

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 TVRDÝCH SÝRECH
S VYUŽITÍM AMPLIFIKAČNÍCH METOD.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

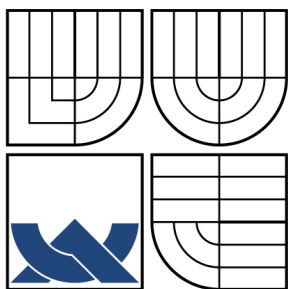
DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE

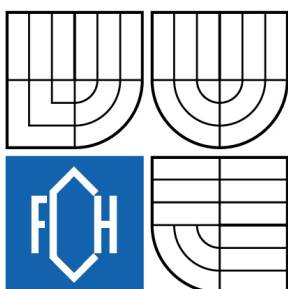
AUTHOR

JITKA HERZOGOVÁ

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 TVRDÝCH SÝRECH S VYUŽITÍM AMPLIFIKAČNÍCH METOD.

IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA IN HARD CHEESES
USING AMPLIFICATION METHODS

DIPLOMOVÁ PRÁCE
DIPLOMA THESIS

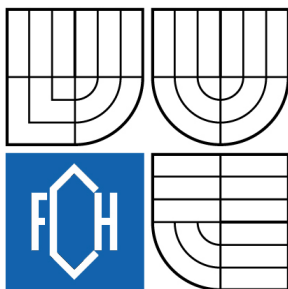
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

JITKA HERZOGOVÁ

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-DIP0222/2007

Akademický rok: **2007/2008**

Ústav

Ústav chemie potravin a biotechnologií

Student(ka)

Herzogová Jitka

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 tvrdých sýrech
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.

Jitka Herzogová
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

Diplomová práce byla zaměřena na identifikaci bakterií mléčného kvašení druhu *Lactococcus lactis* a poddruhů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* pomocí druhově a subdruhově specifické polymerázové řetězové reakce (PCR).

Metoda PCR byla použita k identifikaci bakterií druhu *Lactococcus lactis* v 10 vzorcích tvrdých sýrů. Byl vypracován postup přípravy vzorků tvrdých sýrů pro získání dostatečného množství buněk a přípravu hrubých lyzátů buněk. Celková DNA v kvalitě vhodné pro PCR byla izolována použitím magnetických částic P(HEMA-co-GMA) v přítomnosti polyethylenglykolu (PEG 6000) a chloridu sodného. Jako kontrola izolace byla použita DNA izolovaná metodou fenolové extrakce.

PCR byla rovněž použita k analýze 7 kmenů Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora (CCDM). U těchto kmenů bylo subdruhově specifickou PCR prokázáno zařazení 5 kmenů do poddruhu *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a 2 kmenů do poddruhu *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*.

Klíčová slova: polymerázová řetězová reakce, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, izolace DNA, magnetické nosiče, tvrdé sýry, sbírkové kmeny

ABSTRACT

Diploma thesis was focused on identification of lactic acid bacteria of species *Lactococcus lactis* and subspecies *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* using species and subspecies specific polymerase chain reaction (PCR).

PCR method was used for identification of bacteria of species *Lactococcus lactis* in 10 samples of hard cheeses. The method of sample preparation was evaluated for hard cheeses with the aim to receive sufficient amount of cells for the preparation of crude cell lysates. Whole DNA in quality suitable for PCR was separated using magnetic microspheres P(HEMA-co-GMA) in the presence of polyethylenglycol (PEG 6000) and sodium chloride. DNA isolated by phenol extraction was used as control of DNA isolation.

PCR was used to the analysis of 7 strains of *Lactococcus lactis* from Collection of dairy microorganisms Laktoflora (CCDM). Altogether 5 or 2 strains were identified into subspecies *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, respectively.

Keywords: polymerase chain reaction, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, DNA isolation, magnetic microspheres, hard cheeses, collection strains

HERZOGOVÁ, J., *Identifikace bakterií mléčného kvašení v tvrdých sýrech využitím amplifikačních metod*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 82 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

Prohlášení

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce paní doc. RNDr. Aleně Španové, CSc. za její odporné rady, konzultace a čas, který mi věnovala. Nemalý dík patří také mým rodičům a přátelům za jejich podporu a trpělivost.

OBSAH

1. ÚVOD.....	9
1.1 Rod <i>Lactococcus</i>	10
1.2 Charakteristika druhu <i>Lactococcus lactis</i>	10
1.2.1 Významní zástupci druhu <i>Lactococcus lactis</i>	10
1.2.1.1 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	10
1.2.1.2 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	11
1.2.1.3 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>hordinae</i>	11
1.2.2 Metabolismus sacharidů.....	11
1.2.3 Produkce bakteriocinů.....	12
1.2.4 Genom <i>Lactococcus lactis</i>	13
1.2.5 Využití bakterií <i>Lactococcus lactis</i> v potravinářském průmyslu.....	13
1.3 Amplifikační techniky	14
1.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	14
1.3.1.1 Princip metody	14
1.3.1.2 Reakční podmínky	16
1.3.1.3 Inhibitory PCR.....	17
1.3.1.4 Látky zvyšující účinek PCR.....	18
1.3.1.5 Využití PCR	18
1.3.2 Magnetické nosiče.....	18
1.3.3 Detekce PCR produktu.....	19
2. CÍL PRÁCE.....	20
3. MATERIÁL A METODY.....	21
3.1 Bakteriální kultury	21
3.2 Chemikálie	21
3.2.1 Chemikálie z komerční sítě.....	21
3.3 Kultivační média.....	22
3.4 Roztoky	22
3.4.1 Roztoky pro lyzi buněk, izolaci a purifikaci bakteriální DNA	22
3.4.2 Roztoky pro izolaci DNA pomocí magnetického nosiče.....	23
3.4.3 Magnetické částice Fkol77ox.....	24
3.4.4 Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu.....	24
3.4.5 Komponenty pro polymerázovou řetězovou reakci	24
3.5 Vzorky sýrů.....	25

3.6 Přístroje a pomůcky	25
3.7 Metody	26
3.7.1 Kultivace a kontrola čistoty bakteriální kultury	26
3.7.1.1 Kultivace bakterií <i>Lactococcus lactis</i>	26
3.7.1.2 Kontrola čistoty bakteriální kultury	26
3.7.2 Příprava hrubých lyzátů buněk	26
3.7.2.1 Příprava hrubých lyzátů buněk bakterií <i>Lactococcus lactis</i>	26
3.7.3 Izolace a purifikace bakteriální DNA	27
3.7.3.1 Izolace a purifikace bakteriální DNA metodou fenolové extrakce	27
3.7.3.2 Přesrážení DNA ethanolem	27
3.7.3.3 Izolace a purifikace bakteriální DNA pomocí magnetického nosiče	27
3.7.4 Stanovení koncentrace DNA	28
3.7.4.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA	28
3.7.4.2 Fluorometrické stanovení koncentrace DNA dle návodu výrobce	28
3.7.5 Gelová elektroforéza bakteriální DNA	29
3.7.5.1 Příprava hmotnostních standardů DNA	29
3.7.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	29
3.7.6.1 Příprava PCR směsi	29
3.7.6.1.1 Příprava PPP Master Mixů	30
3.7.6.2 PCR s primery PALA 4 a PALA 14	30
3.7.6.3 PCR s použitím primerů 27f a Lla	31
3.7.6.4 PCR s použitím DNA matrice získané z 1 bakteriální kolonie	31
3.7.6.5 Agarózová gelová elektroforéza a detekce PCR produktů	32
4. VÝSLEDKY	33
4.1 Příprava pozitivní kontroly DNA pro PCR reakci	33
4.1.1 Kultivace a příprava hrubých lyzátů buněk typových kmenů	33
4.1.1.1 Kultivace bakterií	33
4.1.1.2 Příprava hrubých lyzátů buněk	33
4.1.2 Izolace a purifikace bakteriální DNA typových kmenů <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CCM 1877 ^T a <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> CCM 7414 ^T	34
4.1.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA typových kmenů	35
4.1.4 PCR typových kmenů <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CCM 1877 ^T a <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> CCM 7414 ^T	35
4.1.4.1 PCR s použitím primerů PALA 4 a PALA 14 k identifikaci typových kmenů bakterií druhu <i>Lactococcus lactis</i> a stanovení citlivosti reakce	35

4.1.4.2 PCR s použitím primerů 27 f a Lla k identifikaci bakterií <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CCM 1877 ^T a stanovení citlivosti reakce	38
4.2 Identifikace bakterií druhu <i>Lactococcus lactis</i> v tvrdých sýrech	40
4.2.1 Výběr vzorků sýrů.....	40
4.2.2 Optimalizace přípravy hrubých lyzátů buněk ze vzorků sýrů.....	40
4.2.2.1 Příprava hrubých lyzátů buněk z 1,5 ml filtrátu vzorků sýrů	41
4.2.2.2 Příprava hrubých lyzátů buněk ze 3 ml filtrátu vzorků sýrů.....	42
4.2.3 Izolace DNA z tvrdých sýrů metodou fenolové extrakce a pomocí magnetického nosiče.....	42
4.2.3.1 DNA izolovaná ze vzorků tvrdých sýrů č. 1 – 10 metodou fenolové extrakce	42
4.2.3.2 Separace DNA ze vzorků tvrdých sýrů č. 1 – 10 pomocí magnetického nosiče	45
4.2.4 Stanovení koncentrace DNA získané ze vzorků sýrů č. 1 – 10 fenolovou extrakcí a pomocí magnetického nosiče	49
4.2.4.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA získané ze vzorků sýrů fenolovou extrakcí.....	49
4.2.4.2 Fluorometrické stanovení koncentrace DNA získaných ze vzorků sýrů č. 1 – 10 separací pomocí magnetického nosiče	50
4.2.5 PCR s použitím primerů PALA 4 a PALA 14 a DNA izolované ze vzorků sýrů č. 1 - 10.....	50
4.2.5.1 PCR s použitím DNA matrice izolované ze vzorků tvrdých sýrů fenolovou extrakcí.....	50
4.2.5.1.1 PCR s použitím 1 µl DNA matrice získané fenolovou extrakcí z 1,5 ml a ze 3 ml filtrátu vzorků sýrů č. 1 - 10	51
4.2.5.1.2 PCR s použitím 3 µl DNA matrice získané fenolovou extrakcí z 1,5 ml a ze 3 ml filtrátu vzorků sýrů č. 1 - 10	53
4.2.5.2 PCR s použitím DNA matrice izolované ze vzorků sýrů pomocí magnetického nosiče	55
4.2.5.2.1 PCR s použitím 1 µl DNA matrice získané ze vzorků sýrů č. 1 - 10 pomocí magnetického nosiče	55
4.2.5.2.2 PCR s použitím 3 µl DNA matrice získané ze vzorků sýrů č. 1 – 10 pomocí magnetického nosiče	57
4.2.6 PCR s použitím primerů 27f a Lla a DNA izolované ze vzorků sýrů č. 1 - 10....	59
4.2.6.1 PCR s použitím DNA matrice izolované ze vzorků tvrdých sýrů fenolovou extrakcí.....	59
4.2.6.2 PCR s použitím DNA matrice izolované ze vzorků tvrdých sýrů pomocí magnetického nosiče	62
4.2.7 Shrnutí výsledků amplifikace DNA izolované ze vzorků sýrů.....	64

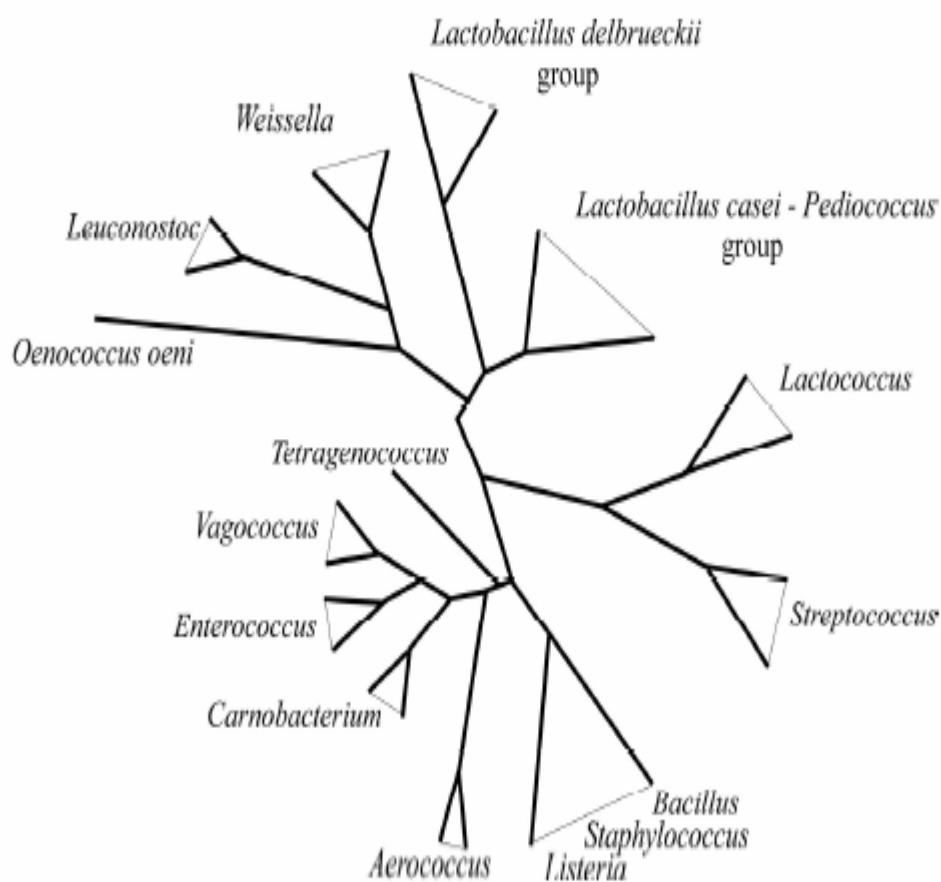
4.3 Taxonomické zařazení 7 kmenů <i>Lactococcus lactis</i>	66
4.3.1 Kultivace, ověření čistoty kultury a příprava hrubých lyzátů buněk kmenů <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	66
4.3.2 Izolace a purifikace bakteriální DNA metodou fenolové extrakce a pomocí magnetického nosiče	66
4.3.2.1 Izolace DNA 7 kmenů <i>Lactococcus lactis</i> fenolovou extrakcí.....	66
4.3.2.2 Izolace DNA pomocí magnetického nosiče.....	67
4.3.3 Stanovení koncentrace DNA kmenů <i>Lactococcus lactis</i>	69
4.3.3.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA izolované fenolovou extrakcí.....	69
4.3.3.2 Fluorometrické stanovení koncentrace DNA v eluátech vzorků z magnetických nosičů	69
4.3.4. PCR s použitím primerů PALA 4 a PALA 14	70
4.3.4.1 PCR s použitím DNA matrice vyizolované metodou fenolové extrakce	70
4.3.4.2 PCR s použitím DNA matrice vyizolované pomocí magnetických nosičů ...	71
4.3.4.3 PCR s použitím DNA matrice z buněk 1 bakteriální kolonie.....	72
4.3.5 PCR s použitím primerů 27f a Lla	73
4.3.5.1 PCR s použitím DNA matrice vyizolované metodou fenolové extrakce	73
4.3.5.2 PCR s použitím DNA matrice vyizolované pomocí magnetických nosičů ...	74
4.3.5.3 PCR s použitím DNA matrice z buněk 1 bakteriální kolonie.....	75
4.3.6 Shrnutí výsledků PCR 7 kmenů <i>Lactococcus lactis</i> a jejich taxonomické zařazení do poddruhů <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> a <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	76
5. DISKUZE.....	77
6. ZÁVĚR.....	79
9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	80

1. ÚVOD

Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou využívány po mnoho staletí při fermentaci mléčných potravinářských výrobků. [1]

BMK kvašení jsou metabolicky a fyziologicky příbuzná skupina grampozitivních bakterií. Typické BMK jsou nesporegenní, nerespirující, aerotolerantní a striktně fermentativní koky nebo tyčky. Hlavním konečným produktem metabolismu BMK je kyselina mléčná.

BMK zahrnují asi 20 rodů, z nichž za nejdůležitější jsou považovány rody přítomné v potravinách, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* a *Weissella*. Fylogenetický strom skupiny BMK je uveden na Obr. č. 1. Tyto bakterie jsou fylogeneticky zahrnuty do větve *Clostridií*. [2]



Obr. č. 1: Schématický fylogenetický strom BMK založený na sekvenci genu pro 16rRNA. Pro srovnání jsou uvedeny některé aerobní a fakultativně anaerobní grampozitivní bakterie z větve *Clostridium*. Evoluční vzdálenosti jsou přibližné. (upraveno dle Axelsson, 2004) [2]

1.1 Rod *Lactococcus*

Rod *Lactococcus* patří mezi nejvýznamnější zástupce BMK. Jde o grampozitivní, mikroaerofilní, nepohyblivé koky s homofermentativním typem metabolismu glukózy. Při fermentaci glukózy vzniká hlavně kyselina mléčná v L (+) formě. [3]

Rod *Lactococcus* obsahuje druhy *L. lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris* a *L. lactis* ssp. *hordinae*. [4]

Tyto bakterie bylo poprvé izolovány z mléka J. Listerem v roce 1873, který je nazval „*Bacterium lactis*“. Později byl pro tyto bakterie navržen nový název *Streptococcus*. [5] Během 80. let byl rod *Streptococcus* rozdělen na tři rody *Enterococcus*, *Lactococcus* a *Streptococcus*. [6] V roce 1985 Schleifer a kol. reklasifikoval zástupce rodu *Lactococcus*. [7] Nyní je známo pět druhů rodu *Lactococcus*, *L. garviae*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis* a *L. lactis*. [3]

1.2 Charakteristika druhu *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis je primární modelový organismus BMK a je široce užíván v produkci fermentovaných mléčných produktů. [7] Poddruhy *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* se běžně vyskytují na rostlinném materiálu. *L. lactis* ssp. *lactis* a *L. lactis* ssp. *cremoris* jsou obsaženy v surovém mléce. [8] *L. lactis* jako původce infekčních onemocnění byl popsán jen ve vyjimečných případech u lidí se sníženou imunitou organismu. [9] *L. lactis* je považován za zcela bezpečný organismus. [10]

1.2.1 Významní zástupci druhu *Lactococcus lactis*

Druh *Lactococcus lactis* obsahuje 3 poddruhy. V potravinářském průmyslu jsou nejvýznamnější poddruhy *L. lactis* ssp. *lactis* a *L. lactis* ssp. *cremoris*. [4]

1.2.1.1 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*

Jedná se o grampozitivní bakterie vejcovitého tvaru o průměru 0,5 až 1 µm. Buňky se tvoří většinou v párech anebo krátkých řetízcích. Patří do serologické skupiny N.

Roste v rozmezí teplot 10 až 40 °C. Optimální teplota pro růst mikroorganismů a tvorbu kyseliny mléčné je 30 °C, při této teplotě je dosaženo pH 4,5–4.

Dobře roste v 4% NaCl, ale nesnáší 6,5% NaCl. V mléku roste s obsahem 0,3 % methylenové modře a v bujónu se 40% žlučí.

Pro růst v syntetickém médiu vyžaduje vitamíny skupiny B a aminokyseliny. Homofermentativně fermentuje glukózu, laktózu a maltózu na kyselinu mléčnou. Sacharózu fermentují jen některé druhy. Tvoří amoniak z argininu. Sráží lakmusové mléko a okyseluje ho, lakmus redukuje ještě před srážením. [4]

1.2.1.2 *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*

Má podobné vlastnosti jako *L. lactis* ssp. *lactis*. Tvoří buňky o průměru 0,6 až 1,0 µm tvaru dlouhých řetízků. Patří do serologické skupiny N. Jeho optimální teplota růstu je 28 °C. Ještě roste v médiu s obsahem 2 % NaCl, při 10 °C a nižších teplotách a za přítomnosti 40% žluče. Neroste při 40 °C a v bujónu se 4 % NaCl a při pH 9,2. V 4% roztoku peptonu neuvolňuje amoniak.

Fermentuje glukózu a laktózu. Z argininu netvoří amoniak. Kasein nepatrně peptonizuje, sráží lakmusové mléko (ještě před tím však zcela redukuje lakmus).

Kromě kyseliny mléčné mohou vznikat i vedlejší metabolity jako aceton, ethanol, diacetyl a jiné produkty. Tvorba oxidu uhličitého je proměnlivá.

Odlišnosti od *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* jsou zejména: nižší optimální teplotou růstu a tvorba měřitelného množství oxidu uhličitého. Laktózu fermentuje pomaleji (viz Tab. č. 1). [4]

Tab. č. 1: Rozdíly mezi poddruhy *Lactococcus lactis* (podle Bergeye (1986), upraveno)

Vlastnosti	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>
Růst při 10 °C	+	+
Růst při 40 °C	+	-
Růst při 45 °C	-	-
Růst při pH 9,2	+	-
Růst při 4 % NaCl	+	-
Tvorba amoniaku z argininu	+	-
Růst při 40 % žluči	+	+
Růst při 0,3 % methylové modři	+	-
Tvorba CO ₂	-	±
Hemolýza	-	-
Serologická skupina	N	N

1.2.1.3 *Lactococcus lactis* ssp. *hordinae*

Byl izolován z rostlinného materiálu a není v potravinářském průmyslu příliš využíván. [3]

1.2.2 Metabolismus sacharidů

BMK fermentují hexósy podle třech hlavních metabolických drah – glykolýza, 6-fosfoglukonátová dráha a bifidová dráha. [4] BMK jsou důležité mikroorganismy produkující hlavně L(+) formu kyseliny mléčné z cukru. Podle fermentace glukózy rozdělujeme tyto bakterie na homofermentativní a heterofermentativní. [3]

Homofermentativní bakterie jako *Lactococcus* a *Streptococcus* dávají dvě molekuly laktátu z jedné molekuly glukózy, zatímco heterofermentativní bakterie (*Leuconostoc* a *Weissella*) přemění molekulu glukózy na laktát, ethanol a oxid uhličitý. [11] Schématické znázornění metabolismu glukózy u *L. lactis* je uvedeno na Obr. č. 2.

založen na spontánní fermentaci. Průmyslová fermentace nyní úmyslně přidává BMK jako startovací kultury do potravinové matrice a za optimálních fyzikálních a chemických podmínek může být produkováno mnohem větší množství bakteriocinů. [13]

Bakteriociny jsou malé ribozomálně syntetizované peptidy. Snižují permeabilitu cytoplazmatické membrány u grampozitivních bakterií, dochází tak ke ztrátě membránového potenciálu a úniku životně důležitých molekul. [14]

Bakteriociny můžeme rozdělit do třech skupiny: [13]

- a) lantibiotika – malé, teplotně stabilní, lanthionin obsahující peptidy
- b) malé peptidové bakteriociny – teplotně stabilní, neobsahují lanthionin; zahrnují pediocin nebo bakteriociny aktivní proti bakteriím *Listeria*, dvou peptidové bakteriociny a kruhové bakteriociny.
- c) velké teplotně labilní peptidové bakteriociny

Bakteriociny inhibují růst nežádoucích a patogenních grampozitivních bakterií jako jsou např. *Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* aj. [14] Druh *L. lactis* produkuje 3 typy antimikrobních látek – kyselinu mléčnou, diacetyl a bakteriociny. [3] Nejvýznamnější bakteriocinem je nisin patřící do skupiny lantibiotik, který je inhibitorem bakterií *Listeria monocytogenes*. Používá se jako přírodní konzervant mléčných a masových produktů. [15]

1.2.4 Genom *Lactococcus lactis*

Druh *L. lactis* byl intenzivně studován, protože je zde zájem průmyslu o tohoto zástupce BMK. Efektivita jejich užití je pak dána znalostí jejich metabolismu, fyziologie, genetiky a molekulární biologie. [16]

Kompletní genomová sekvence kmene *L. lactis* ssp. *lactis* IL 1403 byla popsána Bolotinem. Kruhový chromozom *L. lactis* ssp. *lactis* IL 1403 obsahuje 2 365 589 bp a průměrně 35,4 % obsahu G+C. V sekvenci bylo nalezeno 2 310 otevřených čtecích rámců (ORF) s průměrnou délkou 879 bp. 64,2 % těchto čtecích rámců má stanovenou biochemickou a biologickou roli. Zbývajících 15,7 % rámců nemá definovanou funkci, jsou považovány za specifické pro laktokoky. [16]

Rozsáhlejší znalosti genomové sekvence nám odhalují nové možnosti využití fermentačních schopností a aerobní respirace. Dávají možnost horizontálního přenesení informace z laktokoků na gramnegativní enterobakterie *Salmonella-Escherichia*. [16]

Nově získané informace o bakteriálním genomu a poznaných DNA sekvencích umožňuje nové využití BMK a jejich detekce. Díky těmto znalostem je možné konstruovat nové bakteriální kmeny pro výrobu fermentovaných potravin. [3]

1.2.5 Využití bakterií *Lactococcus lactis* v potravinářském průmyslu

Weigmann a Storch roku 1890 poprvé použili bakterií jako startovací kultury pro sýry a pro produkci kyselého mléka. [6]

Startovací kultury hrají klíčovou roli při udržení kvality mléčných produktů s ohledem na skladovatelnost, uchovávání a senzorickou kvalitu. Mají vliv na tvorbu aromatických sloučenin, exopolysacharidů a vývoj textury. [7]

V mlékárenském průmyslu se nejčastěji využívají mezofilní bakteriální druhy (*L.lactis* ssp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*) k výrobě kysaného mléka, tvarohu, všech druhů sýrů. Jejich optimální teplota je 28 °C až 30 °C pro tvorbu kyseliny a aromatických látek.

