polymer 40. 4013-4023.
- [18] Motlová J.: *Kam spěje taxonomie rodů Streptococcus a Enterococcus?* Zprávy CEM (SZÚ, Praha) [online]. 2003 [cit. 2008-03-30], 12(7):s. 298-305. Dostupný z WWW: <www.szu.cz/cem/zpravy/zpr0703/strepto.htm>.
- [19] Institut des Sciences de la Vie [online]. 20.6.2005 [cit. 2008-04-12]. Dostupný z WWW: <<http://www.biol.ucl.ac.be/gene/genome/introduction.html>>.
- [20] Chumchalová, J.: MiniAtlas mikroorganismů [online]. Září 2006 [cit. 2008-04-12]. Dostupný z WWW: <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/MiniAtlas/str-t.htm>>.
- [21] Monannée au college [online]. 2003-2008 [cit. 2008-04-12]. Dostupný z WWW: <www.monanneeaucollege.com/yaourt.htm>.
- [22] Schmidt R.H., Rodrick G.E.: *Food safety handbook*. New Jersey : John Wiley & Sons, 2003. 850 s. ISBN 0-471-21064-1.
- [23] Lick S., Drescher K., Heller K. J.: *Survival of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus and Streptococcus thermophilus in the Terminal Ileum of Fistulated Göttingen Minipigs*. Applied and Environmental Microbiology. 2001, vol. 67, no. 9 [cit. 2008-04-15], s. 4137-4143.
- [24] Deasy B.M., Rea M.C., Fitzgerald G.F., Cogan T.M., Beresford T.P.: *A rapid PCR based Method to distinguish between Lactococcus and Enterococcus*. System. Appl. Microbiol. 2000, 23. [cit. 2008-04-15], s. 510-522.
- [25] Bartoš M., Forejtníková H., Bartošová L.: *Biotechnologie pro farmaceuty: Návod k praktickým cvičením*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2006. 1.vydání. 98 s. ISBN 80-7305-559-7.
- [26] *Cheese :chemistry, physics and microbiology*. Volume 1, General aspects / 3rd ed. Amsterdam : Elsevier, 2004. xi, 617 s. : il. ISBN 0-1226-3652-X (v. 1).

- [27] Delorme C.: *Streptococcus thermophilus*. *International Journal of Food Microbiology* (2007), doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.014.
- [28] Mater D.D.G. and col.: *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. *FEMS Microbiol. Let.* 250 (2005) 185-187.
- [29] Husson-Kao C.: *The autolysis of Streptococcus thermophilus DN-001065 is triggered by several food-grade environmental signals*. *International Dairy journal* 9 (1999). 715-723.
- [30] Hols P. and col.: *New insights in the molecular biology and physiology of Streptococcus thermophilus revealed by comparative genomics*. *FEMS Microbiology Reviews* 29. (2005). 435-463.
- [31] Furet J.P., Quénée P., Tailliez P.: *Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR*. *International Journal of Food Microbiology* 97 (2004). 197-207.
- [32] Greisen K. and col.: *PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid*. *Journal of Clinical Microbiol.* 1994. 335-351.
- [33] National center for biotechnology information [online]. 21.3.2008 [cit. 2008-04-17]. Dostupný z WWW:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=322159>>.
- [34] Burdychová R.: *Využití mikrobiálních expresních systémů k produkci rekombinantních proteinů*. Disertační práce. Brno : VUT FCH, 2004. 148 l.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

16S/23S rRNA - 16/23 jednotek ribosomů v ribosomální ribonukleové kyselině

A/T/C/G - adenin báze/tymin báze/cytosin báze/guanin báze

AK - aminokyseliny

ARA - arabinóza

ARG - arginin

BMK - bakterie mléčného kvašení

bp - páry bází

CCDM - Culture Collection of Dairy Microorganisms

CCM - Czech Collection of Microorganisms

CIZ - označení pro roztok chloroformu a izoamylalkoholu

ČSN - označení české státní normy

dATP - deoxyadenintrifosfát

dCTP - deoxycytosintrifosfát

dGTP - deoxyguanintrifosfát

DNA/rDNA - kyselina deoxyribonukleová/ribosomální kyselina deoxyribonukleová

dTTP - deoxytymintrifosfát

G⁻ - gramnegativní

G⁺ - grampozitivní

HL - hrubý lyzát

KTJ - kolonie tvořící jednotky

m.j. - mezinárodní jednotka

MAN - mannitol

MLB - melibióza

MLZ - melezitóza

MM směs - master mix směs

mol. - molární

NK - negativní kontrola

P(HEMA-*co*-GMA) - poly(2-hydroxyethyl methakrylát-*co*-glycidyl methakrylát)

