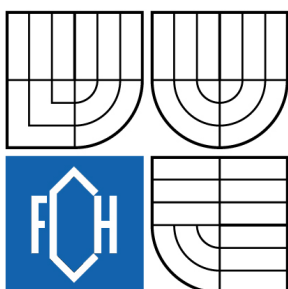




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

IDENTIFIKACE PROBIOTICKÝCH LAKTOBACILŮ V MLÉČNÝCH VÝROBCÍCH

IDENTIFICATION OF PROBIOTIC LACTOBACILI IN DAIRY PRODUCTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

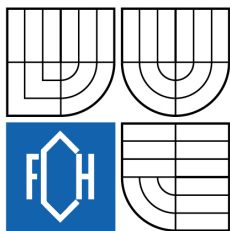
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

KVĚTOSLAVA DOFKOVÁ

VEDOUcí PRÁCE
SUPERVISOR

doc. RNDr. ALENA ŠPANOVÁ, CSc.

BRNO 2009



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0343/2008	Akademický rok: 2008/2009
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Květoslava Dofková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Biotechnologie (2810R001)	
Vedoucí bakalářské práce:	doc. RNDr. Alena Španová, CSc.	
Konzultanti bakalářské práce:		

Název bakalářské práce:

Identifikace probiotických laktobacilů v mléčných výrobcích

Zadání bakalářské práce:

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

Termín odevzdání bakalářské práce: 29.5.2009

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

Květoslava Dofková
Student(ka)

doc. RNDr. Alena Španová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou součástí střevní mikroflóry, jejíž složení ovlivňuje zdravotní stav hostitele. Vzhledem k tomu, že u některých druhů *Lactobacillus* byly prokázány klinické účinky (např. posílení imunitního systému, prevence průjemových onemocnění a další), jsou laktobacily často používány k přípravě fermentovaných mléčných výrobků nebo farmakologických preparátů.

Pro identifikaci bakterií rodu *Lactobacillus* v mléčných výrobcích byla vyvinuta metoda PCR, která je založena na amplifikaci fragmentu DNA představující oblast mezi geny kódující 16S a 23S rRNA.

Celková DNA izolovaná metodou fenolovou extrakce z výrobku Actimel Natur byla v této práci amplifikována rodově specifickou PCR. Detekcí specifického PCR produktu byla prokázána přítomnost bakterií rodu *Lactobacillus* ve výrobku. Provedením druhově specifické PCR byla ve výrobku Actimel Natur detekována přítomnost probiotického druhu *Lactobacillus casei* (ve výrobku Actimel Natur) v množství, které se přibližně shodovalo s deklarovaným údajem.

ABSTRACT

The genus *Lactobacillus* is part of intestinal microbiota which constitution plays important role in health and well-being of the host. Probiotic properties of lactobacilli have been studied in lot of studies and clinical effects (immune enhancement, prevention of diarrhoeal disease etc.) of some probiotic species have been documented. Therefore bacteria of genus *Lactobacillus* are used in the production of fermented dairy products and probiotic preparations.

PCR method based on amplification of 16S – 23S rRNA intergenic spacer regions was developed for identification of *Lactobacillus* species presented in dairy products.

Whole DNA obtained by phenol extraction from dairy product Actimel Natur was used in this work as template for PCR. Purified DNA was amplified by genus-specific PCR. Bacteria of genus *Lactobacillus* were detected due to the detection of specific PCR product. Using species-specific PCR probiotic species *Lactobacillus casei* was detected in the Actimel Natur in quantity that approximately corresponded to declared amounts.