Sýry jsou připravovány srážením kaseinu pomocí syřidla, koagulačních činidel nebo kyseliny mléčné. Kyselina mléčná vzniká fermentací laktózy bakteriemi mléčného kvašení, které jsou přirozeně přítomné v surovém mléku nebo se cíleně přidávají jako čisté mikrobiální kultury. Proteolytické enzymy BMK rozkládají kasein na aminokyseliny. [4] Při zrání sýrů je důležitá produkce aromatických sloučenin z aminokyselin, které vytváří charakteristické aroma, konzistenci a chuť. [7]

1.3 Amplifikační techniky

V této diplomové práci byla použita amplifikační metoda polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction – PCR) k identifikaci bakterií mléčného kvašení druhu *Lactococcus lactis* a poddruhu *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*.

1.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce využívá in vitro enzymatickou syntézu k amplifikaci specifické sekvence DNA. PCR amplifikací může vzniknout až 100 miliónů kopií z jedné molekuly DNA během několika hodin. [17]

Metoda PCR byla vyvinuta Kary Mullisem, který za tento objev získal roku 1993 Nobelovu cenu za chemii. [18]

1.3.1.1 Princip metody

Amplifikace DNA probíhá třemi po sobě následujícími kroky závislými na teplotě. Tyto kroky tvoří cyklus, který se několikrát opakuje. [19]

K reakci jsou potřebné dva syntetické oligonukleotidové primery komplementární s hledanou cílovou sekvencí na obou vláknech DNA. [24] Stavebními kameny pro nově syntetizovanou DNA jsou deoxyribonukleotidy, jež jsou přítomny v reakčním pufru (komponenta PCR). [20+21]

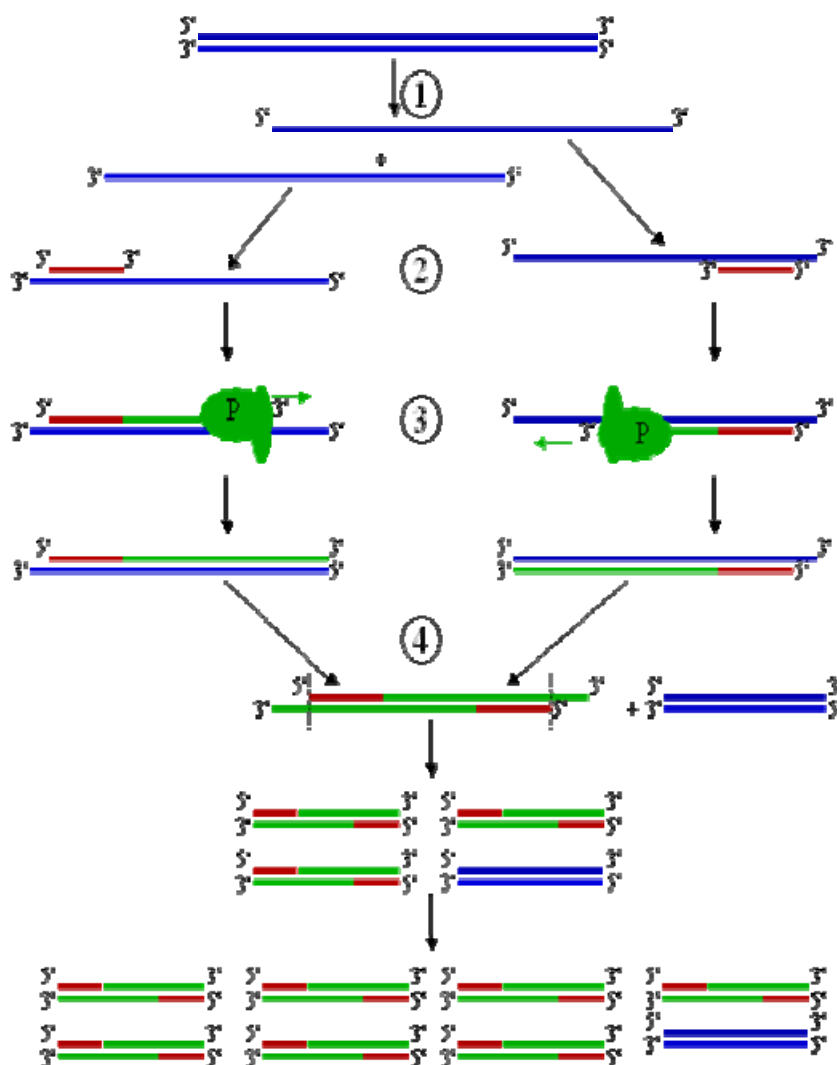
Nejprve dochází k denaturaci dvojvlákna DNA na dvě vlákna, následuje hybridizace primerů a syntéza nového řetězce DNA od 3'OH konce navázaného primeru. Reakci katalyzuje teplotně stabilní DNA-polymerasa. [21]

Celou analýzu vzorku lze pak rozdělit do tří kroků: [22]

1. Denaturace DNA – dvouvláknová DNA je zahřívána při 94 – 96 °C, dojde k porušení vodíkových vazeb a tím rozdělení na jednotlivá vlákna. Tento krok probíhá 0,5 – 2 minuty. V prvním kroku bývá prodloužen na 5 minut, aby došlo k úplnému oddělení vláken templátové DNA.
2. Připojení primerů – v tomto kroku dochází k ochlazení na teplotu 40 – 72 °C, dle použitých primerů. Na cílové sekvence denaturované DNA jsou pomocí komplementárního párování bází hybridizovány syntetické primery.

3. Syntéza vytvořeného vlákna DNA – zahřátí na 72 °C, syntetizuje se DNA enzymem DNA-polymerasa. Dosyntetizovaná vlákna znovu vytvoří dvouvlákna.

Schématické znázornění PCR cyklů je uvedeno na Obr. č. 3.



Obr. č. 3: Schématický znázornění prvních PCR cyklů: (1) Denaturace při teplotě okolo 95°C. (2) Připojení primerů při teplotě 40-72°C. (3) Syntéza DNA vlákna při 72°C (P=Polymerasa). (4) Kompletní první cyklus. Dvě výsledná vlákna DNA tvoří templát DNA pro následující cykly.[23]

V prvním cyklu PCR vznikne sekvence, která obsahuje vlákno z původní DNA a jedno nově nasyntetizované vlákno ohraničené sekvencí primeru. Sekvence z prvního cyklu je použita v dalším cyklu, kdy vznikají dvě vlákna. První vlákno obsahuje původní sekvenci DNA a nově nasyntetizované vlákno ohraničené sekvencí primeru a druhé vlákno, které je ohraničeno na obou koncích danými primery. Nasyntetizovaná sekvence s cílovou sekvencí z předchozího cyklu je vždy použita do následujícího cyklu.

Po ukončení všech cyklů PCR je vytvořeno několik milionů kopií původní cílové sekvence. Dochází k nahromadění specifických PCR produktů se sekvencemi lokalizovanými mezi dvěma primery. [24]

1.3.1.2 Reakční podmínky

PCR reakce probíhá v termocykleru, který nám zajišťuje optimální podmínky pro reakci jako je teplota a doba jednotlivých kroků, počet cyklů aj. [20] Je to v podstatě elektronicky řízený mikrotermostát pro velmi rychlé vyhřátí či ochlazení na tři teploty – pro denaturaci, pro hybridizaci primerů a pro replikaci. [21]

Objem reakční směsi se obvykle pohybuje v rozmezí od 20 do 100 μ l. [24]

Reakční směs se skládá:

- **DNA matrice** – jako vzorek lze použít DNA vyizolovanou z buněk, hrubý lyzát buněk, kolonie buněk, mikroskopické preparáty buněk aj. [24]
- **primery** – dva oligonukleotidy, jejichž sekvence odpovídá cílovým sekvencím určených k amplifikaci. Obvyklá délka primerů je asi 18 – 24 nukleotidů s obsahem guaninových a cytosinových bází asi 50 % a teplotou tání 55–80 °C. [21] Teplotu tání by měly mít oba primery podobné. Vyšší teplota zpravidla představuje vyšší specifiku reakce. Optimální koncentrace primerů je 0,1 – 0,6 μ M, vyšší koncentrace mohou vést ke vzniku nespecifických produktů. [26]

V této diplomové práci byly použity primery pro identifikaci bakterií druhu *Lactococcus lactis*: [27]

- PALA 4 – 5'-CTTCAACAGACAAGTCC-3'
- PALA 14 – 5'-GATAAATGATTCCAAGC-3'

Tyto primery umožňují amplifikaci fragmentu chromozomální DNA všech druhů *Lactococcus lactis* o velikosti 1 131 bp. Všechny druhy obsahují *acmA* gen, který kóduje laktokokální N-acetylmuramidázu. [27]

- 27f - 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
- Lla - 5'-CAGTCGGTACAAGTACCAAC-3'

S těmito primery se amplifikuje gen 16S rDNA o velikosti 87 bp pro DNA poddruhu *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. V případě poddruhu *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* nedochází k amplifikaci žádného fragmentu. [28]

- **DNA polymerasa** – dříve byla používána polymerasa získaná z *E. coli*, jelikož tato polymerasa denaturovala při 95 °C bylo nutné ji přidávat po každé denaturaci do reakční směsi. [21] Později došlo k použití termostabilní DNA polymerasy (*Taq* DNA polymerasa) získané z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, jejíž teplotní optimum růstu je okolo 75-80 °C. DNA polymerasa se používá v množství 0,01 - 0,05 U/ μ l. [24] Obvykle je použit enzym, který má 5' $\rightarrow$ 3' polymerasovou aktivitu a postrádá 3' $\rightarrow$ 5' exonukleasovou aktivitu. Enzym tedy není schopen opravit chyby, které vznikly při replikaci. [26] Nyní se používá rekombinantní *Taq* DNA polymerasa syntetizovaná v bunkách *E.coli*, do nichž je vložen gen kódující *Taq* polymerasu.

Kromě *Taq* DNA polymerasy se používá i *Tfl* DNA polymerasa pocházející z *Thermus flavus* nebo *Tth* polymerasa z *Thermus thermophilus*. [24] Enzymy *Pwo* a *Pfu*

DNA polymerasy, získané z *Pyrococcus woesei* a *Pyrococcus furiosus*, mají kromě polymerasové aktivity i exonukleasovou aktivitu $3' \rightarrow 5'$. [26]

- **dNTP** (deoxyribonukleosidtrifosfáty) – vodný roztok o pH 7,5, který obsahuje směs dATP, dCTP, dGTP, dTTP. [29] Optimální koncentrace je 200 μM pro každý nukleosid, které jsou stavebními kameny pro syntézu nové DNA. [30]
- **PCR reakční pufr** – vytváří prostředí a pH pro účinnou funkci DNA polymerasy. Reakční pufr obvykle obsahuje 10 mM Tris-HCl (pH 8,3-8,8), 50 mM KCl, a 1,5 mM Mg^{2+} . Může obsahovat ještě další složky. [22]
- **PCR voda** – jde o vodu o odporu 18 Mohm.cm, ultrafiltrovaná, působením diethylpyrokarbonátu a autoklávování z ní byly odstraněna RNázy.

1.3.1.3 Inhibitory PCR

Za falešně negativní výsledky při PCR jsou zodpovědné inhibitory, které jsou značným problémem při analýze reálných vzorků pomocí PCR. Inhibitory mohou ovlivňovat PCR několika způsoby např. vyvazují hořčnaté ionty nezbytné pro činnost DNA polymerasy, degradují cílové nukleové kyseliny, přímo inhibují DNA polymerasu. [3]

Inhibice PCR může být částečná nebo celková a může se projevit jako úplné selhání reakce (není detekován žádný PCR produkt) nebo snížení citlivosti detekce.

Inhibitory PCR můžeme rozdělit na extracelulární a intracelulární. Intracelulární inhibitory jsou přítomny uvnitř buněk (např. endogenní nukleasy, proteinasy, peptidy, polysacharidy). Extracelulární inhibitory se dělí podle původu na endogenní a exogenní. Endogenní inhibitory jsou kontaminanty komponent PCR a používaného materiálu (např. fenolové látky, SDS, enzymy aj.). Exogenní kontaminanty jsou různého původu. Zahrnují složky vzorků v potravinách nebo z životního prostředí. [31]

Podle mechanismu působení můžeme inhibitory rozdělit do tří skupin. [31] Toto rozdělení však není konečné, protože inhibitory mohou působit v závislosti na chemických, enzymatických a fyzikálních podmínkách.

1. Pro amplifikaci DNA je nutná dostatečná lyze buněk, čímž dojde k uvolnění nukleových kyselin. Při nedostatečné lyzi nedochází k uvolnění DNA a tím ani k amplifikaci. Proteolytické enzymy a denaturační činidla ve vzorcích mohou působit jako inhibitory tím, že degradují enzymy používané pro lyzi. První skupinu tedy tvoří **inhibitory zabraňující lyzi buněk nutné k uvolnění DNA**.
2. Druhou skupinu tvoří **inhibitory degradující cílové nukleové kyseliny**. K degradaci může dojít vlivem fyzikálních, chemických nebo enzymatických procesů. Primární struktura DNA se může narušit hlavně neenzymatickou hydrolýzou, methylací, oxidačním poškozením a enzymatickou degradací.
3. **Inaktivaci termostabilní nukleasy** může být způsobena interferencí s lytickými enzymy, které ovlivňují vazbu mezi cílovou DNA a polymerasou. Proteolytické enzymy a denaturační činidla mají vliv na polymerasu a proto musí být ihned po buněčné lyzi inaktivovány. Vytváření nebo denaturaci polymerasy mohou inhibovat zbytky organických látek po fenolové extrakci. Dále např. degradační produkty buněk, žlučové

kyseliny, soli žlučových kyseliny a další faktory. Důležitý je vhodný výběr polymerasy, která umožňuje amplifikaci nukleových kyseliny bez příliš komplikovaných specifických úprav vzorku před samotnou PCR reakcí.

Inhibitory v mléce

Výzkumy ukazují, že pravděpodobným inhibitorem je plazmin. Dalším inhibitorem je proteinasa přítomná v mléce, která je inaktivována při UHT úpravě mléka. Je-li však koncentrace mléka od 10 % do 1 % je dostatek mléčných proteinů, které slouží jako substrát pro proteinasu. Při koncentracích mléka nižších než 0,005 % není již dostatek substrátu a mléčné proteinasy začínají degradovat *Taq* polymerasu a tím inhibují PCR reakci. [33]

Další zdrojem inhibice jsou vápenaté kationy, které ovlivňují interakce mezi DNA, polymerasou a hořčnatými ionty. Vápenaté ionty se vážou místo hořčnatých iontů na DNA polymerasu a tím dochází k její inaktivaci. Inhibice může být odstraněna vyvázáním těchto iontů chelatačními činidly nebo zvýšením koncentrace hořčnatých iontů. [34]

1.3.1.4 Látky zvyšující účinek PCR

Kromě inhibitorů PCR byly popsány látky, které zvyšují účinek PCR (enhancery). Mezi tyto látky patří mimo jiné glycerol, $MgCl_2$ nebo Triton X-100. [32]

1.3.1.5 Využití PCR

PCR je součástí analytických metod a má široké uplatnění. V neposlední řadě metoda PCR umožňuje detekovat široké spektrum infekčních činitelů (agens). Je tedy možné s jejím využitím stanovit původce virových, bakteriálních, houbových nebo parazitárních onemocnění. Využití nachází zejména pro stanovení infekčního onemocnění s obtížným nebo dlouhodobým kultivačním průkazem agens (především zástupci rodu *Mycobacterium*, původci pohlavních nákaz - *Chlamydie*, *Neisserie*, atd.). V lékařské mikrobiologii, v onkologii, prenatální diagnostice ke zjištění vrozených metabolických poruch, k identifikaci DNA a určení příbuznosti v soudní medicíně, ve sledování postransplantačních stavů a farmakologickém průmyslu. [21+24]

V posledních letech nachází uplatnění i v potravinářském průmyslu např. při průkazu bakterií mléčného kvašení nebo při průkazu probiotických bakterií v mléčných výrobcích, potravinových doplncích či farmakologických preparátech. [24]

1.3.2 Magnetické nosiče

V současné době rostou požadavky na jednoduché, rychlé a účinné metody pro separaci DNA v kvalitě vhodné pro PCR. Při PCR reakci z reálných vzorků potravin může docházet k falešně negativním výsledkům, které jsou způsobeny přítomností inhibitorů. [35]

Klasické metody jsou časově náročnější, špatně se automatizují a je potřeba většího množství vzorku. Pozornost se zaměřuje na nové metody izolace DNA. Uplatnění zde nacházejí zejména magnetické nosiče. Nosiče můžeme rozdělit na anorganické (silikagelové nosiče, ferrity, magnetit aj.) a organické (celulóza, HEMA, dextran, polyvinylchlorid aj.). [3+35]

Nosič je syntetizován tak, aby byl chemicky stabilní, odolný vůči mikroorganismům a enzymové degradaci, nerozpustný ve vodě, hydrofilní, snadno manipulovatelný. Měl by mít dostatečně velký specifický povrch a počet skupin k navázání ligandu, nízkou cenu a neměl by interferovat v PCR. V biologických aplikacích se využívají supermagnetické nosiče, tzn. že magnetické vlastnosti jsou vykazovány jen v přítomnosti magnetického pole. Magnetické částice lze pak ze vzorku snadno odstranit pomocí magnetického separátoru. [36+37+38]

Neporézní nosiče na bázi ferritu, magnetitu a HEMA a GMA polymerů jsou připravovány disperzní polymerací 2-hydroxymethylakrylátu a ethylendimethakrylátu v přítomnosti magnetitu. Imunomagnetické částice byly použity Horákem a kol. (2001) na imobilizaci protilátek a enzymů částic poly(HEMA-co-EDMA). Při izolaci DNA našly uplatnění nosiče, jejichž povrch je pokryt –COOH skupinami. [35]

1.3.3 Detekce PCR produktu

Detekce PCR produktů je možná pomocí agarózové gelové elektroforézy. Nejnovější zařízení využívají spektrofotometrickou detekci interkalujícího barviva navázané sondy nebo detekce sondou emitované fluorescence. [25]

Dosud nejčastější metoda je vizualizace DNA fragmentů v agarózovém gelu pomocí barviva ethidium bromid (interkalární činidlo, karcinogen), které se včleňuje mezi báze dvoušrobovice DNA a pod UV světlem fluoreskuje. Elektroforetická separace probíhá v různě hustém agarózovém gelu.

Jednotlivé fragmenty DNA jsou děleny podle délky a jsou detekovány ve formě bandů. Velikost výsledného DNA fragmentu je pak porovnávána se standardem obsahujícím fragmenty o známé velikosti. [24] Důležitá je volba typu a koncentrace gelu pro správné rozdělení DNA fragmentů. Rozmezí molekulových hmotností DNA je uvedeno v Tabulce č. 2. [26]

Agaróza je součástí agaru, je to směs polysacharidů obsažených v mořských řasách. Hlavním polysacharidem je galaktan složený z jednotek galaktózy. Používá se pro přípravu gelů pro elektroforetické dělení biopolymerů. [24+26]

Tab. č. 2: Rozmezí molekulových hmotností DNA pro separaci v agarózovém gelu

Koncentrace agarózy (% w/v)	Molekulové hmotnosti lineárních molekul DNA (bp)
0,3	5 – 60
0,6	1 – 20
0,7	0,8 – 10
0,9	0,5 – 7
1,2	0,4 – 6
1,5	0,2 – 3
2,0	0,1 - 2

2. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo využití polymerázové řetězové reakce (PCR) k identifikaci bakterií druhu *Lactococcus lactis* a poddruhu *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* v tvrdých sýrech, včetně optimalizace přípravy vzorků sýrů pro izolaci DNA. DNA v kvalitě vhodné pro PCR byla izolována pomocí magnetických částic v přítomnosti polyethylenglykolu (PEG 6000) a chloridu sodného. Jako kontrola byla použita DNA izolovaná metodou fenolové extrakce.

Dalším cílem bylo ověření správnosti zařazení 7 kmenů *Lactococcus lactis* ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora (CCDM) do poddruhu *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* pomocí druhově a subdruhově specifické PCR. Jako kontrola byly použity typové kmeny z České sbírky mikroorganismů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Bakteriální kultury

Byly použity kmeny *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T. Kmeny byly získány ze České sbírky mikroorganismů (CCM). Dále byly použity kmeny *Lactococcus lactis* ze Sbírký mlékařských kultur Laktofora. Použité kmeny *Lactococcus lactis* jsou uvedeny v Tab. č. 3.
(^T typový kmen)

Tab. č. 3: Použité mikroorganismy druhu *Lactococcus lactis* Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora

<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 418/02
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> LC 416 Nip+
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 731/03 Nip +
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> HMM 4
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> S32
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 71/02
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 414/02

3.2 Chemikálie

3.2.1 Chemikálie z komerční sítě

Veškeré chemikálie byly v kvalitě p.a.