PCR - polymerázová řetězová reakce

PE - polyethylen

PEG - polyethylenglykol

PK - pozitivní kontrola

RAF - raffinóza

SDS - dodecylsulfát sodný

SOE - sorbóza

SOR - sorbitol

SPRI - solid phase reversible immobilisation (reverzibilní imobilizace na pevné fázi)

USD - americký dolar

9. SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Jednoduché schéma provedení EN-COCCUS testu.

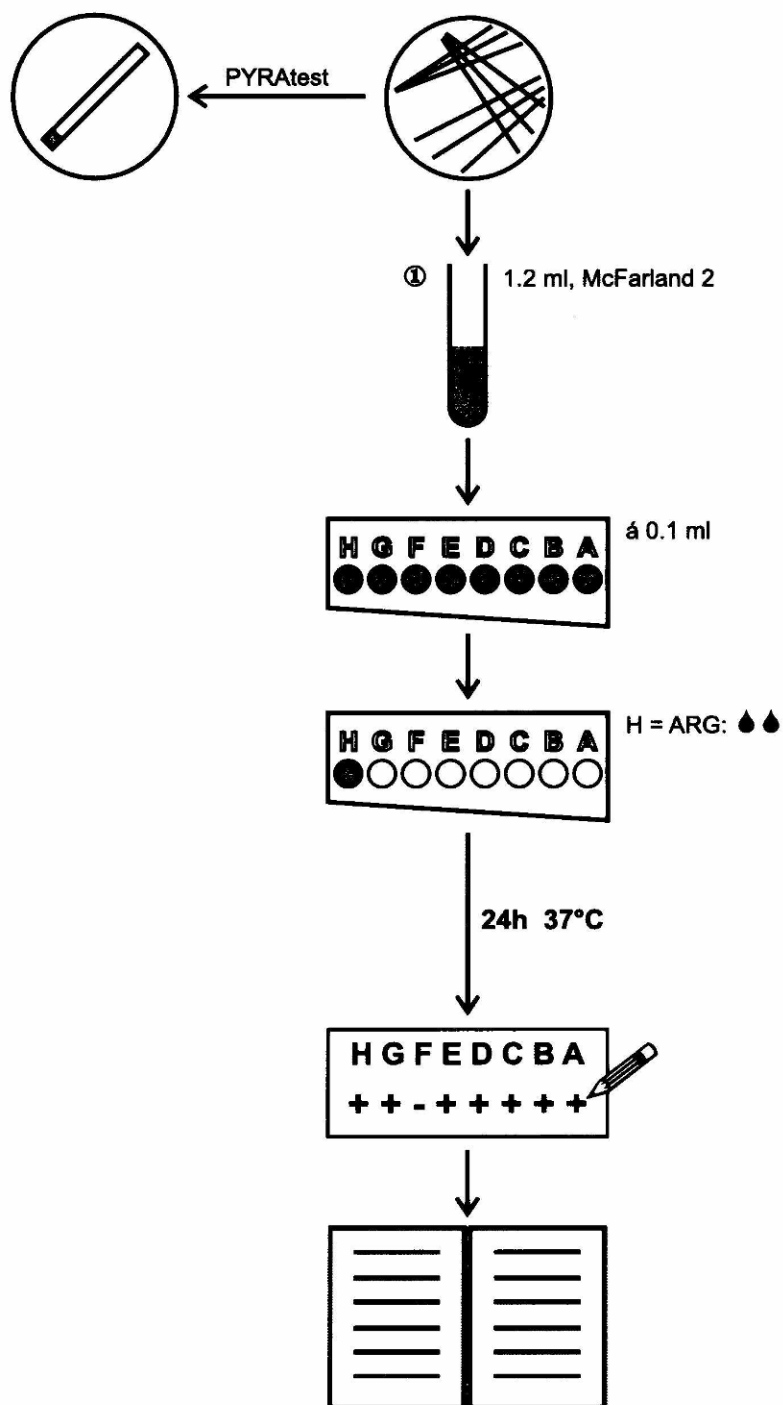
Příloha 2: Ukázka růstu lyofilizátů č. 4 a 6 na agaru M17 (zprava).

Příloha 3: Ukázka růstu lyofilizátů č. 19, 9, 3 a 1 na Bile esculin azide agaru (zprava).

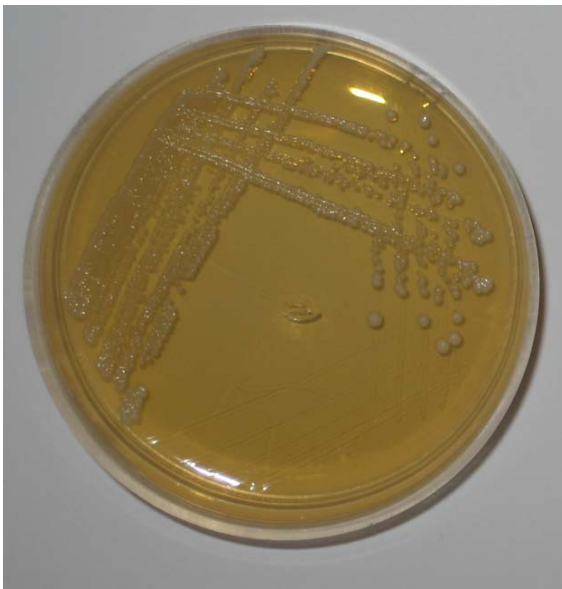
Příloha 4: Ukázka růstu 1 kolonie z lyofilizátů č. 19, 9, 3 a 1 na krevním agaru (zprava).