KLÍČOVÁ SLOVA

rod *Lactobacillus*, probiotika, identifikace, rodově specifická PCR, druhově specifická PCR

KEYWORDS

genus *Lactobacillus*, probiotics, identification, genus-specific PCR, species-specific PCR

DOFKOVÁ, K. *Identifikace probiotických laktobacilů v mléčných výrobcích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 38 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji doc. Aleně Španové, Csc. za její čas, trpělivost a cenné rady, které mi věnovala při zpracování zadaného tématu bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat všem, kteří se podíleli na zdárném dokončení této práce, zejména Janě Tvrdíkové, Barboře Ůrgeové a Ivoně Syslové za metodickou pomoc v laboratoři.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Bakterie rodu <i>Lactobacillus</i>	8
2.1.1	Metabolismus	9
2.1.2	Laktobacily a zdraví	10
2.1.2.1	Probiotika a požadavky na probiotika	10
2.1.2.2	Probiotické laktobacily	11
2.1.2.3	Účinek probiotik	12
2.1.2.3.1	Bakteriociny	13
2.1.2.4	Prebiotika	14
2.1.3	Využití rodu <i>Lactobacillus</i> v potravinářství	14
2.1.3.1	Termofilní sýrařské zákysové kultury	14
2.1.3.2	Termofilní jogurtové kultury	15
2.2	Identifikace probiotických laktobacilů pomocí PCR	15
2.2.1	Průběh PCR	15
2.2.2	DNA templát	17
2.2.3	Deoxyribonukleosidtrifosfáty (dNTP)	17
2.2.4	Požadavky na primery	17
2.2.5	Koncentrace Mg^{2+}	18
2.2.6	Termostabilní DNA polymeráza	18
2.2.7	Hot-start v PCR	19
2.2.8	Inhibice PCR a zdroje chyb v PCR	19
2.2.9	Optimalizace PCR	20
2.3	Detekce PCR produktů pomocí agarosové gelové elektroforézy	20
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
3.1	Použitý probiotický mléčný výrobek	21
3.2	Chemikálie	21
3.2.1	Chemikálie pro lyzi bakteriálních buněk	21
3.2.2	Chemikálie pro purifikaci DNA	22
3.2.3	Komponenty pro PCR	22
3.2.4	Komponenty pro agarosovou gelovou elektroforézu	22
3.3	Pomůcky a přístroje	23
3.4	Použité metody	23
3.4.1	Příprava hrubých lyzátů buněk z mléčného výrobku	23
3.4.2	Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk	23
3.4.2.1	Fenolová extrakce DNA	24
3.4.2.2	Přesrážení DNA ethanolem	24
3.4.3	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA	24
3.4.4	Agarosová gelová elektroforéza hrubých lyzátů buněk a bakteriální DNA	24
3.4.5	Rodově a druhově specifická PCR s purifikovanou DNA	25
3.4.5.1	Příprava PCR směsi	25
3.4.5.2	Průběh amplifikace	26
3.4.5.3	Detekce rodově a druhově specifického PCR produktu agarosovou gelovou elektroforézou	27
4	VÝSLEDKY	28

4.1	Izolace celkové DNA z výrobku Actimel	28
4.2	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z výrobku Actimel.....	28
4.2.1	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z výrobku Actimel po opakované purifikaci.....	29
4.3	Rodově specifická PCR <i>Lactobacillus</i> s celkovou DNA izolovanou z Actimelu....	29
4.4	Druhově specifická PCR <i>Lactobacillus casei</i> s celkovou DNA izolovanou z Actimelu.....	30
4.5	Stanovení nejnižšího množství DNA izolované z výrobku Actimel Natur dávající pozitivní PCR produkt	31
5	DISKUZE	32
5.1	Izolace bakteriální DNA metodou fenolové extrakce	32
5.2	Stanovení kvality a kvantity DNA izolované z mléčného výrobku Actimel Natur .	32
5.3	Rodově specifická PCR <i>Lactobacillus</i>	33
5.4	Druhově specifická PCR <i>Lactobacillus casei</i> a stanovení její citlivosti.....	33
6	ZÁVĚR	34
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	35
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	38