Agar (Lachema, Brno, ČR)

Agaróza pro gelovou elektroforézu (Serva, Heidelberg, SRN)

Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma, St. Louis, USA)

Ethanol pro UV (Lachema, Neratovice, ČR)

Ethidiumbromid (Sigma, St. Louis, USA)

Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)

Fenol (Serva, Heidelberg, SRN)

Hydroxid sodný (Lachema, Brno, ČR)

Chlorid sodný (Lachema, Neratovice, ČR)

Chloroform (Penta, Chrudim, ČR)

Izoamylalkohol (Lachema, Neratovice, ČR)

Kyselina boritá (Lachema, Neratovice, ČR)

Kity pro fluorometrické stanovení byly komerčně dodány firmou Invitrogen:

- o Quant-iT DNA High Sensitivity DNA Assay Kit (Q 33120) 0,2 ng – 100 ng ds DNA
- o Quant-iT DNA Broad-Range DNA Assay Kit (Q 33130) 2 ng – 1000 ng ds DNA
- o Quant-iT DNA HS reagent (in Kit Q 33120) nebo Quant-iT DNA BR reagent (in Kit Q 33130)
- o Quant-iT DNA HS buffer (in Kit Q 33120) nebo Quant-iT DNA BR buffer (in Kit Q 33130)
- o standard 0-10 ng/μl (in Kit 33120) nebo standard 0-100 ng/μl (in Kit Q33130)

Lysozym (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
Nanášecí pufr (Top Bio, Praha, ČR)
Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)
PCR vkladací pufr Red Load (Top Bio, Praha, ČR)
PCR vkladací pufr Yellow Load (Top Bio, Praha, ČR)
Proteináza K (Sigma, St. Louis, USA)
RNáza A (Sigma, St. Louis, USA)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan Tris –base (Penta, Chrudim, ČR)
DNA standard (Malamité, Moravské Prusy, ČR; velikost fragmentů 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500 bp)

3.3. Kultivační média

- **MRS agar s 0,5 % glukózy**

MRS médium bylo připraveno dle návodu dodavatele a pH bylo upraveno na 6,5. Byl přidán agar (15 g/l) a roztok byl sterilizován v autoklávu (121 °C, 20 min.). Po vysterilizování roztoku byla přidána glukóza ve výsledné koncentraci 5 g/l.

- **MRS médium s 0,5 % glukózy**

MRS médium bylo připraveno dle návodu dodavatele a pH bylo upraveno na 6,5. Roztok byl vysterilizován (121 °C, 20 min.). Po vysterilizování MRS média byla přidána glukóza ve výsledné koncentraci 5 g/l.

3.4 Roztoky

Pro ředění roztoků byla použita sterilní destilovaná voda.

Roztoky byly sterilizovány v autoklávu při 120 °C po dobu 15 min. (Dále uváděno: Roztok byl sterilizován).

3.4.1 Roztoky pro lyzi buněk, izolaci a purifikaci bakteriální DNA

- **Roztok A**

Ze zásobních roztoků bylo odebráno 1 ml 1M Tris HCl (pH 8,0) a 1 ml 0,5M EDTA (pH 8,0) a bylo přidáno 98 ml destilované vody. Roztok byl sterilizován.

- **Roztok B**

K roztoku A byl přidán lysozym v množství 3 mg/ml těsně před použitím.

- **10 % SDS**

10 g SDS bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody. pH bylo upraveno pomocí několika kapek HCl na 7,0. Celkový objem byl doplněn do 100 ml. Při vážení práškového SDS je nutno použít roušku na ústa.

- **Proteináza K**
Proteináza K byla rozpuštěna ve sterilní vodě a použita ve finální koncentraci 100 µg/ml, která byla uchovávána při -20 °C v alikvotech.
- **RNáza A**
Byla použita RNáza A naředěná v TE pufru na konečnou koncentraci 100 µg/ml. Roztok byl uchováván při -20 °C.
- **Fenol (pH 7,8)**
Byl použit destilovaný fenol o pH 7,8 nasycený v TE pufru.
- **CIZ**
Byla smíchána směs chloroformu a izoamylakoholu v poměru 24:1.
- **3 M octan sodný**
Byl použit 3M octan sodný o pH 5,2. Roztok byl sterilizován.
- **1 M Tris pH 8,0**
121,1 g Tris bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody. pH bylo upraveno pomocí koncentrované HCl na 8,0. Objem doplněn do 1 l a rozplněn do alikvotů. Roztok byl sterilizován.
- **0,5 M EDTA pH 8,0**
186,1 g EDTA bylo mícháním rozpuštěno v 800 ml destilované vody. pH bylo upraveno postupným přidáním asi 20 g NaOH, pH bylo sledováno po každém přidavku. EDTA je rozpuštěno při pH 8,0. Roztok byl doplněn do objemu 1 l, rozdělen do alikvotů a sterilizován.
- **1x TE pufr**
10 ml 1 M Tris (pH 8,0) a 5 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) bylo rozpuštěno v 985 ml destilované vody. Roztok byl rozdělen do alikvotů a sterilizován.
- **1 M NaOH**
40 g NaOH bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody, doplněno destilovanou vodou do 1 l, rozplněno do alikvotů a sterilizováno v autoklávu.

3.4.2 Roztoky pro izolaci DNA pomocí magnetického nosiče

- **5 M NaCl**
292,2 g NaCl bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody, doplněno destilovanou vodou do 1 l, rozplněno do alikvotů a sterilizováno.
- **PEG 40 % 6000**
40 g PEG 6000 bylo rozpuštěno v 60 ml sterilní destilované vody, doplněno sterilizovanou destilovanou vodou do 100 ml a sterilizováno. Roztok je uchováván při 4 °C.

- 70 % ethanol

Bylo smícháno 70 ml 96 % ethanolu a 26 ml destilované vody.

3.4.3 Magnetické částice Fkol77ox

Byly používány magnetické mikročástice poly(2-hydroxyethyl methakrylát-*co*-glycidyl methakrylát (P(HEMA-*co*-GMA)) (1/1,w/w). Magnetické částice Fkol77ox. $\equiv$ P(HEMA-*co*-GMA) 2,2 μ m/ 0,764 mmol –COOH/g byly připraveny disperzní kopolymerací 2-hydroxyethyl methakrylátu (HEMA) a glycidyl methakrylátu (GMA) v prostředí kolidní olejové kyseliny pokrývající povrch magnetitu Fe₃O₄. Hydroxylové skupiny na povrchu mikročástic byly oxidovány 2 % vodným roztokem manganistanu draselného v kyselém prostředí (2 mol/l H₂SO₄) na karboxylové skupiny. [35]

3.4.4 Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu

- 5x TBE pufr

54 g Tris base a 27,5 g kyseliny borité bylo rozpuštěno v 600 ml destilované vody, přidáno 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0). pH bylo upraveno pomocí 1M NaOH na 7,8. Roztok byl doplněn do 1 l, rozdělen do alikvotů a sterilizován v autoklávu. Před použitím byl roztok 10x zředěn destilovanou vodou.

- Barvicí lázeň s ethidium bromidem

100 μ l ethidium bromidu ze zásobního roztoku o koncentraci 5 mg/ml bylo přidáno k 500 ml sterilní destilované vody. Byla tak připravena lázeň k obarvení gelu o koncentraci 0,5 μ l/ml.

3.4.5 Komponenty pro polymerázovou řetězovou reakci

Všechny komponenty byly dodány od společnosti Top Bio, Praha.

Primery byly syntetizovány ve firmě Genera-Biotech, Hradec Králové.

- Voda pro PCR
- 10x reakční pufr kompletní (750 mM Tris-HCl, pH 8,8; 200 mM (NH₄)₂SO₄; 0,1% Tween 20; 25 mM MgCl₂)
- Směs dNTP (10 mM dATP,dCTP, dGTP, dTTP)
- Primery (10 pmol/ μ l): PALA4 a PALA14
27f a Lla

Sekvence primerů jsou uvedeny v kapitole 3.7.6.2 a 3.7.6.3.

- DNA polymerasa Top Bio 1.1 (1U/ μ l)
- DNA matrice (10 ng/ μ l)
- PPP Master Mix (150 mM Tris HCl, pH 8,8; 40 mM (NH₄)₂SO₄; 0,02% Tween 20; 5 mM MgCl₂; 400 μ M dATP; 400 μ M dCTP; 400 μ M dGTP; 400 μ M dTTP; 100 U/ml Taq Purple DNA polymerázy, stabilizátory, aditiva)

3. 5 Vzorky sýrů

Byly použity vzorky sýrů z komerční sítě. Název sýrů, výrobce a množství tuku v sušině jsou uvedeny v Tab. č. 4.

Tab. č. 4: *Vzorky sýrů z komerční sítě*

Název	Množství tuku v sušině (%)	Výrobce
Moravský bochník	45	Lactalis KS s.r.o Dřevěnice, ČR
Eidam plátky	30	Madeta a.s. České Budějovice, ČR
Eidam	40	Miltra Městečko Trnávka, ČR
Ramader volný	45	Tesco Brno, ČR
Šumava bloček	30	Lactalis KS s.r.o Dřevěnice, ČR
Zámecký sýr	45	Jaroměřická mlékárna Jaroměřice, ČR
Emmentaler plátky	40	Lactalis s.r.o Dřevěnice, ČR
Eidamský sýr	30	Moravia Lacto a.s. Jihlava, ČR
Polotvrdý sýr s oky	45	Hostex, Šumperk, ČR
Moravský bochník	45	Madeta a.s. České Budějovice, ČR

3.6 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy Sartorius typ A 200S (Gottlingen AG, SRN)

Centrifuga Eppendorf MiniSpin (Wesseling-Berzdorf, SRN)

Exikátor s pumpou typ N816.3KT.18 (KNF Neuberger, Freigurg, Germany)

Fluorometr Qubit™ (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornie)

Fotoaparát Polaroid DS 34 se žlutým filtrem (Polaroide, Cambridge, USA)

Laboratorní váhy KERN 440 (SRN)

Magnetický separátor (DynaL, Oslo, Norsko)

Mikropipety Pipetman o objemu 10 µl, 20 µl, 200 µl a 1000 µl (Gilson Medical Electronics S.A., Viliers-le-Bel, Francie)

Mikrovlnná trouba SMW 5020 (Sencor)

Minicentrifuga (National Labnet, Woodbridge, USA)

Spektrofotometr Spekol 1300 (Analytik Jena, Praha, ČR), kyvety

Termostat BT 120 (Laboratorní přístroje, Praha, ČR)

Termocykler typ Minicykler™ PTC-150 (MJ Research, Watertown, USA)

Termocykler typ PTC-200™ (MJ Research, Watertown, USA)

Transluminátor EB 20E (Ultra Lum, Paramount, USA)

Zařízení pro elektroforézu Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad lab., Richmond, USA)

Zařízení pro elektroforézu Easy-Část, model B1 (Owl Scientific, Woburn, USA)

Zdroj napětí pro elektroforézu Lightning Volt™ Power Supply, model OSP-300 (Owl Scientific, Woburn, USA)

Laboratorní sklo a materiál z plastu

3.7 Metody

Popsané postupy byly prováděny dle Španové a Ritticha (2002): Učební texty laboratorních cvičení Speciální metody analýzy mikroorganismů I; nepublikováno.

3.7.1 Kultivace a kontrola čistoty bakteriální kultury

3.7.1.1 Kultivace bakterií *Lactococcus lactis*

Bakteriální kultura narostlá v tekutém MRS médiu s 0,5 % glukózou (asi 1%) byla přeočkována do tekutého MRS média s 0,5 % glukózou. Kultivace probíhala při 30 °C po dobu 48 hodin. Po kultivaci byla provedena kontrola zákalu.

3.7.1.2 Kontrola čistoty bakteriální kultury

Bakteriální kultura narostlá v tekutém MRS médiu byla přeočkována na pevné MRS médium křížovým roztěrem a kultivována v termostatu při 30 °C po dobu 48 hodin. Po kultivaci byla provedena kontrola vzhledu a zbarvení jednotlivých kolonií a následně posouzena čistota kultury.

3.7.2 Příprava hrubých lyzátů buněk

3.7.2.1 Příprava hrubých lyzátů buněk bakterií *Lactococcus lactis*

- 1,5 ml kultury buněk narostlé v tekutém MRS médiu byl přenesen do zkumavky eppendorf. Suspenze byla centrifugována při 14 500 ot./3 min., poté byl slit supernatant a sediment nechán okapat.
- Získaný sediment byl rozsuspendován v 1 ml lyzačního roztoku A (viz 3.4.1) – nejprve bylo přidáno 100 µl roztoku a dokonale promícháno, pak bylo přidáno zbývajících množství 900 µl a suspenze opět byla promíchána.
- Suspenze byla centrifugována při 14 500 ot./3 min., po ukončení centrifugace byl supernatant opatrně slit, bylo přidáno 500 µl lyzačního roztoku B (viz 3.4.1) a vzorek byl dokonale rozsuspendován.
- Vzorky byly inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny za občasného promíchání.
- Po inkubaci bylo přidáno 25 µl 10% SDS a 5 µl proteinázyK (100 µg/ml) a promícháno. Vzorky byly inkubovány do dalšího dne při 55 °C.
- Další den bylo odebráno 20 µl hrubého lyzátu buněk do zkumavky eppendorf pro gelovou

elektroforézu. Pokud není vzorek ihned použit, je uchováván v lednici.

- Ke zbývajícimu vzorku hrubého lyzátu bylo přidáno 10 µl RNázy A (100 µg/ml), promícháno a inkubováno při 37 °C 30 minut.

Takto připravený vzorek byl vhodný pro izolaci a purifikaci DNA.

3.7.3 Izolace a purifikace bakteriální DNA

3.7.3.1 Izolace a purifikace bakteriální DNA metodou fenolové extrakce

- K hrubému lyzátu buněk byl přidán stejný objem fenolu jako je objem vzorku. Směs byla promíchána kývavým pohybem po dobu 4 minut (čas byl měřen) a centrifugována při 14 500 ot./3 min.
- Byla odebrána horní vrstva vzorku, která obsahovala DNA, do čisté zkumavky eppendorf. Nesměla být odebrána proteinová mezivrstva.
- K odebrané vodní fázi bylo přidáno 700 µl CIZ směsi, opatrně kývavým pohybem promícháno po dobu 4 minut a centrifugováno při 14 500 ot./3min.
- Vodní fáze byla odebrána do čisté zkumavky eppendorf.

3.7.3.2 Přesrážení DNA ethanolem

- Ke vzorku DNA byl přidán 3 M octan sodný v množství 1/10 objemu vzorku a směs byla promíchána.
- Byl přidán 1 ml 96% ethanolu a obsah promíchán.
- DNA byla ponechána vysrážet po dobu 15 minut při -20 °C.
- Po vysrážení DNA byla směs centrifugována při 14 500 ot./15 min. Supernatant byl opatrně slit a dále bylo pracováno se sedimentem.
- Sediment byl usušen v exikátoru asi 10 – 15 minut.
- Po usušení byla DNA rozpuštěna ve 500 µl TE pufru. Pro krátké uchování je vhodné skladování při 4 °C, pro dlouhodobé uchování je vhodnější při -20 °C.

3.7.3.3 Izolace a purifikace bakteriální DNA pomocí magnetického nosiče

- Separační směs připravená dle Tab. č. 5 byla promíchána a nechána inkubovat 15 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly částice s navázanou DNA odseparovány pomocí magnetu po dobu 15 minut při laboratorní teplotě.

Tab. č. 5: *Separační směs pro izolaci DNA magnetickým nosičem*

Pořadí komponent	Komponenta	Objem komponenty (µl)
1.	H ₂ O	200
2.	NaCl (5M)	400
3.	hrubý lyzát buněk *	100
4.	PEG 6000 (40%)	200
5.	Magnetické částice Fkol77ox. (2mg/ml)	100
Výsledný objem vzorku		1000

* hrubý lyzát byl připraven dle 3.7.2.

- Po separaci pomocí magnetu byl supernatant odpipetován nebo slit ze zkumavky a poté uvolněn magnet z magnetického pásu.
- Zkumavka obsahující magnetické nosiče s navázanou DNA byla promyta 70% ethanolem, v množství jaké měla separační směs. Částice byly separovány pomocí magnetu po dobu 2 minut při laboratorní teplotě.
- Po separaci byl supernatant odpipetován, magnet uvolněn. Zkumavky byly vysušeny při laboratorní teplotě nebo v termostatu po dobu 10 min při teplotě 55° C do odpaření ethanolu.
- Vysušená DNA byla eluována do stejného množství TE pufru jako bylo hrubého lyzátu v separační směsi, tj. 100 µl po dobu 30 minut při laboratorní teplotě.
- Částice byly odseparovány pomocí magnetu po dobu 2 minut při laboratorní teplotě. Eluovaná DNA (eluát) byla přepipetována do čisté mikrozukavky.

3.7.4 Stanovení koncentrace DNA

3.7.4.1. Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

- Roztok DNA byl 10x naředěn v TE pufru na celkový objem 500 µl. Obsah vzorku byl umístěn do spektrofotometrické kyvety o optické délce 1 cm. Jako referenční vzorek byl použit TE pufr.
- Kyvety byly umístěny do spektrofotometru a byla změřena absorbance při vlnové délce 260 nm, 280 a 310 nm.
- Z poměru absorbancí při 260 nm a 280 nm byla stanovena čistota vzorku DNA. Maximální absorbance DNA je při 260 nm a bílkovin při 280 nm. Poměr absorbancí čisté DNA je v rozmezí od 1,8 – 2,0. Obsahuje-li vzorek proteiny je poměr absorbancí nižší než 1,8, obsahuje-li vzorek RNA je poměr absorbancí naopak vyšší než 1,8.
- Koncentrace DNA byla vypočtena z hodnoty absorbance při 260 nm.
Hodnota $A_{[260\text{ nm}]}$ = 1 odpovídá koncentraci 50 µg/ml dvouřetězcové DNA.

3.7.4.2 Fluorometrické stanovení koncentrace DNA dle návodů výrobce

Pro fluorometrické stanovení koncentrace byly použity vzorky eluátů získané po separaci magnetickým nosičem vzorků. Byla zde příliš nízká koncentrace pro spektrofotometrické měření.

- Byl připraven pracovní roztok smícháním 199 µl reakčního pufru a 1 µl činidla. Podle počtu vzorků bylo připraveno dané množství.
- Z připraveného pracovního roztoku bylo odebráno 190 µl a přidáno 10 µl standardu o koncentraci 0 ng/ml do jedné mikrozukavky a 10 µl standardu o koncentraci 10 ng/ml do druhé mikrozukavky. Vzorky byl inkubovány po dobu 2 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl fluorometr kalibrován.
- Vzorky byly připraveny stejným způsobem jako standardy.
- Výpočet množství DNA ve vzorku:
 $\text{koncentrace DNA} = QF \text{ hodnota} \times (200/N)$

$QF \text{ hodnota}$ hodnota na fluorometru

N objem použitého vzorku

3.7.5 Gelová elektroforéza bakteriální DNA

- Byl připraven 0,8 % agarózový gel (0,8 g agarózy, 100 ml 0,5x TBE pufru), podrobný postup přípravy, průběhu elektroforézy a detekce bakteriální DNA viz níže kapitola 3.7.6.5
- Vzorky byly připraveny smícháním 10 µl purifikované DNA, 5 µl TE pufru a 3 µl nanášecího pufru a naneseny do komůrek. Pro detekci DNA v hrubých lyzátech buněk bylo použito 20 µl vzorku a 5 µl nanášecího pufru.
- Pro odhadnutí množství vyizolované DNA byly nanášeny do komůrek hmotnostní standardy DNA různých koncentrací viz kap. 3.7.5.1.

3.7.5.1 Příprava hmotnostních standardů DNA

Připravené hmotnostní standardy dle Tab. č. 6 byly použity pro gelovou elektroforézu a pro stanovení množství vyizolované DNA. Pro přípravu hmotnostních standardů byla použita purifikovaná DNA bakterií *Lactobacillus salivarius* o koncentraci 35 ng/µl (koncentrace stanovena spektrofotometricky z $A_{260\text{ nm}}$).

Tab. č. 6: Příprava hmotnostních standardů z DNA o koncentraci 35 ng/µl

Množství DNA (ng)	V _{DNA} (µl)	V _{TE-pufr} (µl)	V _{STOP pufru} (µl)
35	1	14	3
70	2	13	3
140	4	11	3
210	6	9	3

Podle intenzity těchto hmotnostních standardů na agarózovém gelu bylo odhadnuto množství vyizolované DNA v analyzovaném vzorku.

3.7.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Veškeré reakce probíhaly v přístroji termocykler a byly použity primery PALA 4 a PALA 14 k amplifikaci specifického fragmentu bakterií druhu *Lactococcus lactis* o velikosti 1 131 bp [27] a primery 27f a Lla k amplifikaci specifického fragmentu bakterií poddruhu *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. [28]

Primery 27f a Lla umožňují rozlišit poddruh *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (amplifikuje se PCR produkt o velikosti 87 bp) od poddruhu *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (neamplifikuje se žádný PCR produkt). [28]

3.7.6.1 Příprava PCR směsi

PCR směs byla připravována o celkovém objemu 25 µl. Jednotlivé komponenty byly před použitím krátce centrifugovány a zkontrolovány. Po každém přidání další složky byla směs důkladně promíchána.

Pro PCR byla také připravena pozitivní kontrola, kde jako DNA matrice byla použita DNA matrice typového kmene získaná metodou fenolové extrakce. Koncentrace DNA matrice pro pozitivní kontrolu je 10 ng/μl.

Jako negativní kontrola byla použita místo DNA matrice PCR voda. Tato kontrola slouží jako kontrola kontaminace PCR složek.

3.7.6.1.1 Příprava PPP Master Mixů

Pro reálné vzorky sýrů byl použit PPP Master Mix, byl připraven smícháním jednotlivých komponent viz Tab. č. 7 a před PCR reakcí byl vzorek krátce zcentrifugován. S použitím PPP Master Mixu nebylo nutné již přidávat vkladací pufr. Vzorky byly ihned použity pro gelovou elektroforézu.

Tab. č. 7: Příprava PCR směsi s použitím PPP Master Mixu

Komponenta	Objem (μl)
PPP Master Mix	12,5
5' primer	1
3' primer	1
DNA matrice	1
PCR voda	9,5

PPP Master Mix musí být 2x naředěn, aby byly dodrženy finální koncentrace.

Pro přípravu většího množství vzorku bylo smícháno určité množství PPP Master Mix, primerů a PCR vody. Příslušné množství této reakční směsi (24 μl) pak bylo rozpipetováno do alikvotů a smícháno s DNA matricí.

3.7.6.2 PCR s primery PALA 4 a PALA 14

Identifikace druhu *Lactococcus lactis* byla provedena s primery PALA 4 (5'-CTTCAACAGACAAGTCC-3') a PALA 14 (5'-GATAAATGATTCCAAGC-3'). PCR produkt získaný pomocí primerů PALA 4 a PALA 14 je u druhu *Lactococcus lactis* ampikon o velikosti 1 131 bp. [27] Složení PCR směsi je uvedeno v Tab. č. 8.