Příloha 5: Poster – prezentace na FCH VUT v Brně 9.–11.9.2008 na 4. ročníku mezinárodní konference „Chemistry & life“.

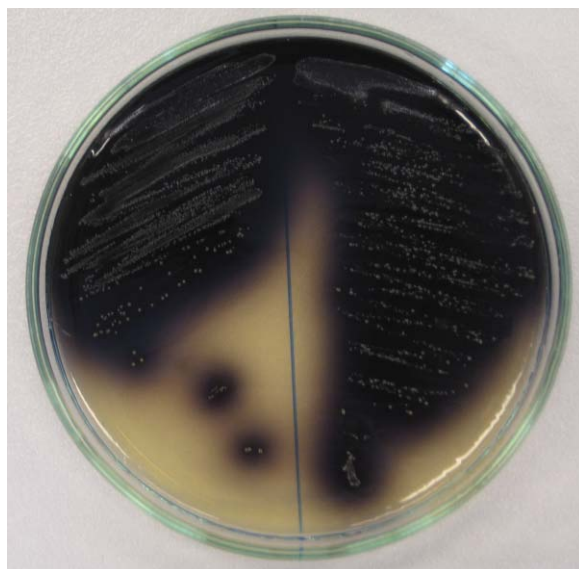
EN-COCCUStest



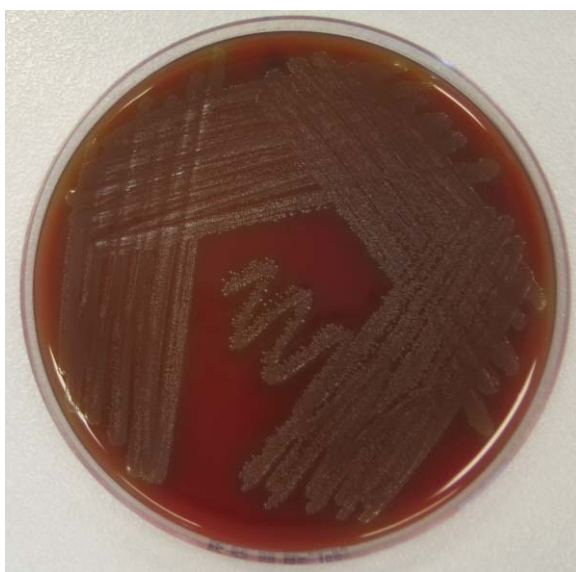
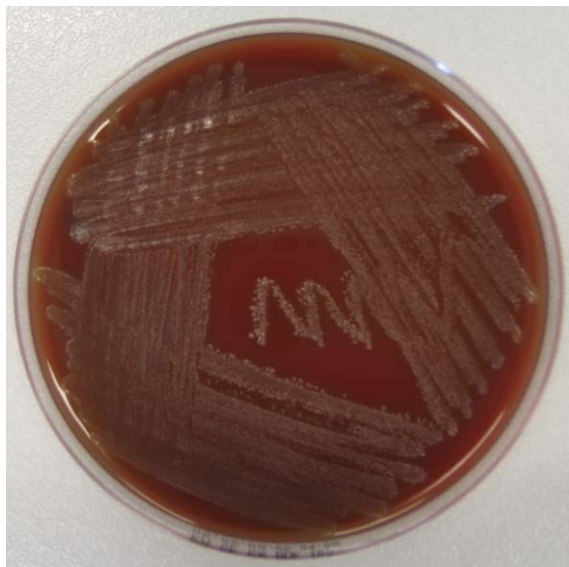
Příloha 1: Jednoduché schéma provedení EN-COCCUS testu.



Příloha 2: Ukázka růstu lyofilizátů č. 4 a 6 na agaru M17 (zprava).



Příloha 3: Ukázka růstu lyofilizátů č. 19, 9, 3 a 1 na Bile esculin azide agaru (zprava).



Příloha 4: Ukázka růstu 1 kolonie z lyofilizátů č. 19, 9, 3 a 1 na krevním agaru (zprava).

Příloha 5: Poster – prezentace na FCH VUT v Brně 9.–11.9.2008 na 4. ročníku mezinárodní konference „Chemistry & life“.