1 ÚVOD

Mikroflóra GIT představuje vysoce složitý ekosystém, přičemž současné znalosti o tomto ekosystému jsou stále omezené. Uvádí se, že povrch GIT je velký asi 150 – 200 m². Je to obrovský prostor pro interakci buněk během trávení a pro adhezi buněk ke stěně mukózy i pro kolonizaci, která ji provází. GIT u dospělých lidí obsahuje asi 10¹⁴ živých bakteriálních buněk. Význam těchto bakterií se dlouho opomíjel a zájem se soustřeďoval pouze na střevní patogenní mikroorganismy a jiné faktory související se střevními obtížemi [1]. Díky přemnožení patogenů vznikají akutní průjemová onemocnění, zánětlivá onemocnění střev (např. Crohnova choroba) nebo rakovina tlustého střeva [2].

Gastrointestinální mikroflóra má významný vliv na zdravotní stav člověka. Nepoškozený střevní epitel s normální střevní mikroflórou představuje bariéru pro patogenní mikroorganismy, antigeny a jiné škodlivé látky z lumenu. U zdravých jedinců je tato bariéra pevná, zajišťuje ochranu hostitele a umožňuje normální funkci střeva a imunologickou odolnost. Kromě bariérové funkce se střevní mukóza podílí na imunitní odezvě. Střevní mikroflóra sama o sobě je nezbytná pro aktivaci mukózní imunity a amplifikaci imunokompetentních buněk [1].

Během posledních let je věnováno značné úsilí zlepšení zdravotního stavu populace modulací střevní mikroflóry hostitele prostřednictvím živých mikroorganismů, které jsou označovány jako probiotika. Probiotika lze definovat jako monokultury nebo směsné kultury živých mikroorganismů, které prospěšně ovlivňují hostitele zlepšením stavu jeho vlastní mikroflóry [1]. Do GI traktu se dostávají spolu s potravou.