Tab. č. 8: Složení PCR směsi (25 μl) s primery PALA 4 a PALA 14

Pořadí	Komponenta	Množství (μl)
1	voda pro PCR	16,5
2	10x reakční pufr kompletní	2,5
3	směs dNTP (10 mM)	1
4	PALA 4 (10 pmol/μl)	1
5	PALA 14 (10 pmol/μl)	1
6	DNA polymeráza Top Bio 1.1 (1 U/ μl)	1
7	DNA matrice (10 ng/ μl)	1

Byl zvolen příslušný program pro bakterie druhu *Lactococcus lactis*. V našem případě byl použit program PALA4→PALA14, který probíhal v následujících krocích:

PALA4-PALA14: 1. počáteční denaturace 94 °C/5 min
 2. denaturace 94 °C/1 min
 3. připojení primerů 45 °C/1 min
 4. syntéza DNA 68 °C/2 min
 Kroky 2.-4. se opakují 30 cyklech. V posledním cyklu byla syntéza komplementárního řetězce DNA prodloužena na 10 min.

3.7.6.3 PCR s použitím primerů 27f a Lla

Primery 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') a Lla (5'-CAGTCGGTACAAGTACCAAC-3') umožňují v přítomnosti DNA *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* amplifikaci fragmentu o velikosti 87 bp. V přítomnosti *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* se neamplifikuje žádný fragment. [28] Složení PCR směsi viz Tab. č. 9.

Tab. č. 9: Složení PCR směsi (25 µl) s primery 27f a Lla

Pořadí	Komponenta	Množství (µl)
1	voda pro PCR	17,5
2	10x reakční pufr kompletní	2,5
3	směs dNTP (10mM)	1
4	primer 27f (10pmol/ µl)	1
5	primer Lla (10pmol/ µl)	1
6	DNA polymeráza Top Bio 1.1	1
7	DNA matrice (ng/ µl)	1

Byl použit program 27f-Lla, který probíhal v následujících krocích:

27f-LLA: 1. počáteční denaturace 94 °C/5 min
 2. denaturace 94 °C/30 s
 3. připojení primerů 55 °C/45 s
 4. syntéza DNA 72 °C/1 min
 Kroky 2.-4. se opakují 35 cyklech. V posledním cyklu je poslední krok syntézy DNA prodloužen na 3 minuty.

- Po ukončení PCR reakce došlo k ochlazení vzorků v termocykleru na teplotu 10 °C. Pokud nebyly vzorky použity hned pro agarózovou elektroforézu, byly uchovávány při – 20 °C.

3.7.6.4 PCR s použitím DNA matrice získané z 1 bakteriální kolonie

Jednotlivá kolonie narostlá na agarové misce byla sterilně odebrána kličkou do mikrozkuhavky s 20 µl sterilní vody a rozsuspendována. Směs byla povařena pomocí programu BOIL na cykleru, poté krátce zchlazena na ledu a zcentrifugována. Lyzát buněk je uchováván při – 20 °C.

3.7.6.5 Agarózová gelová elektroforéza a detekce PCR produktů

Pro detekci PCR produktů byl připraven gel o určité koncentraci viz Tab. č. 10.

Tab. č. 10: *Koncentrace agarózového gelu pro detekci PCR produktů*

PCR s použitím primerů	Velikost PCR produktu (bp)	Navážka agarózy (g) na 100 ml 0,5x TBE pufu	Koncentrace agarózového gelu (%)
PALA 4, PALA 14	1 131	1,5	1,5
27f, Lla	87	2,5	2,5

- Rozvařený gel byl promíchán a ihned nalit do vaničky s hřebínkem. Gel tuhl asi 1 hodinu při laboratorní teplotě. Pokud nebyl gel ihned použit, byl vložen do sáčku a uchováván v lednici.
- Vzorky byly připraveny smícháním 25 μ l PCR směsi a 5 μ l nanášecího pufu a nanесeny do komůrek.
- Do jedné z komůrek bylo nanесeno 5 μ l DNA standardu Malamité (100bp). Velikost fragmentů standardu byla 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 a 1500 bp.
- Vanička s gelem byla umístěna do aparatury a zalita 0,5x TBE pufrem. Gel byl alespoň 3 mm zalit TBE pufrem. Na aparatura byl zasunut kryt s kabely, které musí být správně zapojeny. DNA se pohybuje od záporného pólu ke kladnému. Byla spuštěna samotná elektroforéza, ta probíhala při napětí 10 V/1cm.
- Po uběhnutí vzorku do 2/3 gelu byla ukončena elektroforéza, kabely byly odpojeny a gel byl vyjmut z aparatury.
- Gel byl ponořen do barvicího roztoku s ethidium bromidem (0,5 μ g/ml) a ponechán v roztoku asi 1 hod.
- Po obarvení byl gel opláchnut v destilované vodě, umístěn pod UV-transluminátor (305 nm) a byla pozorována červeně fluoreskující DNA.
- Dokumentace byla prováděna fotografováním na film TT 667 kamerou CD 34.

4. VÝSLEDKY

4.1 Příprava pozitivní kontroly DNA pro PCR reakci

Pro přípravu pozitivní kontroly DNA byly použity typové kmeny *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T.

4.1.1 Kultivace a příprava hrubých lyzátů buněk typových kmenů

4.1.1.1 Kultivace bakterií

Buňky byly kultivovány v 0,9 ml tekutém MRS médiu obohaceném 0,5% glukózou. Kultivace byla provedena dle návodů 3.7.1.

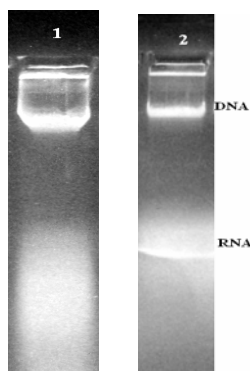
Po kultivaci byla provedena kontrola růstu jednotlivých kolonií přeočkováním na pevný MRS agar křížovým roztěrem.

⇒ Tekuté médium se zakalilo, kultura narostla. Na pevném agaru narostly jednotlivé kolonie stejného vzhledu a velikosti, kultura je čistá a vhodná pro další použití.

4.1.1.2 Příprava hrubých lyzátů buněk

Hrubé lyzáty buněk kmenů *Lactococcus lactis* byly získány dle kapitoly 3.7.2.

Lyze buněk a přítomnost DNA byla ověřena agarózovou gelovou elektroforézou, použitím 0,8% agarózového gelu (Obr. č. 4). Na gel bylo nanášeno 20 µl hrubých lyzátů buněk a 5 µl nanášecího pufu.



Běh č.	Hrubý lyzát buněk	Detekce DNA
1	<i>L.lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CCM 1877 ^T	+
2	<i>L.lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> CCM 7414 ^T	+

+ DNA detekována
- DNA nedetekována

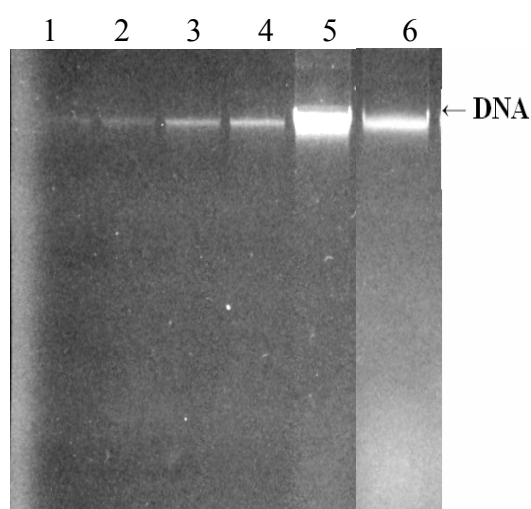
Obr. č. 4: Agarózová gelová elektroforéza hrubých lyzátů buněk typových kmenů *Lactococcus lactis*

⇒ Pomocí agarózové gelové elektroforézy byla ověřena přítomnost DNA ve vzorcích hrubých lyzátů buněk. Vzorky lze použít pro purifikaci DNA.

4.1.2 Izolace a purifikace bakteriální DNA typových kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T

Bakteriální DNA byla izolována z lyzátů buněk metodou fenolové extrakce a následně byla vyizolovaná DNA přesrážena ethanolem viz kapitola 3.7.3. Přítomnost a množství vyizolované DNA bylo ověřeno pomocí 0,8% agarózové gelové elektroforézy (Obr. č. 5).

Na gel bylo nanášeno 10 µl DNA, 5 µl TE pufru a 3 µl nanášecího pufru a hmotnostní standardy.



Běh č.	DNA (ng)	Detekce DNA (ng)	Poznámka
1	35	+	Hmotnostní standard
2	70	+	Hmotnostní standard
3	140	++	Hmotnostní standard
4	210	++	Hmotnostní standard
5	<i>L.lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CCM 1877 ^T	> 210	
6	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> CCM 7414 ^T	> 210	

+, ++, +++, +++++..... intenzita detekce DNA

- DNA nedetekována

Obr. č. 5: Agarózová gelová elektroforéza DNA typových kmenů *Lactococcus lactis* izolované metodou fenolové extrakce

- ⇒ Fenolovou extrakcí byla vyizolována DNA ze všech vzorků v množství větším než 210 ng/10 µl.
- ⇒ DNA byla relativně intaktní.

4.1.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA typových kmenů

U DNA izolované metodou fenolové extrakce byly spektrofotometricky změřeny hodnoty absorbance vzorků při 260 nm, 280 nm a 310 nm. Jako referenční vzorek byl použit TE pufr. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tab. č. 11.

Tab. č. 11: Spektrofotometrické stanovení absorbancí purifikované DNA typových kmenů druhu *Lactococcus lactis* izolované metodou fenolové extrakce

Purifikovaná DNA kmene	A (260 nm)	A (280nm)	A (310 nm)	A (260/280 nm)	c (ng/μl)
<i>L.lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CCM 1877 ^T	1,770	1,018	0,024	1,7	88,85
<i>L.lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> CCM 7414 ^T	2,301	1,553	0,031	1,5	115,05

⇒ Koncentrace DNA ve vzorcích po fenolové extrakci byla asi 89 ng/μl u kmene *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T a poměr A_{260}/A_{280} je 1,7. U kmene *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T byla koncentrace asi 115 ng/μl a poměr absorbancí A_{260}/A_{280} je 1,5.

4.1.4 PCR typových kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T

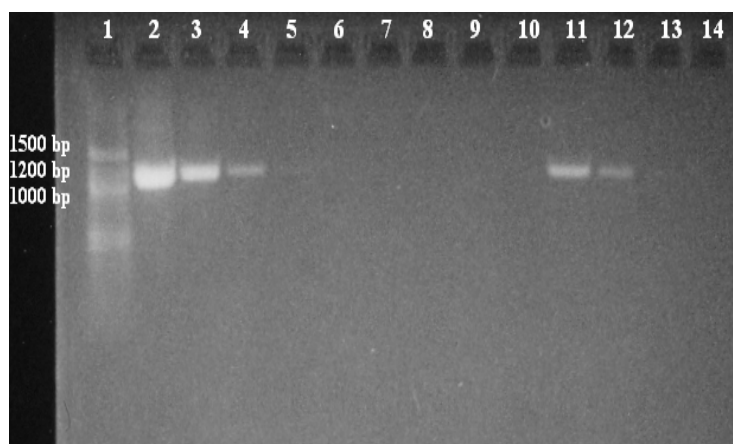
4.1.4.1 PCR s použitím primerů PALA 4 a PALA 14 k identifikaci typových kmenů bakterií druhu *Lactococcus lactis* a stanovení citlivosti reakce

Byla provedena amplifikace PCR fragmentu DNA dle kapitoly 3.7.6.2. PCR směs byla připravena dle kapitoly 3.7.6.1.

Do PCR směsi byla použita purifikovaná DNA kmene *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T o různé koncentraci. Jako kontrola kontaminace složek PCR směsi byla místo DNA matrice v PCR směsi použita voda.

Detekce PCR produktu kmene *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T byla ověřena agarózovou gelovou elektroforézou na 1,2% gelu. Výsledky jsou uvedeny na Obr. č. 6.

PCR produkt kmene *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T byl detekován na 1,2% gelu. Detekce PCR produktu je na Obr. č. 7.



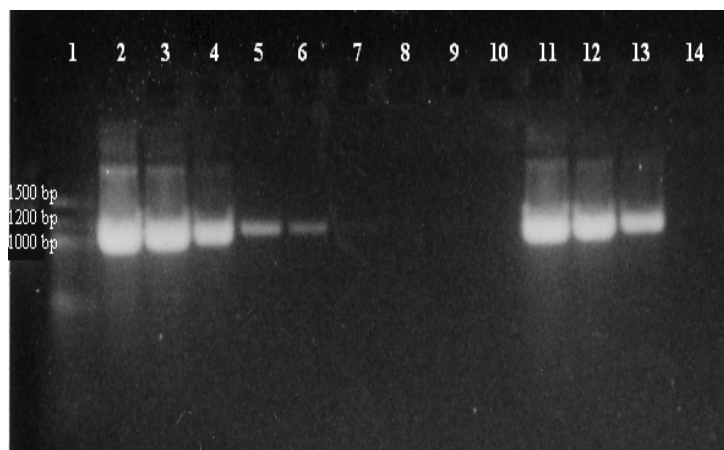
Běh č.	Množství DNA <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CCM 1877 ^T / PCR směs	Detekce PCR produktu
1	standard	100bp žebříček
2	neředěná DNA (88,85 ng)	+++
3	10 ng	++
4	1 ng	++
5	100 pg	+
6	10 pg	-
7	1 pg	-
8	100 fg	-
9	10 fg	-
10	1 fg	-
11	8,85 ng	++
12	0,89 ng	+
13	0,09 ng	-
14	NK	-

+, ++, +++..... intenzita detekce PCR produktu

-PCR produkt nedetekován

NK.....negativní kontrola

Obr. č. 6: Detekce PCR produktů (1 131 bp) amplifikovaných z různého množství DNA kmene *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T



Běh č.	Množství DNA <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> CCM 7414 ^T / PCR směs	Detekce PCR produktu
1	standard	100bp žebříček
2	neředěná DNA (115,05 ng)	+++
3	10 ng	+++
4	1 ng	++
5	100 pg	+
6	10 pg	+
7	1 pg	-
8	100 fg	-
9	10 fg	-
10	1 fg	-
11	11,51 ng	+++
12	1,15ng	++
13	0,12 ng	++
14	NK	-

+, ++, +++..... intenzita detekce PCR produktu

-PCR produkt nedetekována

NK.....negativní kontrola

Obr. č. 7: Detekce PCR produktu (1 131 bp) získaných amplifikací různého množství DNA kmene *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T s druhově specifickými primery

- ⇒ Byla amplifikován specifický fragment o velikosti 1 131 bp s DNA kmene *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T a s DNA *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T.
- ⇒ Je možné detekovat PCR produkt po amplifikaci DNA kmene *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T v PCR směsi obsahující 100 pg DNA. U kmene *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T bylo nejnížší množství DNA v PCR směsi dávající PCR produkt 10 pg.

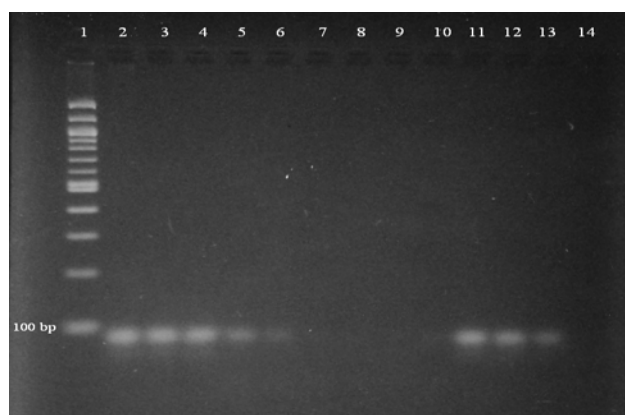
4.1.4.2 PCR s použitím primerů 27 f a Lla k identifikaci bakterií *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T a stanovení citlivosti reakce

Byla provedena amplifikace DNA a detekce PCR produktu o velikosti 87 bp specifických pro kmen *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T dle programu 27f – Lla viz kap. 3.7.6.3.

PCR směs byla připravena dle kapitoly 3.7.6.1.

Detekce PCR produktu byla ověřena agarózovou gelovou elektroforézou. Výsledky jsou uvedeny na Obr. č. 8 pro kmen *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T a Obr. č. 9 pro kmen *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T.

Na gel bylo nanášeno 10 µl PCR produktu a 2 µl nanášecího pufu.



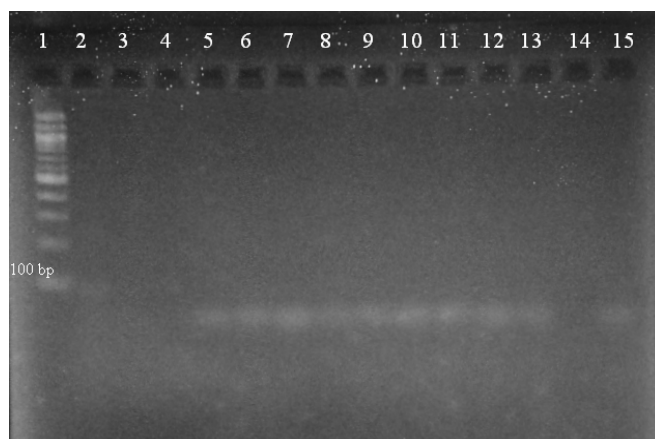
Běh č.	Množství DNA <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CCM 1877 ^T / PCR směs	Detekce PCR produktu
1	standard	100bp žebříček
2	neředěná DNA (88,85 ng)	+++
3	10 ng	+++
4	1 ng	+++
5	100 pg	+
6	10 pg	+
7	1 pg	-
8	100 fg	-
9	10 fg	-
10	1 fg	-
11	8,85 ng	+++
12	0,89 ng	++
13	0,09 ng	+
14	NK	-

+, ++, +++..... intenzita detekce PCR produktu

-PCR produkt nedetekován

NK.....negativní kontrola

Obr. č. 8: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů (87 bp) získaných amplifikací DNA *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T s primery 27f a Lla



Běh č.	Množství DNA <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> CCM 7414 ^T / PCR směs	Detekce PCR produktu
1	standard	100bp žebříček
2	neředěná DNA (115,05 ng)	-
3	10 ng	-
4	1 ng	-
5	100 pg	-
6	10 pg	-
7	1 pg	-
8	100 fg	-
9	10 fg	-
10	1 fg	-
11	11,51 ng	-
12	1,15ng	-
13	0,12 ng	-
14	NK	-

+, ++, +++..... intenzita detekce PCR produktu

-PCR produkt nedetekována

NK.....negativní kontrola

Obr. č. 9: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů získaných amplifikací DNA kmene *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T s primery 27f a Lla

- ⇒ Byl amplifikován specifický PCR produkt s DNA *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T o velikosti 87 bp. Nejnižší množství DNA, které se amplifikuje pomocí PCR je 10 pg DNA.
- ⇒ U kmene *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T nebyl amplifikován žádný specifický PCR produkt.
- ⇒ Pomocí těchto primerů lze odlišit tyto dva kmeny.

4.2 Identifikace bakterií druhu *Lactococcus lactis* v tvrdých sýrech

4.2.1 Výběr vzorků sýrů

Bylo použito 10 vzorků sýrů z komerční sítě od různých výrobců a s různým množstvím tuku. Název sýrů, výrobce a číselné značení vzorků je uvedeno v Tab. č. 12. V další části práce bylo používáno označení vzorků sýrů č. 1 – 10.

Tab. č. 12: *Typy sýrů použité k identifikaci bakterií druhu *Lactococcus lactis**

Vzorek č.	Název	Výrobce
1	Moravský bochník, 45%t.v.š	Lactalis KS s.r.o Dřevěnice, ČR
2	Eidam plátky, 30%	Madeta a.s. České Budějovice, ČR
3	Eidam, 40%	Miltra Městečko Trnávka, ČR
4	Ramader volný, 45%	Tesco Brno, ČR
5	Šumava bloček, 30%	Lactalis KS s.r.o Dřevěnice, ČR
6	Zámecký sýr, 45%	Jaroměřická mlékárna Jaroměřice, ČR
7	Emmentaler plátky, 40%	Lactalis s.r.o Dřevěnice, ČR
8	Eidamský sýr, 30%	Moravia Lacto a.s. Jihlava, ČR
9	Polotvrdý sýr s oky 45%	Hostex, Šumperk, ČR
10	Moravský bochník 45%	Madeta a.s. České Budějovice, ČR

4.2.2 Optimalizace přípravy hrubých lyzátů buněk ze vzorků sýrů

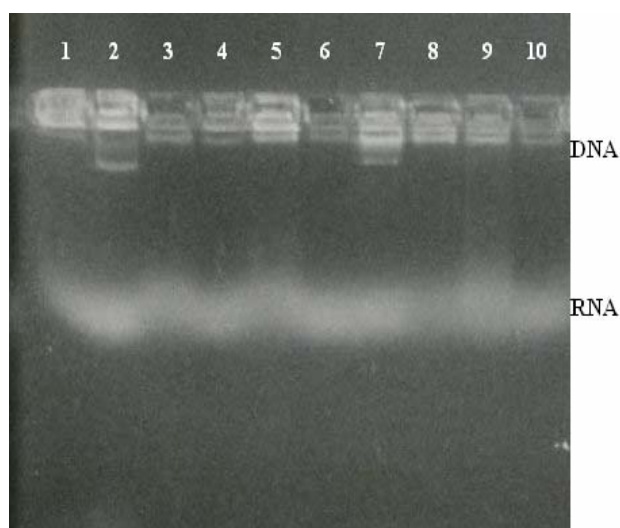
U všech vzorků sýrů bylo testováno použití různého množství vzorku sýru č.1 – 10, homogenizace a resuspendování ve sterilní vodě. Pozornost byla věnována odstranění tuhých vzorků sýrů z lyzační směsi. Bylo toho dosaženo tím, že byl vzorek sýrů spolu se sterilní vodou rozetřen ve třecí misce. Byla odstraněna tuková vrstva filtrační této směsi a dále bylo pracováno jen s filtrátem.

Pro optimalizaci izolace buněk a přípravu hrubých lyzátů byl zvolen postup, kdy byly použity různé množství filtrátů získané z 5 g sýrů resuspendovaných v 7,5 ml sterilní vody. Optimalizovaný postup přípravy hrubých lyzátů buněk z 1,5 ml a 3 ml filtrátu vzorku sýru je uveden v kapitole 4.2.2.1 a 4.2.2.2.

4.2.2.1 Příprava hrubých lyzátů buněk z 1,5 ml filtrátu vzorků sýrů

- Bylo odváženo 5 g z každého vzorku, vloženo do třecí misky a rozetřeno se 7,5 ml sterilní vody (1,5 ml sterilní vody/1 g vzorku). Po důkladném rozetření byl vzorek zfiltrován přes sterilní gázu do sterilní zkumavky.
- 1,5 ml tohoto filtrátu bylo odebráno do mikrozkuavky a zcentrifugováno při 10 000 ot./5 min. Supernatant byl slit a sediment nechán okapat.
- Byl zopakován předchozí krok s použitím 1ml sterilní vody.
- K sedimentu byl přidán 1 ml lyzačního roztoku B s lysozymem 3mg/ml (nejprve bylo přidáno 100 μ l a potom 900 μ l) a vzorek byl důkladně rozsuspendován. Vzorek byl inkubován po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě.
- Po 1 hodině inkubace při laboratorní teplotě bylo přidáno 50 μ l 20% SDS a 5 μ l proteinázy K (1 mg/ml). Vzorky byly inkubovány při 55 °C do dalšího dne.

Přítomnost DNA uvolněné z buněk vzorků tvrdých sýrů byla ověřena gelovou elektroforézou na 0,8% agarózovém gelu. Výsledky jsou uvedeny na Obr. č. 10.



Běh č.	Vzorek sýru č.	Detekce DNA
1	1	+
2	2	+
3	3	+
4	4	+
5	5	+
6	6	+
7	7	+
8	8	+
9	9	+
10	10	+

+ DNA detekována

- DNA nedetekována

Obr. č. 10: Agarózová gelová elektroforéza hrubých lyzátů buněk ze vzorků tvrdých sýrů č. 1 – 10 (pro lyzy bylo použito 1,5 ml filtrátu buněk)

- na gel bylo nanášeno 20 μ l hrubého lyzátu buněk a 5 μ l nanášecího pufru

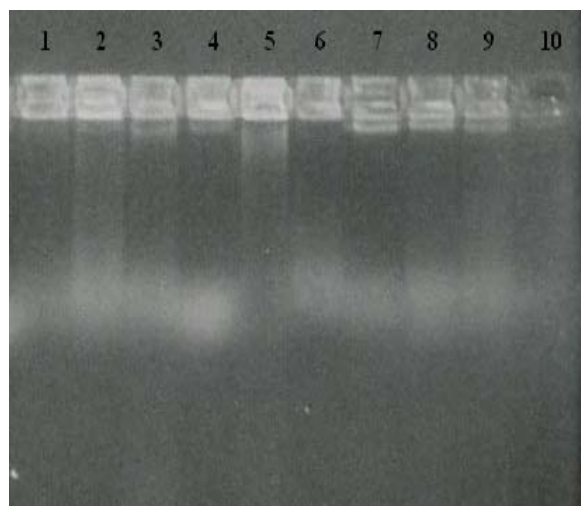
⇒ DNA byla detekována ve všech vzorcích sýrů. Vedle DNA byla detekována i RNA. Viskóznější vzorky uvízly v komůrkách gelu.

⇒ Takto připravený vzorek je vhodný pro separaci DNA pomocí magnetických nosičů a purifikaci DNA fenolovou extrakcí.

4.2.2.2 Příprava hrubých lyzátů buněk ze 3 ml filtrátu vzorků sýrů

- Byl použit stejný postup jako v kapitole 4.2.2.1 s tím rozdílem, že byly lyzovány buňky ze 3 ml filtrátu vzorku sýru.

DNA uvolněná z buněk obsažených ve vzorku tvrdých sýrů s použitím 3 ml filtrátu vzorků sýrů byla detekována gelovou elektroforézou viz. Obr. č. 11. Bylo detekováno větší množství DNA než s použitím 1,5 ml filtrátu vzorků.



Běh č.	Vzorek sýru č.	Detekce DNA
1	1	+
2	2	+
3	3	+
4	4	+
5	5	+
6	6	+
7	7	+
8	8	+
9	9	+
10	10	+

+ DNA detekována

- DNA nedetekována

Obr. č. 11: Agarózová gelová elektroforéza hrubých lyzátů buněk ze vzorků tvrdých sýrů č. 1 - 10 (pro lyzy použity 3 ml filtrátu buněk)

- na gel bylo nanášeno 20 μ l hrubého lyzátu buněk a 5 μ l nanášecího pufru

- ⇒ DNA byla detekována ve všech vzorcích tvrdých sýrů.
- ⇒ S použitím 3 ml filtrátů vzorků sýrů bylo detekováno větší množství DNA než s použitím 1,5 ml filtrátu.
- ⇒ Takto připravený vzorek hrubého lyzátu je vhodný pro separaci pomocí magnetických nosičů a fenolovu extrakci DNA.

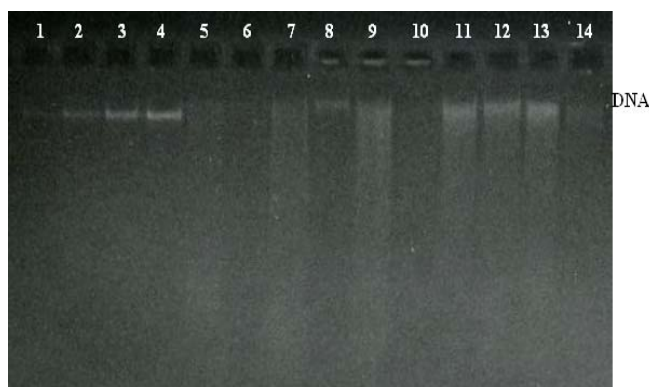
4.2.3 Izolace DNA z tvrdých sýrů metodou fenolové extrakce a pomocí magnetického nosiče

DNA byla izolována metodou fenolové extrakce a pomocí magnetického nosiče Fkol77ox. Byly použity hrubé lyzáty buněk získané z 1,5 ml filtrátu a ze 3 ml filtrátu vzorků sýrů č. 1 až č. 10.

4.2.3.1 DNA izolovaná ze vzorků tvrdých sýrů č. 1 – 10 metodou fenolové extrakce

DNA ze vzorků hrubých lyzátů buněk sýrů byla izolována postupem dle kap. 3.7.3. K izolaci bylo pužito 500 μ l hrubého lyzátu buněk připravených z 1,5 ml a 3 ml filtrátu vzorků sýrů.

Množství vyizolované DNA bylo ověřeno pomocí agarózové gelové elektroforézy s použitím 0,8% gelu (Obr. č. 12 a 13). Podle intenzity hmotnostních standardů na gelu bylo odhadnuto detekované množství DNA v 10 μ l a celkové množství vyizolované DNA v objemu 500 μ l.



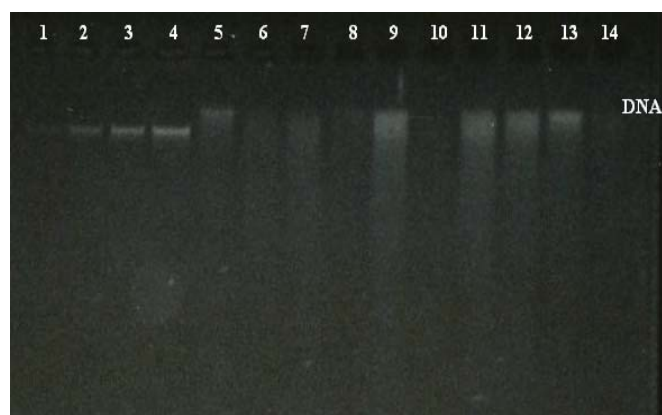
Běh č.	Lyzát buněk vzorku séru č.	Detekce izolované DNA	Přibližné množství DNA (ng/ 10 μ l)	Celkové množství izolované DNA (μ g/500 μ l)	Poznámka
1	35 ng	+			Hmotnostní standard
2	70 ng	+			Hmotnostní standard
3	140 ng	++			Hmotnostní standard
4	210 ng	++			Hmotnostní standard
5	1	+	35	1,75	
6	2	+	35	1,75	
7	3	+	> 35	> 1,75	
8	4	+	70	3,5	
9	5	++	140	7,0	
10	6	+	< 35	< 1,75	
11	7	+++	> 210	> 10,5	
12	8	+++	> 210	> 10,5	
13	9	+++	> 210	> 10,5	
14	10	+	< 35	< 1,75	

+, ++, +++..... intenzita detekce DNA

- DNA nedetekována

Obr. č. 12: Gelová elektroforéza DNA izolované fenolovou extrakcí ze vzorků sérů č. 1 - 10 (použit hrubý lyzát buněk z 1,5 ml vzorků sérů)

- na gel bylo nanášeno 10 μ l DNA, 5 μ l TE pufru a 3 μ l nanášecího pufru a hmotnostní standardy



Běh č.	Lyzát buněk vzorku č.	Detekce izolované DNA	Přibližné množství vyizolované DNA (ng/10 μ l)	Celkové množství izolované DNA (μ g/500 μ l)	Poznámka
1	35 ng	+			Hmotnostní standard
2	70 ng	+			Hmotnostní standard
3	140 ng	++			Hmotnostní standard
4	210 ng	++			Hmotnostní standard
5	1	++	70	3,5	
6	2	+	35	1,75	
7	3	+	35	> 1,75	
8	4	+	< 35	< 1,75	
9	5	+++	> 210	> 10,5	
10	6	+	< 35	< 1,75	
11	7	+++	> 210	> 10,5	
12	8	+++	> 210	> 10,5	
13	9	+++	> 210	> 10,5	
14	10	+	< 35	< 1,75	

+, ++, +++..... intenzita detekce DNA

- DNA nedetekována

Obr. č. 13: Gelová elektroforéza DNA izolované fenolovou extrakcí ze vzorků sýrů č. 1 – 10 (použit hrubý lyzát buněk ze 3 ml vzorků sýrů)

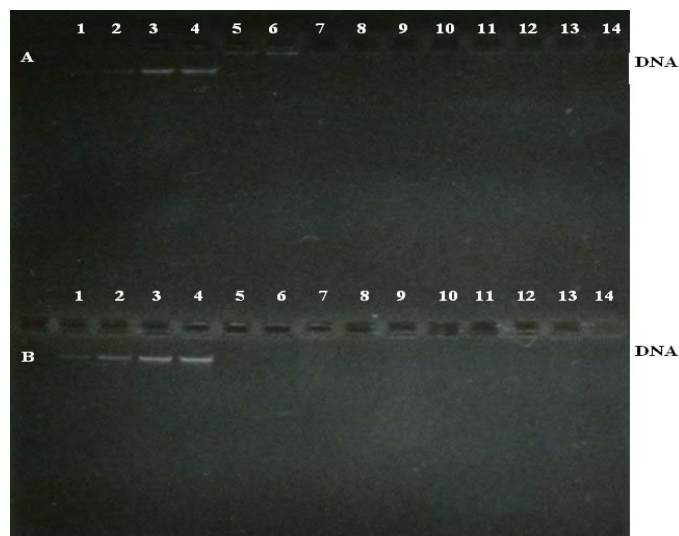
- na gel bylo nanášeno 10 μ l DNA, 5 μ l TE pufru a 3 μ l nanášecího pufru a hmotnostní standardy

⇒ Pomocí fenolové extrakce byla vyizolována DNA ze všech vzorků sýrů v různé koncentraci od 3,5 ng/ μ l do 21 ng/ μ l. U vzorků z většího množství filtrátu bylo detekováno větší množství DNA.

⇒ DNA je částečně degradovaná. Její množství je postačující pro PCR, kde bude testována.

4.2.3.2 Separace DNA ze vzorků tvrdých sýrů č. 1 – 10 pomocí magnetického nosiče

- K separaci magnetickým nosičem byly použity hrubé lyzáty buněk (100 μ l) připraveny z 1,5 ml a 3 ml filtrátu vzorků sýrů.
- V mikrokumavkách byla připravena separační směs s nosičem dle návodů kap. 3.7.3.3, kde je uveden i postup separace. Výsledná koncentrace PEG 6000 je 8 % a NaCl je 2,5 M. DNA separovaná pomocí magnetických nosičů eluovaná do TE pufru (eluát) a DNA, která zůstala v supernatantech po separaci, byla detekována na 0,8% agarózovém gelu. Množství vzorku nanášeného na gel a postup přípravy viz kap. 3.7.5. Výsledky jsou uvedeny na Obr. č. 14 a 15. Množství vyizolované DNA bylo odhadnuto podle intenzity hmotnostních standardů.



Řada A Běh č.	DNA vzorku č.	Detekce DNA v eluátech	Přibližné množství vyizolované DNA v eluátech (ng/10 μ l)	Celkové množství izolované DNA (μ g/100 μ l)	Poznámka
1	35 ng	+			Hmotnostní standard
2	70 ng	+			Hmotnostní standard
3	140 ng	++			Hmotnostní standard
4	210 ng	++			Hmotnostní standard
5	1	-	< 35	< 0,35	
6	2	-	< 35	< 0,35	
7	3	-	< 35	< 0,35	
8	4	-	< 35	< 0,35	
9	5	-	< 35	< 0,35	
10	6	-	< 35	< 0,35	
11	7	-	< 35	< 0,35	
12	8	-	< 35	< 0,35	
13	9	-	< 35	< 0,35	
14	10	-	< 35	< 0,35	

Řada B Běh č.	Supernatant ze vzorků č.	Detekce DNA v supernatantech	Množství vyizolované DNA (ng/10 µl)	Celkové množství izolované DNA (µg/100 µl)	Poznámka
1	35 ng	+			Hmotnostní standard
2	70 ng	+			Hmotnostní standard
3	140 ng	++			Hmotnostní standard
4	210 ng	++			Hmotnostní standard
5	1	-	< 35	< 0,35	
6	2	-	< 35	< 0,35	
7	3	-	< 35	< 0,35	
8	4	-	< 35	< 0,35	
9	5	-	< 35	< 0,35	
10	6	-	< 35	< 0,35	
11	7	-	< 35	< 0,35	
12	8	-	< 35	< 0,35	
13	9	-	< 35	< 0,35	
14	10	-	< 35	< 0,35	

+, ++, +++..... intenzita detekce DNA

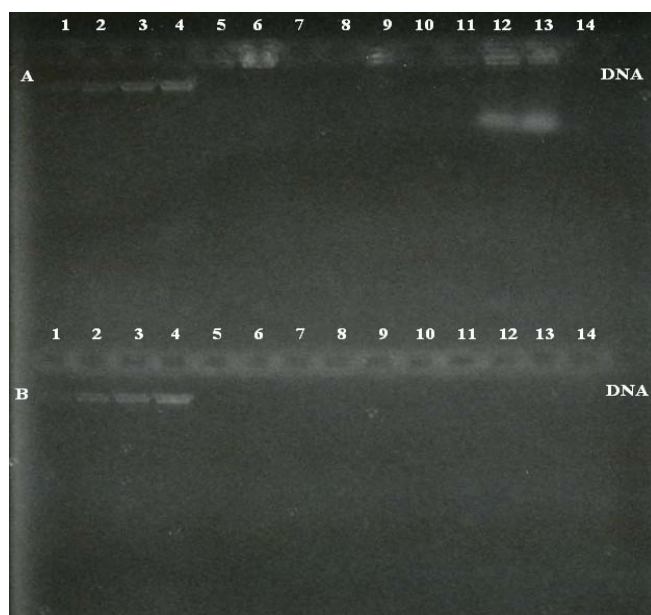
- DNA nedetekována

Obr. č. 14: Agarózová gelová elektroforéza DNA separované ze vzorků sýrů č. 1 – 10 pomocí magnetického nosiče Fkol77ox. (použito 100 µl hrubého lyzátu z 1,5 ml vzorku sýrů)

- na gel bylo nanášeno 10 µl DNA, 5 µl TE pufru a 3 µl nanášecího pufru a hmotnostní standardy

A: DNA eluovaná z nosiče

B: DNA v supernatantech



Řada A Běh č.	DNA vzorku č.	Detekce DNA v eluátech	Přibližné množství DNA (ng/10 µl)	Celkové množství izolované DNA (µg/100 µl)	Poznámka
1	35 ng	+			Hmotnostní standard
2	70 ng	+			Hmotnostní standard
3	140 ng	++			Hmotnostní standard
4	210 ng	++			Hmotnostní standard
5	1	-	< 35	< 0,35	
6	2	-	< 35	< 0,35	
7	3	-	< 35	< 0,35	
8	4	-	< 35	< 0,35	
9	5	-	< 35	< 0,35	
10	6	-	< 35	< 0,35	
11	7	-	< 35	< 0,35	
12	8	-	< 35	< 0,35	
13	9	-	< 35	< 0,35	
14	10	-	< 35	< 0,35	

Řada B Běh č.	Supernatant ze vzorků č.	Detekce DNA v supernatantech	Množství vyizolované DNA (ng/10 µl)	Celkové množství izolované DNA (µg/100 µl)	Poznámka
1	35 ng	+			Hmotnostní standard
2	70 ng	+			Hmotnostní standard
3	140 ng	++			Hmotnostní standard
4	210 ng	++			Hmotnostní standard
5	1	-	< 35	< 0,35	
6	2	-	< 35	< 0,35	
7	3	-	< 35	< 0,35	
8	4	-	< 35	< 0,35	
9	5	-	< 35	< 0,35	
10	6	-	< 35	< 0,35	
11	7	-	< 35	< 0,35	
12	8	-	< 35	< 0,35	
13	9	-	< 35	< 0,35	
14	10	-	< 35	< 0,35	

+, ++, +++..... intenzita detekce DNA

- DNA nedetekována

Obr. č. 15: Agarózová gelová elektroforéza DNA separované ze vzorků sýrů č. 1 - 10 pomocí magnetického nosiče Fkol 77ox. (použito 100 µl hrubého lyzátu buněk ze 3 ml vzorků sýrů)

- na gel bylo nanášeno 10 µl DNA, 5 µl TE pufru a 3 µl nanášecího pufru a hmotnostních standardů

A: DNA eluovaná z nosiče

B: DNA v supernatantech

⇒ Pomocí magnetického nosiče Fkol77ox bylo v eluátech detekováno množství DNA menší než 3,5 ng/µl, které nebylo pomocí agarózové gelové elektroforézy vizualizováno.

⇒ Žádná DNA nebyla pomocí metody agarózové gelové elektroforézy detekována ani v supernatantech.

4.2.4 Stanovení koncentrace DNA získané ze vzorků sýrů č. 1 – 10 fenolovou extrakcí a pomocí magnetického nosiče

Pomocí spektrofotometru a fluorometru byla změřena absorbance všech vzorků DNA izolovaných fenolovou extrakcí a pomocí magnetických nosičů (DNA v eluátech).

4.2.4.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA získané ze vzorků sýrů fenolovou extrakcí

Byly změřeny absorbance vzorku o objemu 500 μ l při 260 nm, 280 nm a 310 nm. Návod viz kap. 3.7.4.1. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tab. č. 13.

Tab. č. 13: *Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA izolovaných z deseti vzorků tvrdých sýrů z 1,5 ml filtrátu a 3 ml filtrátu fenolovou extrakcí*

DNA po fenolové extrakci; 1,5 ml filtrátu				
Vzorek č.	A (260 nm)	A (280 nm)	A (310 nm)	c (μ g/ml)
1	0,372	0,24	0,075	18,6
2	0,595	0,406	0,069	29,75
3	0,267	0,247	0,067	13,35
4	0,24	0,217	0,063	12
5	0,428	0,336	0,072	21,4
6	0,254	0,275	0,084	12,7
7	0,476	0,345	0,07	23,8
8	0,325	0,376	0,07	16,25
9	0,265	0,262	0,066	13,25
10	0,255	0,326	0,075	12,75

DNA po fenolové extrakci; 3 ml filtrátu				
Vzorek č.	A (260 nm)	A (280 nm)	A (310 nm)	c (μ g/ml)
1	0,389	0,268	0,039	19,45
2	0,607	0,401	0,06	30,35
3	0,614	0,349	0,025	30,7
4	0,582	0,391	0,047	29,1
5	0,524	0,365	0,019	26,2
6	0,201	0,18	0,032	10,05
7	0,599	0,382	0,036	29,95
8	0,742	1,143	0,068	37,1
9	0,74	1,032	0,072	37
10	0,529	0,527	0,041	26,45

- ⇒ Koncentrace DNA vyizolovaná a purifikovaná ze vzorků tvrdých sýrů se pohybovala od 10 μ g/ml do 37 μ g/ml. Ze 3 ml filtrátu bylo izolováno větší množství DNA než z 1,5 ml filtrátu.
- ⇒ DNA byla izolovaná v dostatečném množství pro PCR.

4.2.4.2 Fluorometrické stanovení koncentrace DNA získaných ze vzorků sýrů č. 1 – 10 separací pomocí magnetického nosiče

Pomocí fluorometru byla změřena koncentrace DNA eluátů separovaných pomocí magnetických nosičů ze vzorků tvrdých sýrů. Objem měřeného vzorku byl 10 μ l.

Návody na přípravu vzorků a výpočet koncentrace viz kap. 3.7.4.2.

Výsledky jsou uvedeny v Tab. č. 14.

Tab. č. 14: Fluorometrické stanovení koncentrace DNA v eluátech po izolaci magnetickým nosičem ze 100 μ l hrubých lyzátu buněk připravených z 1,5 ml a 3 ml filtrátu vzorků sýrů č. 1 - 10

Eluáty získané z 1,5 ml filtrátu buněk		
Eluát DNA vzorku č.	QF hodnota	c (μ g/ml)
1	7,97	0,159
2	8,44	0,168
3	7,89	0,157
4	3,22	0,64
5	6,85	0,137
6	1,55	0,031
7	8,03	0,160
8	20,2	0,404
9	14,4	0,288
10	15,1	0,302

Eluáty získané ze 3 ml filtrátu buněk		
Eluát DNA vzorku č.	QF hodnota	c (μ g/ml)
1	2,48	0,049
2	3,65	0,073
3	19	0,380
4	3,75	0,075
5	28,2	0,564
6	10,4	0,208
7	7,01	0,140
8	18,6	0,372
9	26,6	0,532
10	16,8	0,336

⇒ Koncentrace DNA izolované ze vzorků sýrů pomocí magnetických nosičů byly různé od 0,031 μ g/ml po 0,532 μ g/ml.

⇒ Množství DNA je postačující pro PCR.

4.2.5 PCR s použitím primerů PALA 4 a PALA 14 a DNA izolované ze vzorků sýrů č. 1 - 10

V této reakci se amplifikuje specifický fragment o velikosti 1 131 bp specifický pro druh *Lactococcus lactis*.

Jako DNA matrice byla použita neředěná DNA izolovaná ze vzorků tvrdých sýrů fenolovou extrakcí a DNA izolovaná ze vzorků tvrdých sýrů magnetickým nosičem.

Jako pozitivní kontrola byla použita DNA matrice kmene *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T získaná metodou fenolové extrakce (koncentrace 10 ng/ μ l) a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T získaná metodou fenolové extrakce (koncentrací 1 ng/ μ l).

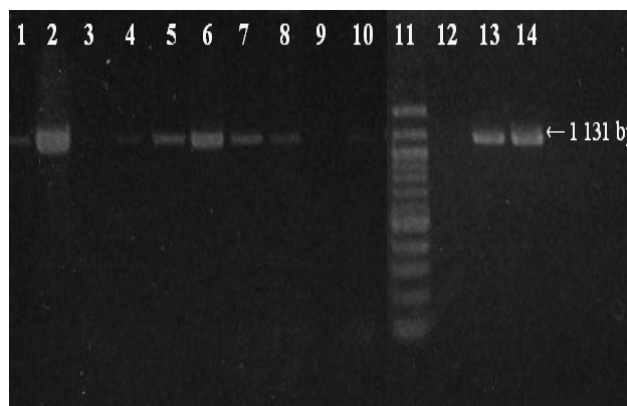
4.2.5.1 PCR s použitím DNA matrice izolované ze vzorků tvrdých sýrů fenolovou extrakcí

PCR směs byla připravena dle kap. 3.7.6.1. a 3.7.6.2.

Jako DNA matrice byla použita neředěná DNA (1 μ l a 3 μ l) vyizolovaná z deseti vzorků sýrů fenolovou extrakcí.