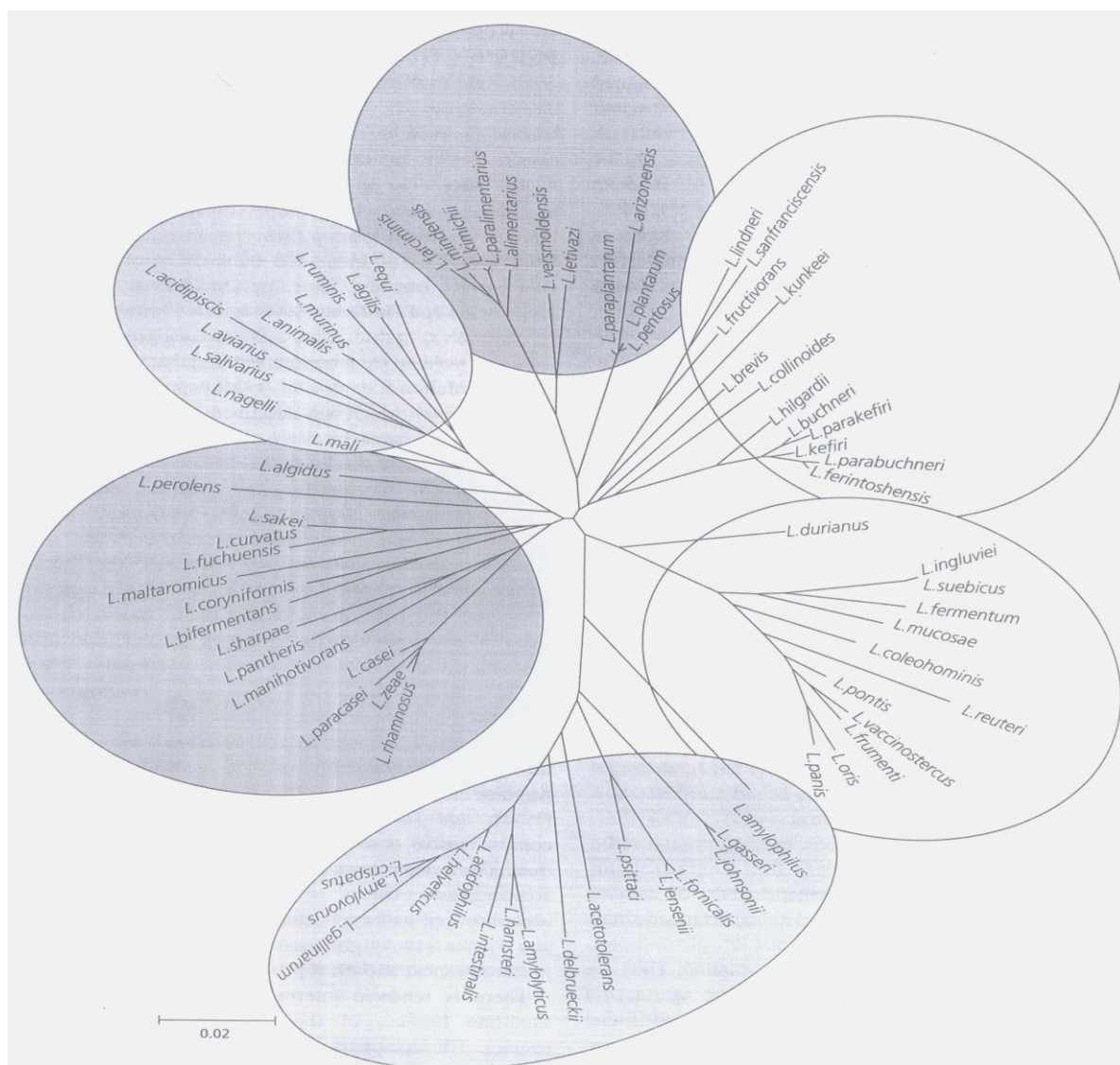
Vzrůstající zájem o zdravý životní styl vede k využívání probiotik v celé řadě mléčných výrobků a potravinářských doplňků. Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou skupinou těch nejvyužívanějších. Využívání probiotických druhů laktobacilů vyžaduje jejich jednoznačnou charakteristiku a identifikaci. K tomu se využívají především moderní molekulárně genetické metody [3].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Bakterie rodu *Lactobacillus*

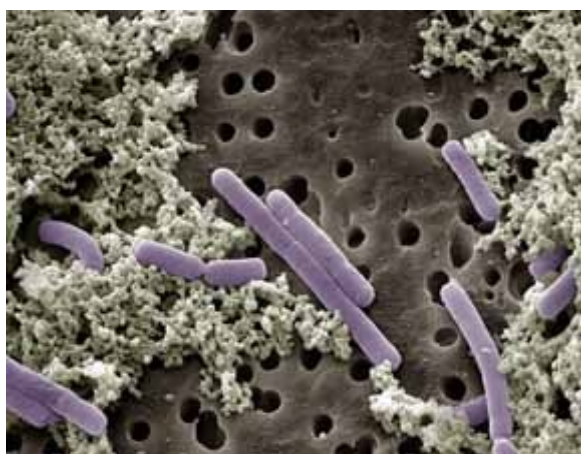
Název *Lactobacillus* byl odvozen z latinského slova lac = mléko, protože zástupci tohoto rodu jsou schopni zkvašovat cukry na kyselinu mléčnou [4].

Poprvé byl tento rod popsán už v roce 1901 (Beijenrinck). Zástupci rodu byli rozděleni do skupin podle fenotypových vlastností: podle růstového teplotního optima a následně podle způsobu zkvašování hexos (Orla-Jensen, 1919). S vývojem molekulární biologie došlo k reorganizaci taxonomie. Identifikace nových zástupců rodu *Lactobacillus* je založena na analýze 16S rRNA [5]. Nedávné výzkumy vycházející z analýzy 16S rRNA vedly k zařazení určité skupiny heterofermentativních laktobacilů do nového rodu *Carnobacterium* [6].
Fylogenetický strom zástupců rodu *Lactobacillus*, u nichž je známa sekvence genu pro 16S rRNA, je uveden na Obr. 1.