4.2.5.1.1 PCR s použitím 1 µl DNA matrice získané fenolovou extrakcí z 1,5 ml a ze 3 ml filtrátu vzorků sýrů č. 1 - 10

Výsledky jsou uvedeny na Obr. č. 16 a na Obr. č. 17.



DNA po fenolové extrakci (1,5 ml filtrátu)			
Běh č.	Vzorek sýru č.	Detekce PCR produktu	Poznámka
1	standard		100 bp
2	1	+	
3	2	+++	
4	3	-	
5	4	+	
6	5	++	
7	6	+++	
8	7	++	
9	8	+	
10	9	-	
11	10	+	
12	NK	-	
13	PK1	++	
14	PK2	++	

+, ++, +++..... intenzita detekce PCR produktu

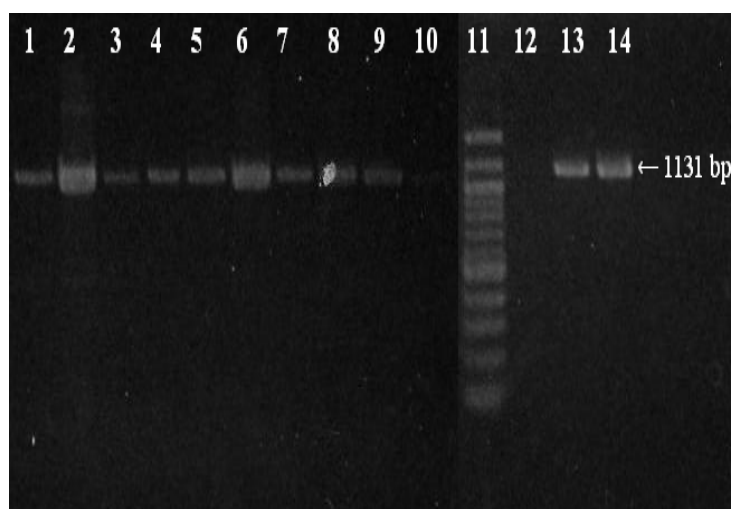
- PCR produkt nedetekován

NK.....negativní kontola

PK1.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T (10 ng/µl)

PK2.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T (1 ng/µl)

Obr. č. 16: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů (1 131 bp) amplifikovaných z DNA vzorků sýrů č. 1 – 10. K amplifikaci byla použita DNA (1 µl) získaná fenolovou extrakcí z 1,5 ml filtrátu buněk.



DNA po fenolové extrakci (3 ml filtrátu)			
Běh č.	Vzorek syru č.	Detekce PCR produktu	Poznámka
1	1	++	
2	2	+++	
3	3	+	
4	4	++	
5	5	++	
6	6	+++	
7	7	++	
8	8	++	
9	9	++	
10	10	+	
11	standard		100 bp
12	NK	-	
13	PK1	++	
14	PK2	++	

+, ++, +++..... intenzita detekce PCR produktu

- PCR produkt nedetekován

NK.....negativní kontola

PK1.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T (10 ng/μl)

PK2.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T (1 ng/μl)

Obr. č. 17: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů (1 131 bp) amplifikovaných ze vzorků syrů č. 1 – 10. Byla použita DNA (1 μl) získaná fenolovou extrakcí ze 3 ml filtrátu buněk

⇒ Byl amplifikován specifický fragment DNA o velikosti 1 131 bp u všech vzorků DNA (1 – 10) izolovaných z 3 ml filtrátu. S použitím 1 μl DNA matrice z 1,5 ml filtrátu tvořili vyjimku vzorek č. 3 a č. 9.

4.2.5.1.2 PCR s použitím 3 µl DNA matrice získané fenolovou extrakcí z 1,5 ml a ze 3 ml filtrátu vzorků sýrů č. 1 - 10

Byly připraveny PCR směsi s 3 µl DNA matrice a provedena PCR. Detekce PCR produktů jsou uvedeny na Obr. č. 18 a č. 19.



DNA po fenolové extrakci (1,5 ml filtrátu)			
Běh č.	Vzorek sýru č.	Detekce PCR produktu	Poznámka
1	1	+	
2	2	+++	
3	3	-	
4	4	+	
5	5	++	
6	6	+++	
7	7	++	
8	8	+++	
9	9	++	
10	10	+	
11	standard		100 bp
12	NK	-	
13	PK1	++	
14	PK2	++	

+, ++, +++..... intenzita detekce PCR produktu

- PCR produkt nedetekován

NK.....negativní kontola

PK1.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T (10 ng/µl)

PK2.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T (1 ng/µl)

Obr. č. 18: Gelová elektroforéza PCR produktů (1 131 bp) amplifikovaných z DNA vzorků sýrů č. 1 – 10. Pro amplifikaci byla použita DNA (3 µl) izolovaná fenolovou extrakcí z 1,5 ml filtrátu buněk.



DNA po fenolové extrakci (3 ml filtrátu)			
Běh č.	Vzorek sýru č.	Detekce PCR produktu	Poznámka
1	standard		100 bp
2	1	+	
3	2	++	
4	3	+	
5	4	+	
6	5	++	
7	6	+++	
8	7	++	
9	8	+++	
10	9	++	
11	10	+	
12	NK	-	
13	PK1	++	
14	PK2	++	

+, ++, +++..... intenzita detekce PCR produktu

- PCR produkt nedetekován

NK.....negativní kontola

PK1.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T (10 ng/μl)

PK2.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T (1 ng/μl)

Obr. č. 19: Gelová elektroforéza PCR produktů (1 131 bp) amplifikovaných z DNA vzorků sýrů č. 1 – 10. Pro amplifikaci bylo použito DNA (3 μl) izolované fenolovou extrakcí ze 3 ml filtrátu buněk.

⇒ Byl detekován specifický fragment DNA o velikosti 1 131 bp u všech vzorků DNA (1 – 10) izolovaných ze 3 ml filtrátu s použitím 3 μl DNA matrice a z 1,5 ml filtrátu s použitím 3 μl DNA s vyjimkou vzorku č. 3.

4.2.5.2 PCR s použitím DNA matrice izolované ze vzorků sýrů pomocí magnetického nosiče

PCR směs byla připravena dle kapitoly 3.7.6.1. a 3.7.6.2. Jako DNA matrice byla použita neředěná DNA o objemu 1 μ l a 3 μ l vyizolovaná z deseti vzorků sýrů (100 μ l hrubých lyzátů z 1,5 ml filtrátu a 3 ml filtrátu) pomocí magnetických nosičů.

4.2.5.2.1 PCR s použitím 1 μ l DNA matrice získané ze vzorků sýrů č. 1 - 10 pomocí magnetického nosiče

Výsledky amplifikace jsou uvedeny na Obr. č. 20 a č. 21.



DNA po SPRI (1,5 ml filtrátu)			
Běh č.	Vzorek sýru č.	Detekce PCR produktu	Poznámka
1	1	+	
2	2	+++	
3	3	-	
4	4	-	
5	5	-	
6	6	-	
7	7	-	
8	8	-	
9	9	-	
10	10	-	
11	standard		100 bp
12	NK	-	
13	PK1	++	
14	PK2	++	

+, ++, +++..... intenzita detekce PCR produktu

- PCR produkt nedetekován

NK.....negativní kontrola

PK1.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T (10 ng/ μ l)

PK2.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T (1 ng/ μ l)

Obr. č. 20: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů (1 131 bp) amplifikovaných ze vzorků sýrů č. 1 – 10. Byla použita DNA (1 μ l) získaná pomocí SPRI ze 100 μ l hrubých lyzátů připravených z 1,5 ml filtrátu buněk



DNA po SPRI (3 ml filtrátu)			
Běh č.	Vzorek č.	Detekce PCR produktu	Poznámka
1	1	+	
2	2	+++	
3	3	+	
4	4	+	
5	5	++	
6	6	+++	
7	7	++	
8	8	+++	
9	9	++	
10	10	+	
11	standard		100 bp
12	NK	-	
13	PK1	++	
14	PK2	++	

+, ++, +++..... intenzita detekce PCR produktu

- PCR produkt nedetekován

NK.....negativní kontrola

PK1.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T (10 ng/μl)

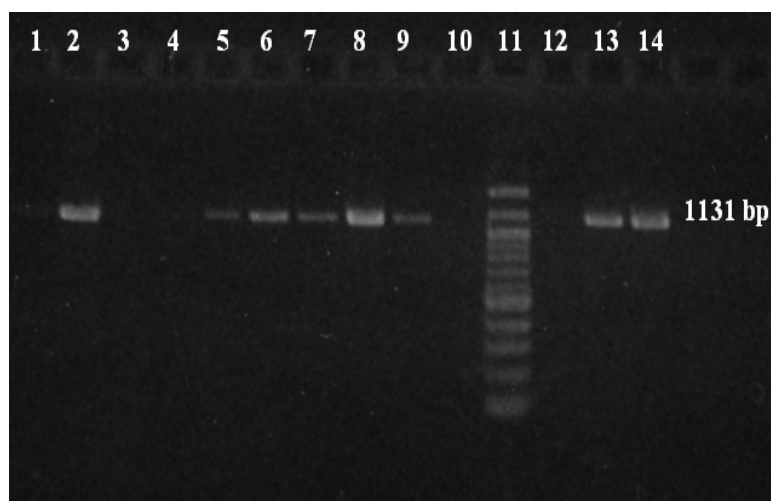
PK2.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T (1 ng/μl)

Obr. č. 21: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů (1 131 bp) amplifikovaných ze vzorků sýrů č. 1 – 10. Byla použita DNA (1 μl) získaná pomocí SPRI ze 100 μl hrubých lyzátů připravených ze 3 ml filtrátu buněk

⇒ S použitím DNA ze 100 μl hrubých lyzátů buněk připravených z 1,5 ml filtrátu se amplifikoval PCR produkt jen u vzorku č. 1 a č. 2. Byl amplifikován specifický fragment DNA (1 131 bp) u všech vzorků sýrů izolované ze 100 μl hrubých lyzátů připravený z 3 ml filtrátu buněk s použitím 1 μl DNA matrice

4.2.5.2.2 PCR s použitím 3 μ l DNA matrice získané ze vzorků sýrů č. 1 – 10 pomocí magnetického nosiče

Výsledky amplifikace 3 μ l DNA ze 100 μ l hrubých lyzátů buněk připravených z 1,5 ml filtrátu a ze 3 ml filtrátu vzorku sýrů izolovaných pomocí SPRI jsou uvedeny na Obr. č. 22 a na Obr. č. 23.



DNA po SPRI (1,5 ml filtrátu)			
Běh č.	Vzorek sýru č.	Detekce PCR produktu	Poznámka
1	1	+	
2	2	+++	
3	3	-	
4	4	-	
5	5	+	
6	6	+	
7	7	+	
8	8	+++	
9	9	++	
10	10	-	
11	standard		100 bp
12	NK	-	
13	PK1	++	
14	PK2	++	

+, ++, +++..... intenzita detekce PCR produktu

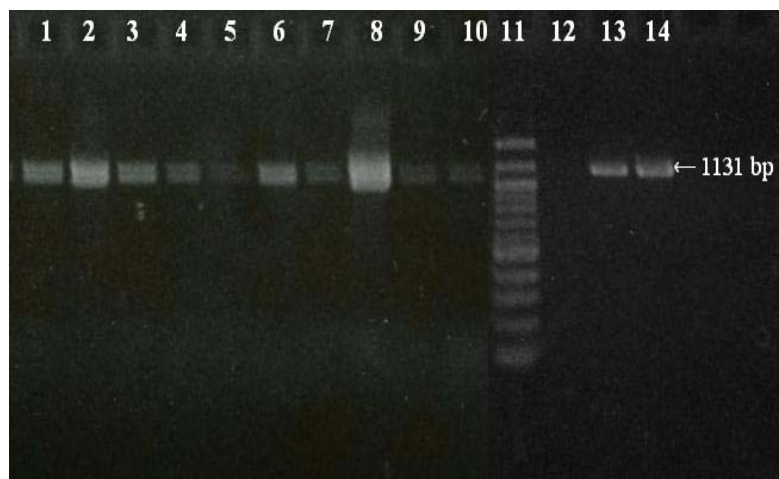
- PCR produkt nedetekován

NK.....negativní kontola

PK1.....pozitivní kontola *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T (10 ng/ μ l)

PK2.....pozitivní kontola *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T (1 ng/ μ l)

Obr. č. 22: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů (1 131 bp) amplifikovaných ze vzorků sýrů č. 1 – 10. Byla použita DNA (3 μ l) získaná pomocí SPRI ze 100 μ l hrubých lyzátu připravených z 1,5 ml filtrátu buněk



DNA po SPRI (3 ml filtrátu)			
Běh č.	Vzorek syru č.	Detekce PCR produktu	Poznámka
1	1	++	
2	2	+++	
3	3	++	
4	4	+	
5	5	+	
6	6	++	
7	7	+	
8	8	+++	
9	9	+	
10	10	+	
11	standard		100 bp
12	NK	-	
12	NK	-	
13	PK1	++	
14	PK2	++	

+, ++, +++..... intenzita detekce PCR produktu

- PCR produkt nedetekován

NK.....negativní kontrola

PK1.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T (10 ng/μl)

PK2.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T (1 ng/μl)

Obr. č. 23: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů (1 131 bp) amplifikovaných ze vzorků syrů č. 1 – 10. Byla použita DNA (3 μl) získaná pomocí SPRI ze 100 μl hrubých lyzátu připravených z 3 ml filtrátu buněk

⇒ Specifický PCR produkt (1 131 bp) pro *Lactococcus lactis* byl detekován s použitím DNA izolované pomocí magnetického nosiče u všech vzorků syrů č. 1 – 10 s použitím 3 μl DNA matrice, zatímco s použitím 1,5 ml filtrátu dávaly 3 vzorky syrů (č. 3, 4 a 10) falešně negativní výsledek.

4.2.6 PCR s použitím primerů 27f a Lla a DNA izolované ze vzorků sýrů č. 1 - 10

Tyto primery umožňují v přítomnosti DNA *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* amplifikaci specifického fragmentu o velikosti 87 bp. V přítomnosti *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* se neamplifikuje žádný fragment. [28]

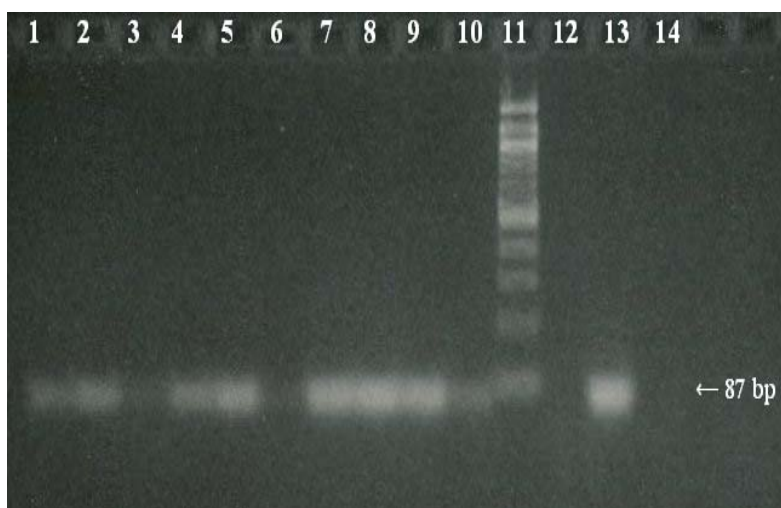
Jako DNA matrice byla použita neředěná DNA izolovaná ze vzorků tvrdých sýrů fenolovou extrakcí a DNA izolovaná ze vzorků tvrdých sýrů magnetickým nosičem Fkol77ox.

Jako pozitivní kontrola byla použita DNA matrice kmene *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T získaná metodou fenolové extrakce o koncentraci 10 ng/ µl a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T získaná metodou fenolové extrakce o koncentraci 10 ng/ µl.

4.2.6.1 PCR s použitím DNA matrice izolované ze vzorků tvrdých sýrů fenolovou extrakcí

PCR směs byla připravena dle kap. 3.7.6.1. a 3.7.6.3. Jako DNA matrice byla použita neředěná DNA vyizolovaná z deseti vzorků sýrů fenolovou extrakcí.

Amplifikace specifického fragmentu DNA jsou uvedeny na Obr. č. 24 a č. 25.



DNA po FE (1,5 ml filtrátu)			
Běh č.	Vzorek syru č.	Detekce PCR produktu	Poznámka
1	1	+	
2	2	++	
3	3	+	
4	4	++	
5	5	++	
6	6	-	
7	7	+++	
8	8	+++	
9	9	+++	
10	10	++	
11	standard		100 bp
12	NK	-	
13	PK1	++	
14	PK2	-	

+, ++, +++..... intenzita detekce PCR produktu

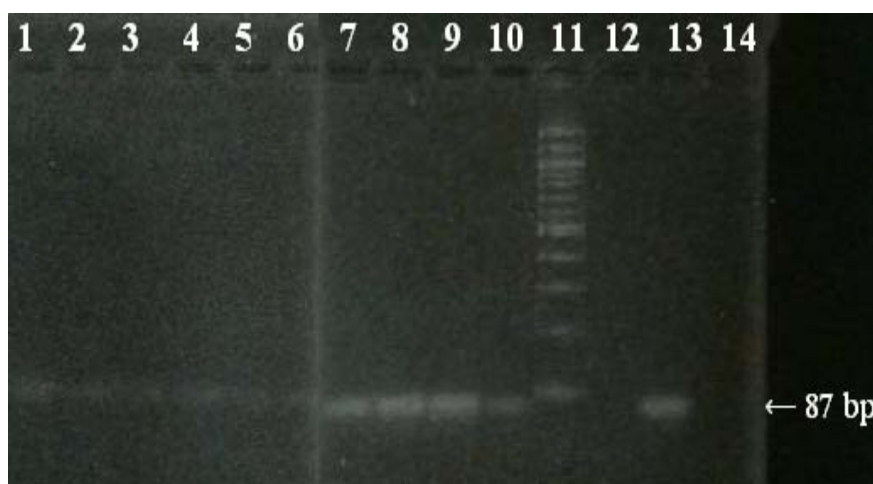
- PCR produkt nedetekován

NK.....negativní kontrola

PK1.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T (10 ng/μl)

PK2.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T (10 ng/μl)

Obr. č. 24: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů amplifikovaných ze vzorků sýrů č. 1 – 10. Byla použita DNA (1 μl) získaná z 1,5 ml filtrátu buněk fenolovou extrakcí



DNA po FE (3 ml filtrátu)			
Běh č.	Vzorek syru č.	Detekce PCR produktu	Poznámka
1	1	+	
2	2	+	
3	3	+	
4	4	+	
5	5	+	
6	6	+	
7	7	+++	
8	8	+++	
9	9	+++	
10	10	+	
11	standard		100 bp
12	NK	-	
13	PK1	++	
14	PK2	-	

+, ++, +++..... intenzita detekce PCR produktu

- PCR produkt nedetekován

NK.....negativní kontrola

PK1.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T (10 ng/μl)

PK2.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T (10 ng/μl)

Obr. č. 25: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů amplifikovaných ze vzorků sýrů č. 1 – 10. Byla použita DNA (1 μl) získaná ze 3 ml filtrátu buněk fenolovou extrakcí

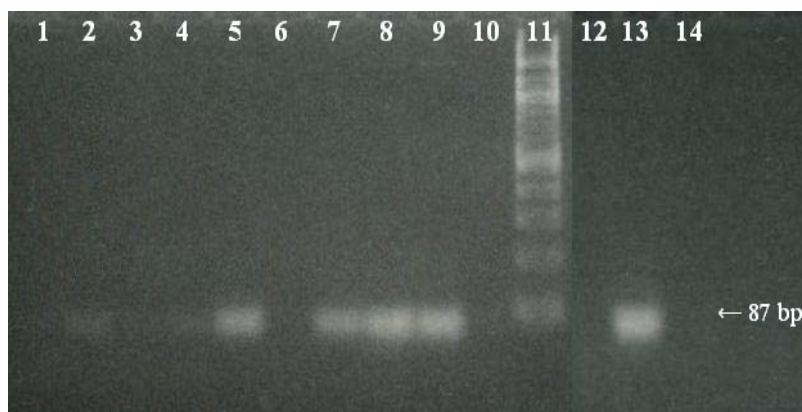
⇒ Byl detekován fragment o velikosti 87 bp, který je specifický pro kmen *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* u všech vzorků DNA izolovaných ze 3 ml filtrátu.

⇒ U DNA izolované z 1,5 ml filtrátu se neamplifikovala DNA ze vzorku č.6.

4.2.6.2 PCR s použitím DNA matrice izolované ze vzorků tvrdých sýrů pomocí magnetického nosiče

PCR směs byla připravena dle kap. 3.7.6.1. a 3.7.6.3. Jako DNA matrice byla použita neředěná DNA vyizolovaná z deseti vzorků sýrů fenolovou extrakcí.

Amplifikace specifického fragmentu DNA jsou uvedeny na Obr. č. 26 a č. 27.



DNA po SPRI (1,5 ml filtrátu)			
Běh č.	Vzorek sýru č.	Detekce PCR produktu	Poznámka
1	1	-	
2	2	+	
3	3	+	
4	4	+	
5	5	++	
6	6	-	
7	7	+++	
8	8	+++	
9	9	+++	
10	10	-	
11	standard		100 bp
12	NK	-	
13	PK1	+++	
14	PK2	-	

+, ++, +++..... intenzita detekce PCR produktu

- PCR produkt nedetekován

NK.....negativní kontrola

PK1.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T (10 ng/μl)

PK2.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T (10 ng/μl)

Obr. č. 26: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů (87 bp) amplifikovaných ze vzorků sýrů č. 1 – 10. Byla použita DNA (1 μl) získaná ze 100 μl hrubých lyzátů připravených z 1,5 ml filtrátu buněk pomocí SPRI



DNA po SPRI (3 ml filtrátu)			
Běh č.	Vzorek syru č.	Detekce PCR produktu	Poznámka
1	1	+	
2	2	+	
3	3	+	
4	4	+	
5	5	+	
6	6	-	
7	7	+++	
8	8	+++	
9	9	++	
10	10	++	
11	standard		100 bp
12	NK	-	
13	PK1	+++	
14	PK2	-	

+, ++, +++..... intenzita detekce PCR produktu

- PCR produkt nedetekován

NK.....negativní kontrola

PK1.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T (10 ng/μl)

PK2.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T (10 ng/μl)

Obr. č. 27: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů (87 bp) amplifikovaných ze vzorků syrů č. 1 – 10. Byla použita DNA (1 μl) získaná ze 100 μl hrubých lyzátů připravených ze 3 ml filtrátu buněk pomocí SPRI

⇒ Specifické PCR produkty pro kmeny *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* byly detekovány u všech vzorků syrů s použitím 1 μl DNA matrice izolované pomocí SPRI, s výjimkou vzorku č. 1, 6 a 10 připravených z 1,5 ml filtrátu buněk a u vzorku č. 6 ze 3 ml filtrátu.

4.2.7 Shrnutí výsledků amplifikace DNA izolované ze vzorků sýrů

V Tab. č. 15 jsou shrnuty výsledky amplifikace různých množství DNA izolované ze vzorků sýrů č. 1 – 10 z 1,5 ml filtrátu s použitím různé metody izolace a různými primery pro PCR směs.

Tab. č. 15: Amplifikace DNA (1 µl a 3 µl) izolované z 1,5 ml filtrátu vzorků sýrů č. 1 – 10 pomocí fenolové extrakce (FE) a pomocí magnetických nosičů (SPRI)

DNA VZORKU SÝRU č.	PCR produkt/ primery/ metoda izolace /DNA (µl) v PCR směsi					
	PALA 4, PALA 14				27f, Lla	
	FE		SPRI		FE	SPRI
	1 µl	3 µl	1 µl	3 µl	1 µl	3 µl
1	+	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	+	+
3	-	-	-	-	+	+
4	+	+	-	-	+	+
5	+	+	-	+	+	+
6	+	+	-	+	-	-
7	+	+	-	+	+	+
8	+	+	-	+	+	+
9	-	+	-	+	+	+
10	+	+	-	-	+	-
PK 1	+	+	+	+	+	+
PK 2	+	+	+	+	-	-
NK	-	-	-	-	-	-

+PCR produkt detekován

-PCR produkt nedetekován

PK1.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T

PK2.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T

NK.....negativní kontrola

Výsledky amplifikace různého množství DNA izolované ze vzorků sýrů č. 1 – 10 ze 3 ml filtrátu s použitím různé metody a izolace a s použitím různých primerů pro PCR směs jsou uvedeny v Tab. č. 16.

Tab. č. 16: Amplifikace DNA (1 µl a 3 µl) izolované ze 3 ml filtrátu vzorků sýrů č. 1 – 10 pomocí fenolové extrakce (FE) a pomocí magnetických nosičů (SPRI)

DNA VZORKU SÝRU č.	PCR produkt/ primery/ metoda izolace /DNA (µl) v PCR směsi					
	PALA 4, PALA 14				27f, Lla	
	FE		SPRI		FE	SPRI
	1 µl	3 µl	1 µl	3 µl	1 µl	3 µl
1	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	-
7	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+
PK 1	+	+	+	+	+	+
PK 2	+	+	+	+	-	-
NK	-	-	-	-	-	-

+PCR produkt detekován

-PCR produkt nedetekován

PK1.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T

PK2.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T

NK.....negativní kontrola

- ⇒ Došlo k amplifikaci DNA ze všech vzorků sýrů. S použitím většího množství filtrátu vzorků sýrů bylo amplifikováno větší množství vzorků. Byla zároveň detekována přítomnost bakterií druhu *Lactococcus lactis*.
- ⇒ Specifický PCR produkt druhu *Lactococcus lactis* byl detekován po amplifikaci ze 3 µl DNA izolované fenolovou extrakcí a 1 µl DNA izolované pomocí SPRI ze 3 ml filtrátu u všech vzorků.
- ⇒ Specifický PCR produkt pro poddruh *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* byl detekován u všech vzorků DNA izolovaných pomocí SPRI.

4.3 Taxonomické zařazení 7 kmenů *Lactococcus lactis*

K identifikaci bylo použito 7 kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (producenti nisinu a kontrolní kmeny) ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora. Úkolem bylo použít zavedení metody PCR k ověření jejich druhové a poddruhové identifikace.

Tab. č. 17: Bakteriální kmeny druhu *Lactococcus lactis* s přiřazenými čísly vzorků

Vzorek č.	kmen <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
1	418/02
2	LC 416 Nip+
3	731/03 Nip +
4	HMM 4
5	S32
6	71/02
7	414/02

4.3.1 Kultivace, ověření čistoty kultury a příprava hrubých lyzátů buněk kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*

Bakteriální kultury byly nakultivovány dle kapitoly 3.7.1. Následně bylo provedeno přeočkování kultury z tekutého MRS média na pevný agar a ověření čistoty kultury.

Na pevném agaru narostly bílé až krémové kolonie kulatého tvaru.

Hrubé lyzáty byly připraveny dle kapitoly 3.7.2.

- ⇒ Kultura narostla, tekuté médium se zakalilo.
- ⇒ Na pevném agaru nám narostly jednotlivé kolonie stejného vzhledu a velikosti.
- ⇒ Buňky byly zlyzovány a následně použity pro izolaci a purifikaci DNA.

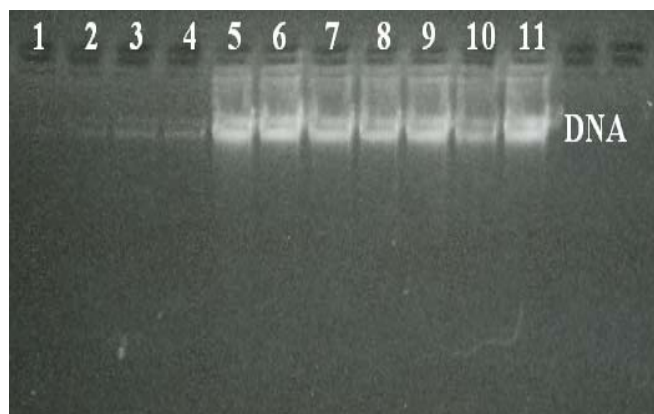
4.3.2 Izolace a purifikace bakteriální DNA metodou fenolové extrakce a pomocí magnetického nosiče

4.3.2.1 Izolace DNA 7 kmenů *Lactococcus lactis* fenolovou extrakcí

500 µl hrubého lyzátu bylo použito pro fenolovou extrakci viz kapitola 3.7.3.1, získaná DNA byla přesrážena ethanolem kap. 3.7.3.2.

Vyizolovaná DNA byla detekována agarózovou gelovou elektroforézou, na gel bylo nanášeno 10 µl DNA, 5 µl TE pufru a 3 µl nanášecího pufru. Výsledky jsou uvedeny na Obr. č. 28.

Srovnáním intenzity fragmentů DNA s hmotnostními standardy byla odhadnuta koncentrace DNA.



Běh č.	Lyzát buněk vzorku č.	Detekce izolované DNA	Přibližné množství DNA (ng/ 10 µl)	Celkové množství izolované DNA (µg/500 µl)	Poznámka
1	35 ng	+			Hmotnostní standard
2	70 ng	+			Hmotnostní standard
3	140 ng	++			Hmotnostní standard
4	210 ng	++			Hmotnostní standard
5	1	+++	> 210	> 10,5	
6	2	+++	> 210	> 10,5	
7	3	+++	> 210	> 10,5	
8	4	+++	> 210	> 10,5	
9	5	+++	> 210	> 10,5	
10	6	+++	> 210	> 10,5	
11	7	+++	> 210	> 10,5	

+, ++, +++..... intenzita detekce DNA

- DNA nedetekována

Obr. č. 28: Agarózová gelová elektroforéza DNA 7 kmenů *Lactococcus lactis* izolovaná metodou fenolové extrakce.

- spolu s DNA byly na gel nanášeny hmotnostní standardy.

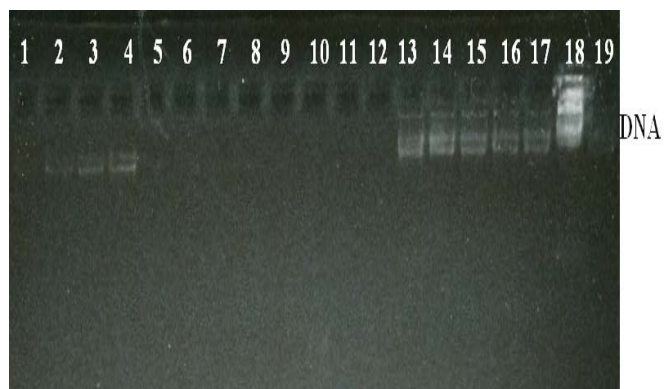
⇒ Fenolovou extrakcí bylo vyizolováno DNA ze všech sedmi kmenů *Lactococcus lactis* v množství větším než 210 ng/10 µl.

4.3.2.2 Izolace DNA pomocí magnetického nosiče

Byla připravena separační směs dle kap. 3.7.3.3 s použitím 100 µl hrubého lyzátu buněk.

DNA eluovaná do TE pufru (eluát) a DNA v supernatantech po separaci pomocí magnetických nosičů byly detekovány agarózovou gelovou elektroforézou (Obr. č. 27).

Na gel bylo nanášeno 10 µl DNA, 5 µl TE pufru a 3 µl nanášecího pufru a hmotnostní standardy pro odhadnutí množství izolované DNA.



Běh č.	Lyzát buněk vzorku č.	Detekce izolované DNA	Přibližné množství DNA (ng/ 10 µl)	Celkové množství izolované DNA (µg/100 µl)	Poznámka
1	35 ng	+			Hmotnostní standard
2	70 ng	+			Hmotnostní standard
3	140 ng	++			Hmotnostní standard
4	210 ng	++			Hmotnostní standard
5	-	-	-	-	-
6	eluát č. 1	-	< 35	< 0,35	
7	eluát č. 2	-	< 35	< 0,35	
8	eluát č. 3	-	< 35	< 0,35	
9	eluát č. 4	-	< 35	< 0,35	
10	eluát č. 5	-	< 35	< 0,35	
11	eluát č. 6	-	< 35	< 0,35	
12	eluát č. 7	-	< 35	< 0,35	
13	supernatant č.1	+++	> 210	> 0,21	
14	supernatant č.2	+++	> 210	> 0,21	
15	supernatant č.3	+++	> 210	> 0,21	
16	supernatant č.4	+++	> 210	> 0,21	
17	supernatant č.5	+++	> 210	> 0,21	
18	supernatant č.6	+++	> 210	> 0,21	
19	supernatant č.7	+++	> 210	> 0,21	

+, ++, +++..... intenzita detekce DNA

- DNA nedetekována

Obr. č. 29: Agarózová gelová elektroforéza DNA druhu *Lactococcus lactis* izolovaná pomocí SPRI.

⇒ DNA v eluátech z magnetického nosiče nebyla detekována (<35 ng/10 µl).
Podařilo se detekovat DNA jen v supernatantech v množství větším než
210 ng/10 µl.

4.3.3 Stanovení koncentrace DNA kmenů *Lactococcus lactis*

U DNA izolované fenolovou extrakcí byla koncentrace stanovena spektrofotometricky a u DNA izolované pomocí magnetických nosičů (DNA v eluátech) fluorometricky.

4.3.3.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA izolované fenolovou extrakcí

Byla změřena absorbance při 260, 280 a 310 nm u vzorků DNA 7 kmenů *Lactococcus lactis* a následně vypočtena koncentrace DNA. Návod viz kap. 3.7.4.1. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tab. č. 18.

Tab. č. 18: *Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA 7 kmenů Lactococcus lactis získané fenolovou extrakcí*

DNA po fenolové extrakci				
Vzorek č.	A (260 nm)	A (280 nm)	A (310 nm)	c (µg/ml)
1	1,125	0,721	0,012	56,25
2	1,328	0,788	0,027	66,4
3	1,081	0,62	0,019	54,05
4	1,347	0,785	0,026	67,35
5	1,44	0,821	0,019	72
6	1,328	0,815	0,025	66,4
7	1,481	0,917	0,024	74,05
8	1,125	0,721	0,012	56,25
9	1,328	0,788	0,027	66,4
10	1,481	0,62	0,019	74,05

⇒ Koncentrace izolované DNA se pohybovala v rozmezí od 54 do 74 µg/ml. DNA je vhodná pro použití do PCR směsi.

4.3.3.2 Fluorometrické stanovení koncentrace DNA v eluátech vzorků z magnetických nosičů

Byla změřena absorbance DNA všech vzorků pomocí fluorometru. Příprava vzorků a vlastní měření viz kap. 3.7.4.2. Získané hodnoty koncentrace jsou uvedeny v Tab. č. 19.

Tab. č. 19: *Fluorometrické stanovení koncentrace DNA 7 kmenů Lactococcus lactis izolované pomocí SPRI*

Eluáty vzorků 7 kmenů č.1-7		
DNA vzorku č.	QF hodnota	c (µg/ml)
1	11,1	0,222
2	12,4	0,248
3	12,2	0,244
4	18,6	0,372
5	11	0,242
6	7,83	0,157
7	6,72	0,134

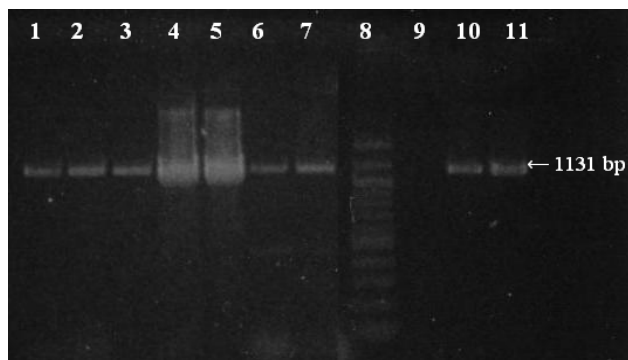
⇒ Fluorometricky byla změřena koncentrace DNA v eluátech vzorků 1-7 kmenů *Lactococcus lactis*. Hodnoty se pohybovaly od 0,13 µg/ml do 0,37 µg/ml.

4.3.4. PCR s použitím primerů PALA 4 a PALA 14

S použitím primerů PALA 4 a 14 dochází k amplifikaci specifického fragmentu o velikosti 1131 bp. PCR směs byla připravena dle kap. 3.7.6.2. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA kmene *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T o koncentraci 10 ng/μl a DNA kmene *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T o koncentraci 100 pg/μl.

4.3.4.1 PCR s použitím DNA matrice vyizolované metodou fenolové extrakce

Dle kapitoly 3.7.6.2 byla připravena PCR směs a provedena PCR. Jako DNA matrice byl použit 1 μl DNA o koncentraci 10 ng/μl. Detekce PCR produktů je uvedena na Obr. č. 30.



DNA po FE			
Běh č.	Vzorek č.	Detekce PCR produktu	Poznámka
1	1	++	
2	2	++	
3	3	++	
4	4	+++	
5	5	+++	
6	6	++	
7	7	++	
8	standard		100 bp
9	NK	-	
10	PK1	++	
11	PK2	++	

+, ++, +++..... intenzita detekce PCR produktu

- PCR produkt nedetekován

NK.....negativní kontrola

PK1.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T (10 ng/μl)

PK2.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T (1 ng/μl)

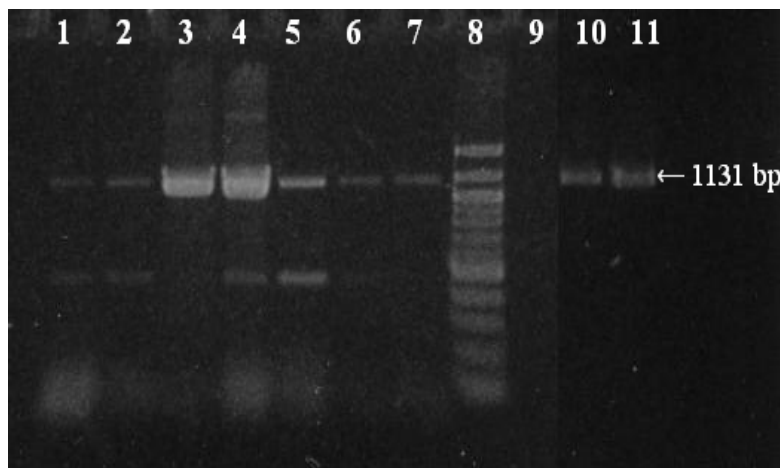
Obr. č. 30: Detekce PCR produktů 7 kmenů *Lactococcus lactis* izolovaných fenolovou extrakcí. Do PCR byl použit 1 μl DNA (10 ng/μl).

⇒ U všech vzorků DNA analyzovaných 7 kmenů *Lactococcus lactis* izolovaných pomocí magnetických nosičů se amplifikoval specifický PCR produkt. Intenzivnější PCR produkt byl detekován u vzorku č. 4 a č. 5.

4.3.4.2 PCR s použitím DNA matrice vyizolované pomocí magnetických nosičů

Byla připravena PCR směs podle kapitoly 3.7.6.2.

Jako DNA matrice byl použit 1 µl neředěné DNA. Detekce PCR produktu je zobrazena na Obr. č. 31.



DNA po SPRI			
Běh č.	Vzorek č.	Detekce PCR produktu	Poznámka
1	1	++	
2	2	++	
3	3	++	
4	4	+++	
5	5	+++	
6	6	++	
7	7	++	
8	standard		100 bp
9	NK	-	
10	PK1	++	
11	PK2	++	

+, ++, +++..... intenzita detekce PCR produktu

- PCR produkt nedetekován

NK.....negativní kontrola

PK1.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T (10 ng/µl)

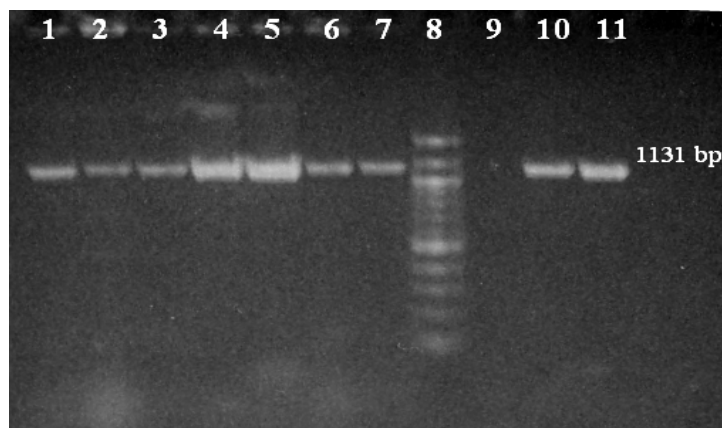
PK2.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T (1 ng/µl)

Obr. č. 31: Detekce PCR produktů 7 kmenů *Lactococcus lactis* izolovaných magnetických nosičů. Do PCR byl použit 1 µl neředěné DNA z eluátů.

⇒ U všech vzorků DNA analyzovaných 7 kmenů *Lactococcus lactis* izolovaných fenolovou extrakcí se amplifikoval specifický PCR produkt. Intenzivnější PCR produkt byl detekován u vzorku č. 4 a č. 5.

4.3.4.3 PCR s použitím DNA matrice z buněk 1 bakteriální kolonie

Jako DNA matrice byl použit 1 µl lyzátu buněk. Byla připravena PCR směs podle kapitoly 3.7.6.4. PCR produktu byl detekován agarózovou gelovou elektroforézou viz Obr. č. 32.



DNA z 1 bakteriální kolonie			
Běh č.	Vzorek č.	Detekce PCR produktu	Poznámka
1	1	++	
2	2	++	
3	3	++	
4	4	+++	
5	5	+++	
6	6	++	
7	7	++	
8	standard		100 bp
9	NK	-	
10	PK1	++	
11	PK2	++	

+, ++, +++..... intenzita detekce PCR produktu

- PCR produkt nedetekován

NK.....negativní kontrola

PK1.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T (10 ng/µl)

PK2.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T (1 ng/µl)

Obr. č. 32: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů 7 kmenů *Lactococcus lactis* s použitím 1 µl DNA matrice získané z 1 bakteriální kolonie

⇒ Byl amplifikován fragment o velikosti 1 131 bp specifický pro druh *Lactococcus lactis*. U vzorků č. 4 a č. 5 byl detekován intenzivnější PCR produkt než u ostatních vzorků.

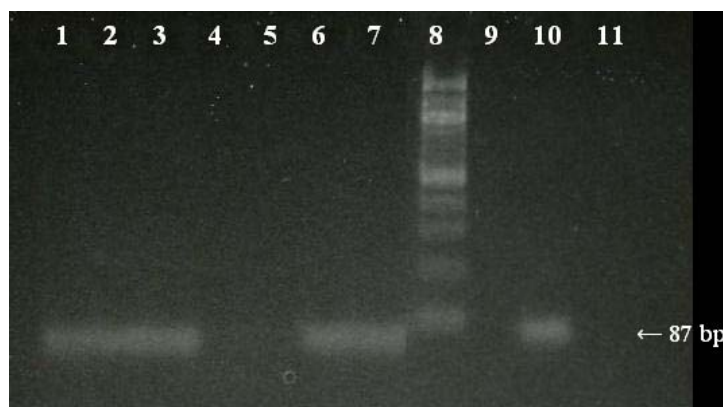
4.3.5 PCR s použitím primerů 27f a Lla

K amplifikaci specifického fragmentu o velikosti 87 bp dochází jen v případě kmene *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. U kmene *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* se neamplifikuje žádný fragment.

PCR směs byla připravena podle kap. 3.7.6.3. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA kmene *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877 o koncentraci 10 ng/μl a DNA kmene *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414 o koncentraci 10 ng/μl.

4.3.5.1 PCR s použitím DNA matrice vyizolované metodou fenolové extrakce

Dle kapitoly 3.7.6.2 byla připravena PCR směs a provedena PCR. Jako DNA matrice byl použit 1 μl DNA o koncentraci 10 ng/μl. Detekce PCR produktu je zobrazena na Obr. č. 33.



DNA po FE			
Běh č.	Vzorek č.	Detekce PCR produktu	Poznámka
1	1	+++	
2	2	+++	
3	3	+++	
4	4	-	
5	5	-	
6	6	+++	
7	7	+++	
8	standard		100 bp
9	NK	-	
10	PK1	+++	
11	PK2	-	

+, ++, +++..... intenzita detekce PCR produktu

- PCR produkt nedetekován

NK.....negativní kontrola

PK1.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T (10 ng/μl)

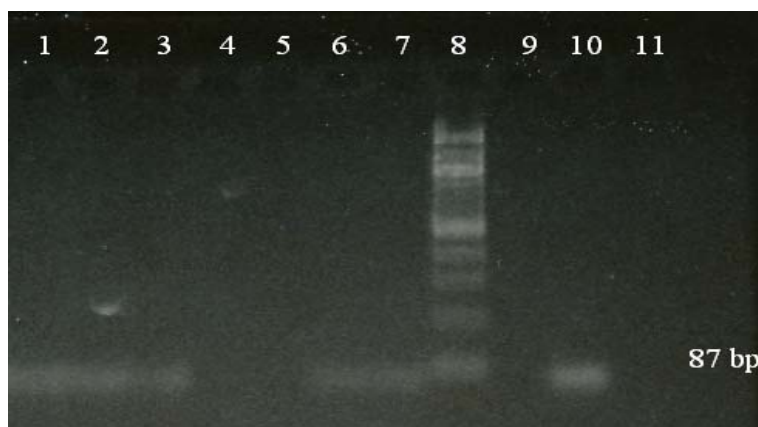
PK2.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T (10 ng/μl)

Obr. č. 33: Detekce PCR produktů po amplifikaci 7 kmenů *Lactococcus lactis* izolovaných fenolovou extrakcí. K amplifikaci byly použity primery 27f a Lla a 1 μl DNA matrice.

⇒ Specifický PCR produkt se amplifikoval s DNA vzorků č. 1, 2, 3, 5 a 6. PCR produkt nebyl detekován po amplifikaci DNA vzorků č. 4 a 5.

4.3.5.2 PCR s použitím DNA matrice vyizolované pomocí magnetických nosičů

Byla připravena PCR směs podle kapitoly 3.7.6.2. Jako DNA matrice byl použit 1 µl neředěné DNA. Detekce PCR produktu je zobrazena na Obr. č. 34.