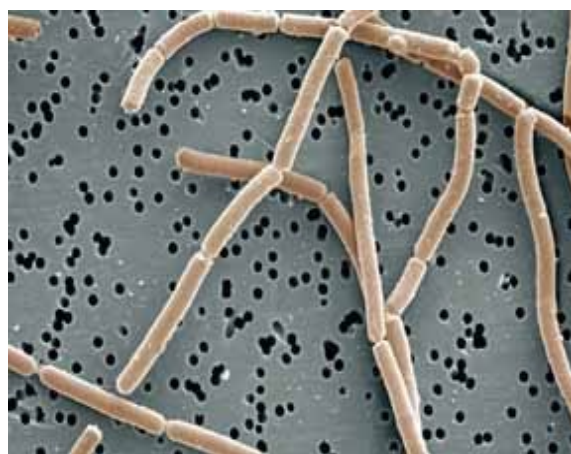


Obr. 1: Fylogenetický strom zástupců rodu *Lactobacillus* [4]

Lactobacily jsou velmi různorodou skupinou bakterií, což lze dokázat obsahem C+G v DNA různých druhů, který se pohybuje mezi 33 – 55 % [7]. Podle Bergeyho manuálu (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 2001) patří rod *Lactobacillus* do skupiny grampozitivních, nesporulujících tyčinek. Zástupci rodu jsou nepohybliví, chemoorganotrofní, z hlediska nároku na kyslík jsou považovány za mikroaerofilní, fakultativně aerobní či striktně anaerobní. Laktobacily běžně rostou na vzduchu, ale lepších výsledků při kultivaci lze dosáhnout v atmosféře, která je obohacena o oxid uhličitý [4]. Všeobecně jsou považovány za acidotolerantní až acidofilní [7]. Optimální teplota pro růst většiny druhů rodu *Lactobacillus* se pohybuje mezi 37 – 40 °C. Laktobacily jsou poměrně náročné na růstové látky. K jejich pěstování *in vitro* se používá tekutá nebo pevná půda, zejména MRS medium nebo agarová půda podle Rogosy [4]. Morfologie buněk druhu *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus bulgaricus* je uvedena na obr. 2, 3 [8].



Obr. 2: *Lactobacillus casei*



Obr. 3: *Lactobacillus bulgaricus*

2.1.1 Metabolismus

Laktobacily jsou metabolicky na hranici mezi aerobním a anaerobním způsobem životem. Energii získávají fermentací sacharidů, za využití jedné z dvou možných metabolických drah, za vzniku kyseliny mléčné. Na základě těchto znalostí jsou laktobacily v současné době rozděleny do tří skupin [6]:

- obligátně homofermentativní
- fakultativně heterofermentativní
- obligátně heterofermentativní

U obligátně homofermentativních laktobacilů se fermentace hexózy uskutečňuje podle Embden-Meyerhofovy metabolické dráhy, kdy dochází k přeměně hexózy skoro výlučně na kyselinu mléčnou (>90%). Pentózy a glukonáty nefermentují. Mezi zástupce této skupiny patří např. druhy *L. acidophilus* nebo *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* [7].

Fakultativně heterofermentativní laktobacily fermentují hexózu na kyselinu mléčnou jako jediný produkt, pokud je koncentrace hexózy v prostředí dostatečná. S poklesem koncentrace se homofermentativní dráha mění na heterofermentativní a dochází k produkci i dalších metabolitů a to CO₂, etanolu a kyseliny octové. U většiny zástupců tohoto kvašení scházejí

základní enzymy glykolytické dráhy (aldoláza a triózo-fosfátizomeráza). Počáteční štěpení hexózu probíhá proto u nich po tzv. hexózo-monofosfátové dráze, tj. přes glukózo-6-P a 6-P-glukonát, které jsou dále odbourávány na glyceraldehyd-P a acetyl-P. Glyceraldehyd-P vstupuje do dalších fází glykolytické dráhy a acetyl-P je přes acetaldehyd redukován na etanol. Zástupci mohou odbourávat i pentózy pomocí indukovatelné fosfoketolázy. Tato skupina zahrnuje např. druhy *L. casei* nebo *L. plantarum* [6], [7].