DNA po SPRI			
Běh č.	Vzorek č.	Detekce PCR produktu	Poznámka
1	1	+++	
2	2	+++	
3	3	+++	
4	4	-	
5	5	-	
6	6	+++	
7	7	+++	
8	standard		100 bp
9	NK	-	
10	PK1	+++	
11	PK2	-	

+, ++, +++..... intenzita detekce PCR produktu

- PCR produkt nedetekován

NK.....negativní kontrola

PK1.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T (10 ng/µl)

PK2.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T (10 ng/µl)

Obr. č. 34: Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů (87 bp). Amplifikována byla DNA 7 kmenů *Lactococcus lactis* izolovaných pomocí magnetických nosičů (1 µl) s primery 27f a Lla.

⇒ Specifický PCR produkt se amplifikoval s DNA vzorků č. 1, 2, 3, 5 a 6. PCR produkt nebyl detekován po amplifikaci DNA vzorků č. 4 a 5.

4.3.5.3 PCR s použitím DNA matrice z buněk 1 bakteriální kolonie

Jako DNA matrice byl použit 1 µl lyzátu buněk připravených z 1 bakteriální kolonie (viz 3.7.6.3.4). Byla připravena PCR směs podle kapitoly 3.7.6.2 a provedena PCR.

PCR produktu byl detekován agarózovou gelovou elektroforézou viz Obr. č. 35.



DNA z 1 bakteriální kolonie			
Běh č.	Vzorek č.	Detekce PCR produktu	Poznámka
1	1	+++	
2	2	+++	
3	3	+++	
4	4	-	
5	5	-	
6	6	+++	
7	7	+++	
8	standard		100 bp
9	NK	-	
10	PK1	+++	
11	PK2	-	

+, ++, +++..... intenzita detekce PCR produktu

- PCR produkt nedetekován

NK.....negativní kontola

PK1.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCM 1877^T (10 ng/µl)

PK2.....pozitivní kontrola *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CCM 7414^T (10 ng/µl)

Obr. č. 35: Detekce PCR produktů 7 kmenů *Lactococcus lactis* s použitím DNA matrice (1 µl) získané z 1 bakteriální kolonie. DNA byla amplifikována v PCR s primery 27f a Lla.

⇒ Pomocí primerů 27f a Lla byl detekován specifický PCR produkt pro *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* o velikosti 87 bp u vzorků č. 1, 2, 3, 6, 7. U vzorků č. 4 a 5 nedošlo k amplifikaci žádného fragmentu.

4.3.6 Shrnutí výsledků PCR 7 kmenů *Lactococcus lactis* a jejich taxonomické zařazení do poddruhů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*

Výsledky amplifikace jsou uvedeny v Tab. č. 20. Pro všechny PCR reakce byl použit 1 µl DNA matrice.

Tab. č. 20: Detekce PCR produktů po amplifikaci DNA izolované ze 7 kmenů *Lactococcus lactis* sbírky Laktoflora

Vzorek č.	Kmen <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	PCR produkt/ primery/ metoda izolace					
		PALA 4, PALA 14 (1 131 bp)			27f, Lla (87 bp)		
		FE 1 µl	SPRI 1 µl	DNA z 1 bakt. kolonie 1 µl	FE 1 µl	SPRI 1 µl	DNA z 1 bakt. kolonie 1 µl
1	418/02	+	+	+	+	+	+
2	LC 416 Nip+	+	+	+	+	+	+
3	731/03 Nip +	+	+	+	+	+	+
4	HMM 4	+	+	+	-	-	-
5	S32	+	+	+	-	-	-
6	71/02	+	+	+	+	+	+
7	414/02	+	+	+	+	+	+

+ PCR produkt detekován

- PCR produkt nedetekován

⇒ Pomocí primerů PALA 4 a PALA 14 byl detekován specifický PCR produkt o velikosti 1131 bp u všech vzorků. Bylo prokázáno, že se jedná o kmeny *Lactococcus lactis*.

⇒ Pomocí primerů 27f a Lla byl detekován specifický PCR produkt o velikosti 87 bp u vzorků č. 1, 2, 3, 6 a 7. Bylo prokázáno, že se jedná o kmeny *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*.

Pomocí primerů 27f a Lla nedošlo k amplifikaci PCR produktu o velikosti 87 bp u vzorků č. 4 a č.5, jde tedy o kmeny *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*.

5. DISKUZE

V současné době jsou stále více zkoumány genetické vlastnosti bakterií mléčného kvašení (BMK), které mají široké uplatnění v potravinářském průmyslu. Neustálý vývoj v molekulární biologii umožňuje rozšiřování těchto znalostí. Nejdůkladněji geneticky prozkoumaným druhem BMK je *Lactococcus lactis*, jehož genom byl kompletně sekvenován.

Cílem diplomové práce bylo optimalizovat metodu izolace DNA ze vzorků tvrdých sýrů a provést následnou identifikaci bakterií druhu *Lactococcus lactis* pomocí polymerázové řetězové reakce. Ze Sbírký Laktoflora bylo dodáno 7 kmenů rodu *Lactococcus lactis* k ověření jejich taxonomického zařazení do druhu a poddruhů. Tyto kmeny jsou producenty bakteriocinů, což je významná vlastnost z hlediska potravinářství.

Optimalizace přípravy vzorků z tvrdých sýrů byla zaměřena na homogenizaci vzorku, jeho resuspendování ve sterilní vodě a odstranění tuhého podílu vzorků sýrů. Toho bylo dosaženo dokonalým rozetřením v třecí misce. Filtrací této směsi byla odstraněna tuková vrstva a získaný filtrát byl použit pro přípravu hrubých lyzátů buněk. Bylo použito 1,5 ml filtrátu buněk. Uvedený objem vzorku však byl v některých případech nedostačující pro další práci a proto bylo zvoleno větší množství filtrátu (3 ml). Optimální způsob přípravy je uveden v příloze č. I.

Získané hrubé lyzáty buněk ze vzorků tvrdých sýrů byly použity k izolaci DNA pomocí magnetického nosiče Fkol77ox. Nosiče se k izolaci DNA použily z důvodu snížení výskytu falešně negativní výsledků způsobené přítomností inhibitorů PCR ve vzorku. Ve vzorcích tvrdých sýrů jsou hlavními inhibitory vápenaté ionty, plazmin a proteinasa. Jako kontrola byla provedena fenolová extrakce. Metodou fenolové extrakce se podařilo izolovat větší množství DNA než s použitím magnetického nosiče. Gelovou elektroforézou na agaróze DNA nebyla detekována ani v eluétech ani v supernatantech vzorků. Pomocí agarózové gelové elektroforézy je možné detekovat množství DNA větší než 30 ng. Pro polymerázovou řetězovou reakci je ale toto množství postačující.

Pro přípravu PCR směsí byl vypracován optimální způsob s použitím DNA izolované fenolovou extrakcí a pomocí magnetických nosičů z hrubých lyzátů buněk. U analyzovaných vzorků došlo k detekci specifického fragmentu. DNA byla použita v množství 1 µl a 3 µl pro identifikaci druhu *Lactococcus lactis*. Pro dosažení větší robustnosti bylo vhodné použít 3 µl vzorku. K identifikaci kmene *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* bylo postačující množství 1 µl vzorku.

Ve všech deseti analyzovaných vzorcích sýrů byla pomocí amplifikačních metod prokázána přítomnost DNA druhu *Lactococcus lactis* s použitím specifických primerů primerů PALA 4 a PALA 14. DNA bylo nutné izolovat z většího množství filtrátu buněk (3ml). Neoptimálnější množství PCR komponent a DNA matrice je uvedeno v příloze č.II.

K identifikaci poddruhu *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* byly použity primery 27f a Lla. U některých vzorků sýrů však nebyl detekován PCR produkt (negativní reakce), zřejmě z důvodu nízké koncentrace DNA nebo přítomnosti inhibitorů PCR a to jak v případě použití DNA izolované pomocí fenolové extrakce, tak pomocí magnetických nosičů z 1,5 ml filtrátu buněk vzorků sýrů. S použitím 3 ml filtrátu byl PCR produkt detekován u všech vzorků DNA separované pomocí magnetických nosičů ze 3 ml filtrátu buněk. Jedná se o podruhy *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. U poddruhu *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* s těmito primery nebyl získán žádný PCR produkt.

Sbírka mlékařských kultur Laktoflora obsahuje cenný genofond bakterií mléčného kvašení v České republice. Pro jejich využití v praxi je nezbytná jednoznačná identifikace kmenů pomocí nejnovějších molekulárně genetických postupů. Pomocí druhově specifické PCR (primery PALA 4 a PALA 14) pro druh *Lactococcus lactis* bylo 7 kmenů Sbírký Laktoflora zařazeno do tohoto druhu. PCR s použitím primerů 27f a Lla umožnilo zařadit 5 kmenů do poddruhu *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (*L. lactis* ssp. *lactis* 418/02, *L. lactis* ssp. *lactis* LC 416 Nip+, *L. lactis* ssp. *lactis* 731/03 Nip+, *L. lactis* ssp. *lactis* 71/02 a *L. lactis* ssp. *lactis* 414/02) a 2 kmeny do poddruhu *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (*L. lactis* ssp. *lactis* HMM4 a *L. lactis* ssp. *lactis* S32). V případě DNA kmene *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* nedošlo k amplifikaci žádného fragmentu. Na základě docílených výsledků bude navržena reklasifikace dvou kmenů druhu *Lactococcus lactis* na *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HMM4 a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* S32.

Pro PCR byla použita DNA izolovaná fenolovou extrakcí, pomocí magnetických nosičů a DNA izolovaná z 1 bakteriální kolonie. Ve všech případech se amplifikovaly či neamplifikovaly specifické PCR produkty (viz výše). Pomocí více opakování izolace DNA různými postupy bylo ověřeno, že kmeny *Lactococcus lactis* byly správně zařazeny do poddruhů. Výsledky jsou uvedeny v příloze č.III.

6. ZÁVĚR

Byla vypracována a optimalizována metoda přípravy vzorků tvrdých sýrů pro izolaci DNA v kvalitě pro následné použití v PCR. K izolaci DNA byla použita metoda neselektivní adsorpce DNA na hydrofilní magnetické částice. Jako kontrola byla použita fenolová extrakce.

Byl optimalizován způsob přípravy PCR směsí s použitím DNA, izolované fenolovou extrakcí a pomocí magnetických nosičů, který vedl k detekci specifického amplikonu. Druh *Lactococcus lactis* a poddruh *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* byl prokázán ve všech analyzovaných vzorcích tvrdých sýrů.

Sedm kmenů ze Sbírký Laktoflora, původně zařazených do poddruhu *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* bylo pomocí druhově specifické PCR zařazeno do druhu *Lactococcus lactis*. Do poddruhu *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* bylo zařazeno 5 kmenů. Ve dvou případech se jednalo o zařazení do poddruhu *L. lactis* ssp. *cremoris* a to u kmenů *L. lactis* HMM4 a *L. lactis* S32.

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Botina, S.G., Tsygankov, Yu. D., Sukhodolets ,V. V., *Identification of Industrial Strains of Lactic Acid Bacteria by Methods of Molecular Genetic Typing*. Russian Journal of Genetics, 2006, Vol. 42, No. 12, pp. 1367 – 1379.
2. Axelsson, L. *Lactic acid bacteria: Clasification and Physiology*. In *Lactic acid bacteria*. Microbiological and functional aspects, 2004. pp. 1-66. Edited by S. Salminen, A. von Wright & A. Ouwehand. New York: Marcel Dekker, Inc.
3. Prodělalová Jana, *Molekulární diagnostika potravinářsky významných mikroorganismů*, 2004. Dizertační práce, PŘF MU Brno.
4. Görner, F., Valík, L', *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*, 1. vydání 2004, Vydavateľství MALÉ CENTRUM, Bratislava.
5. Sherman, J. M., *Streptococcus Lactis and the Streptococci of the So-called Lactic Group*, Journal of dairy Science, 1955, 38:1077-1187, Cornell University, Ithaca, New York.
6. Stiles, M. E., Holzapfel, W. H., *Lactic acid bacteria of foods and their taxonomy*, International Journal of Food Microbiology, 1997, 36: 1-29.
7. van Hycklama Vlieg, J.ET, Rademaker, J. LW, Bachmann, H., Molenaar, D., Kelly, W. J, Siezen, R. J, *Natural diversity and adaptive responses of Lactococcus lactis*, Current Opinion in Biotechnology, 2006, 17: 183-190.
8. Adams M.R., *Safety of industrial lactic acid bacteria*, Journal of Biotechnology, 1999, 68: 171-178.
9. Salminen, S., von Wright, A., *Current Probiotics – Safety Assured*, Scandinavian University Press, 1998, ISSN 0891-060X.
10. Buyong, N., Kok, J., Luchansky, J.B., *Use of a Genetically Enhanced, Pediocin-Producing Starter Culture Lactococcus lactis subsp. lactis MM217, To Kontrol Listeria monocytogenes in Cheddar Cheese*, Applied and Environmental Mikrobiology, 1998, Vol. 64, No. 12, p. 4842-4845.
11. Caplice, E., Fitzgerald, G. F., *Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation*, International Journal of Food Mikrobiology, 1999, 50: 131-149.
12. Chen, H., Hoover, D. G., *Bacteriocins and their Food Applications*, Comprehensive Rewiews in Food Science and Food Safety, 2000, Vol.2, 82-100.
13. De Vuyst, L., Leroy, F., *Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification and Food Applications*, J Mol Microbiol Biotechnol, 2007, 13: 194-199.

14. Soomro, A. H., Masud, T., Anwaar, K., *Role of Lactic Acid Bacteria in Food Preservation and Human Health*, Pákistán Journal of Nutrition, 2002, 1: 20-24.
15. Holo, H., Nilssen, Nes, I. F., *Lactococcin A, a New Bacteriocin from Lactococcus lactis subsp. cremoris: Isolation and Characterization of the Protein and Its Gene*, Journal of Bacteriology, 1991, Vol. 173, No. 12, 3897-3887.
16. Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarne, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D., Sorokin, A., *The Complete Genome Sequence of the Lactic Acid Bacterium Lactococcus lactis ssp. lactis IL1403*, Geonome Research, 2001, 11: 731-753.
17. Dráber, P., Petříček, M., Boubelík, M., Brdlička, R., Zadina, J., *PCR a limitace její šitší aplikace. Pokroky v PCR technologii a jejím využití. Pracovní materiály semináře*, 1993, 1 – 19, Ústav molekulární genetiky AV ČR, Praha.
18. [online], www.karymullis.com, [citace 2008-21-04]
19. Rychlík, W., Spenser, W. J., Rhoads, R. E., *Optimalization of the annealing temperature for DNA amplif. in vitro*, 1990, *Nucleic Acid Res.* 18/21: 6409-6412.
20. Krčmář, M., Břicháček, B., *Molekulární biologické metody ve virologické diagnostice*, 1993, Praha
21. Chromý, V., *Analytické metody v klinické chemii*, 2000, Masarykova univerzita, 150-157 str.
22. Sambrook, J., Russel, D. W., *Molecular cloning. A laboratory manual (I, II, III)*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press, New York.
23. [online], www.juliantrubin.com/encyclopedia/biochemistry/per.html, [citace 2008-21-04]
24. Čikoš, Š., Koppel, J., Kantíková, M., *Polymerázová reťazová reakci a jej použití v biologickom výskume a diagnostike*, 2001, Ústav fyziologie hospodárských zvierat, SAV Košice.
25. Jenkins, F., J., *Basic Methods for the Detection of PCR Products*, Genome Research, 1994, 3: 77-82.
26. Králová, B. a kol., *Bioanalytické metody*, 2001, 3. vydání, ISBN 978-80-7080-449-3.
27. Buist, G., Kok, J., Leenhouts, K. J., Dabrowska, M., Venema, G., Haandrikman, A. J., *Molecular Cloning and Nukleotide Sequence of the Gene Encoding the Major*

Peptidoglycan Hydrolyse of Lactococcus lactis, a Muramidase Needed for Cell Separation, Journal of Bacteriology, 1995, p. 1554-1563.

28. Barakat, R. K., Griffiths, M. W. Hartus, L. J., *Isolation and characterization of Carnobacterium, Lactococcus, and Enterococcus ssp. from cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated, poultry meat*, 2000, Department of Food Science, University of Guelph.
29. [online], www.top-bio.cz, [citace 2008-21-04]
30. Průša, R., *Základy analytických metod v klinické molekulové biologii*, 1997, Vydala 2. lékařská fakulta UK a LAMBDA BIO-MED spol. s.r.o., Praha, ISPN 80-238-0940-7.
31. Wilson, I. G., *Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification*, Appl. Environ. Microbiol., 1997, 63: 3741-3751.
32. Saunders, G. C., Hopkins, D., *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Analysis*. In: Saunders Molecular Biology Duality and Validation, 1999, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 103-122.
33. Powell, H., Holding, L. M., Garrett, S. D., Lund, B. M., McKee, R. A., *Proteinase inhibition of the detection of Listeria monocytogens in milk using the polymerase chain reaction*, Lett. Appl. Microbiol., 1994, 18: 59-61.
34. Kateřina Petrová, *Identifikace bakterií mléčného kvašení (BMK) v mléčných výrobcích s využitím metod amplifikace DNA*, 2004. Diplomová práce, PřF MU Brno, str. 24.
35. Rittich, B., Španová, A., Horák, D., Beneš, M.J., Klesnilová, L., Petrová, K., Rybničkář, A., *Isolation of microbial DNA by newly designed magnetic particles*, 2006, Colloid and Surface B: Biointerfaces 52: 146-148.
36. Rudolf, I., *Testování aktivity DNázy I imobilizované na magnetických nosičích při degradaci různých druhů DNA*, 2001, Diplomová práce, PřF MU Brno.
37. Šafařík, I., Šafaříková, M., *Use magnetic technique for the isolation of cells*, J. Chromatogr.B., 1999, 722: 33-53.
38. Turková, J., *Bioaffinity Chromatography. Second Complete Revised Edition*, Journal of Chromatography, 1993, Library. Vol. 55. Elsevier, Amsterdam.

10. PŘÍLOHY

I. Optimální příprava hrubého lyzátu DNA v kvalitě vhodné pro PCR ze vzorků tvrdých sýrů

Filtrát sýrů byl připraven odvážením 5 g z každého vzorku, vložen do třecí misky a rozetřen se 7,5 ml sterilní vody (1,5 ml sterilní vody na 1 g vzorku). Po důkladném rozetření byl vzorek zfiltrován přes sterilní gázu do sterilní zkumavky.

3 ml tohoto filtrátu bylo odebráno do mikrozukavky a zcentrifugováno při 10 000 ot./5 min. Supernatant byl slit a sediment nechán okapat. Byl zopakován předchozí krok s použitím 1 ml sterilní vody.

K sedimentu byl přidán 1 ml lyzačního roztoku B s lysozymem 3mg/ml (nejprve bylo přidáno 100 µl a potom 900 µl) a vzorek byl důkladně rozsuspendován. Vzorek byl inkubován po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Po 1 hodině inkubace při laboratorní teplotě bylo přidáno 50 µl 20% SDS a 5 µl proteinázy K (1 mg/ml). Vzorky byly inkubovány při 55 °C do dalšího dne. Takto získaný hrubý lyzát buněk byl použit pro izolaci DNA fenolovou extrakcí a pro separaci pomocí magnetických nosičů.

Separační směs pro izolaci DNA pomocí magnetického nosiče byla připravena následovně: Směs uvedená níže byla promíchána a nechána inkubovat 15 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly částice s navázanou DNA odseparovány pomocí magnetu po dobu 15 minut při laboratorní teplotě.

Separační směs pro izolaci DNA magnetickým nosičem

Pořadí komponent	Komponenta	Objem komponenty (µl)
1.	H ₂ O	200
2.	NaCl (5M)	400
3.	hrubý lyzát buněk *	100
4.	PEG 6000 (40%)	200
5.	Magnetické částice Fkol77ox. (2mg/ml)	100
Výsledný objem vzorku		1000

Po separaci pomocí magnetu byl supernatant slit a uvolněn magnet z magnetického pásu. Obsah zkumavky obsahující magnetické nosiče s navázanou DNA byl promyt 70% ethanolem, v množství jaké měla separační směs (1 ml). Částice byly odseparovány pomocí magnetu po dobu 2 min při laboratorní teplotě. Po separaci byl supernatant slit a magnet uvolněn. Zkumavky byly vysušeny v termostatu po dobu 10 min při teplotě 55° C do odpaření ethanolu.

Vysušená DNA byla eluována do stejného množství TE pufru jako bylo hrubého lyzátu v separační směsi, tj. 100 µl po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Částice byly odseparovány pomocí magnetu po dobu 2 minut při laboratorní teplotě. Eluovaná DNA (eluát) byla přepipetována do čisté mikrozukavky a použita pro PCR reakci.

II. Optimální složení PCR směsi s použitím DNA izolované ze 3 ml filtrátu pomocí magnetického nosiče

Komponenta	Objem (μl)
PPP Master Mix	10,5
5' primer	1
3' primer	1
DNA matrice (z 3 ml filtrátu)	3
PCR voda	9,5

K identifikaci druhu *L. lactis* byly použity primery PALA 4 a PALA 14 a pro poddruh *L. lactis* ssp. *lactis* primery 27f a Lla.

III. Taxonomické zařazení analyzovaných kmenů *L. lactis* do poddruhů

Kmen <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	PCR produkt/ primery/ metoda izolace						Navrhované zařazení kmenů <i>Lactococcus</i> <i>lactis</i> ssp. do poddruhu
	PALA 4, PALA 14 (1 131 bp)			27f, Lla (87 bp)			
	FE 1 µl	SPRI 1 µl	DNA z 1 bakt. kolonie 1 µl	FE 1 µl	SPRI 1 µl	DNA z 1 bakt. kolonie 1 µl	
418/02	+	+	+	+	+	+	<i>lactis</i>
LC 416 Nip+	+	+	+	+	+	+	<i>lactis</i>
731/03 Nip +	+	+	+	+	+	+	<i>lactis</i>
HMM 4	+	+	+	-	-	-	<i>cremoris</i>
S32	+	+	+	-	-	-	<i>cremoris</i>
71/02	+	+	+	+	+	+	<i>lactis</i>
414/02	+	+	+	+	+	+	<i>lactis</i>
	+	+	+	+	+	+	<i>lactis</i>

+PCR produkt detekován

-PCR produkt nedetekován

FE.....fenolová extrakce

SPRI.....izolace DNA magnetickým nosičem

PALA 4, PALA 14druhově specifické primery

27f, Llapoddruhově specifické primery

Identifikace bakterií mléčného kvašení v tvrdých sýrech s využitím amplifikačních metod

Pro rychlou identifikaci mikroorganismů v potravinách se v současné době využívají molekulárně biologické postupy, např. polymerázová řetězová reakce (PCR). V této práci byla zavedena metoda PCR k identifikaci bakterií druhu *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.

Při analýze reálných vzorků byly v řadě případů získány falešně negativní výsledky, které byly způsobeny přítomností inhibitorů PCR v analyzovaných vzorcích. Práce byla zaměřena na izolaci DNA v kvalitě vhodné pro PCR. K tomuto účelu byly použity magnetické částice v přítomnosti polyethylenglykolu (PEG 6000) a chloridu sodného (Křížová a spol., 2005). Jako kontrola byla použita DNA izolovaná metodou fenolové extrakce - Sambrook a Russel (2001).