U obligátně heterofermentativních laktobacilů probíhá fermentace hexózu na kyselinu mléčnou, etanol (kyselinu octovou) a CO₂. Pentózy fermentují na kyselinu mléčnou a kyselinu octovou. Zástupci jsou např. druhy *L. reuteri* nebo *L. brevis* [7].

Mikroorganismy, trvale usídlené v tlustém střevě, fermentují látky přijaté potravou, které projdou nestrávené tenkým střevem. Jedná se o odolné škroby, neškrobové polysacharidy (dietní vlákninu), oligosacharidy, proteiny a podobně. U dospělého jedince se denně dostane do tlustého střeva průměrně 60-80 g potravy, která je částečně fermentována na kyselinu mléčnou a těkavé estery mastných kyselin, převážně na acetát, propionát, butyrát, dále na oxid uhličitý, vodík, metan, fenolické sloučeniny, aminy a amoniak [9].

2.1.2 Laktobacily a zdraví

Zástupci rodu *Lactobacillus* preferují prostředí bohaté na sacharidy. Takovým prostředím je i povrch mukózních membrán v gastrointestinálním traktu člověka. U zdravého jedince jsou laktobacily součástí přirozené mikroflóry. Vyskytují se v dutině ústní (10^3 - 10^4 cfu/g), v ileu (10^3 - 10^7 cfu/g), v tlustém střevě (10^4 - 10^8 cfu/g) a ve vagině [5]. Přestože jsou zástupci rodu *Lactobacillus* řazeny do skupiny mikroorganismů tzv. obecně považovaných za bezpečné (GRAS) [10], byly v literatuře uvedeny některé druhy jako původci novorozeneckých meningitid, abscesů, pleuropulmonárních infekcí a bakteriemií. Patogenita se projevuje jen vzácně a často u jedinců s oslabenou imunitou [11].

U žen tvoří laktobacily převážnou složku poševní mikroflóry a jsou nejvýznamnějším prvkem bránicím ascendentnímu pronikání infekce do dělohy. Nejčastěji jde o druh *Lactobacillus acidophilus* (dříve v klinice nazývaný Döderleinův bacil). Tyto bakterie využívají glykogen, který se uvolňuje z rozpadajících se epitelů, za vzniku kyseliny mléčné. Vzniklé kyselé prostředí (hodnota pH se pohybuje kolem 4,5) brání usídlení patogenních a potenciálně patogenních organismů v pochvě [11].

Přirozená mikroflóra v GI-traktu přispívá nejen ke správnému fungování metabolismu, ale také k řádným imunitním reakcím člověka. Stav mikroflóry a tedy i zdravotní stav jedince (hostitele) lze ovlivnit používáním probiotik a prebiotik [12].

2.1.2.1 Probiotika a požadavky na probiotika

Probiotikum je doplněk stravy obsahující živé mikroorganismy, které prospěšně ovlivňují zdraví hostitele tím, že udržují nebo zlepšují mikrobiální rovnováhu v gastrointestinálním traktu. Mikroorganismy používané jako probiotikum musí splňovat řadu parametrů, které se týkají jejich bezpečnosti, funkčnosti, ale i technologických vlastností [13]:

- nesmí být patogenní, mutagenní nebo karcinogenní [14],
- měli by se přirozeně vyskytovat v trávicím traktu zdravého jedince [2],
- musí být odolné vůči žaludečním kyselinám a žluči (nesmí být během průchodu trávicím traktem poškozeny nebo zničeny) [15],
- musí být schopny kolonizovat tlusté střevo, případně adherovat k epiteliálním buňkám GIT [12],
- musí mít klinicky ověřený pozitivní vliv na hostitele [12],
- nesmí obsahovat geny rezistence k antibiotikům, které by mohly být přeneseny do jiných buněk [14],
- musí být bezpečné pro klinické a potravinářské účely [13],
- dále jsou požadovány dobré technologické vlastnosti kmene (stabilita během uchovávání, rezistence vůči fágům, stabilita během vlastní výroby výrobku a jeho skladování, možnost kultivace ve velkém měřítku bez negativního vlivu na vůni a chuť výrobku) [13].

Schopnost adheze probiotických kmenů k střevní sliznici je jedna z nejdůležitějších vlastností. Pokud je mikroorganismus schopen setrvat delší dobu v GIT, může se výrazně projevit jeho pozitivní vliv na hostitele [14]. Adheze k sliznici bývá buď nespecifická, která je založena na chemicko-fyzikálních interakcích, nebo specifická, která souvisí s interakcí receptorových molekul na povrchu střevní sliznice a adhezních molekul na povrchu probiotického mikroorganismu. Kolonizace tlustého střeva a ovlivnění střevní mikroflóry může být jen dočasné (v závislosti na bakteriálním druhu). Probiotika bývají detekovány ve fekáliích ještě po několika dnech až týdnech po ukončení jejich požívání v potravinách, ale jejich počet s časem postupně klesá [2]. Kolonizace střevní mukózy hostitele je samozřejmě ovlivněna řadou faktorů např. stravou nebo užíváním antibiotik. Rezistence k antibiotikům je faktorem, který má vliv na výběr probiotických kultur. Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou rezistentní vůči klinicky významným β -laktamovým antibiotikům (penicilin a ampicilin), ciprofloxacinu, streptomycinu nebo vancomycinu. Naopak laktobacily jsou citlivé k trimethoprimu/sulfamethoxazolu nebo tetracyklinu [10].

2.1.2.2 Probiotické laktobacily

V rodu *Lactobacillus* bylo popsáno více než 120 druhů. Jenom některé z nich jsou považovány za probiotické. Mezi probiotika jsou v současné době řazeny zejména tyto druhy rodu *Lactobacillus*:

- *Lactobacillus acidophilus*
- *Lactobacillus casei*
- *Lactobacillus reuteri*
- *Lactobacillus rhamnosus*
- *Lactobacillus plantarum*
- *Lactobacillus brevis*
- *Lactobacillus johnsoni*
- *Lactobacillus lactis*
- *Lactobacillus paracasei*
- *Lactobacillus salivarius*

Často je zařazován i *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, přestože tento druh nepřežívá

průchod horní částí gastrointestinálního traktu [7], [14], [15]. Z vyjmenovaných laktobacilů jsou jako probiotika, které lze přidávat do potravin, komerčně dostupné pouze některé kmeny [15]. Tyto kmeny jsou shrnuty v Tab. 1.

Tab. 1. Nejdůležitější komerčně používané kmeny s probiotickými účinky [15]

Kmen	Výrobce
<i>L. acidophilus</i> NCFM	Rhodia Inc.
<i>L. acidophilus</i> DDS-1	Nebraska Cultures
<i>L. acidophilus</i> SBT-2062	Snow Brand Milk Products
<i>L. acidophilus</i> LA-1/LA-5	Chr. Hansen
<i>L. casei</i> Shirota	Yakult
<i>L. casei</i> Immunitas	Danone
<i>L. fermentum</i> RC-14	Urex Biotech
<i>L. johnsonii</i> La1/Lj1	Nestlé
<i>L. plantarum</i>	Probi AB
<i>L. reuteri</i> SD 2112/MM2	Biogaia
<i>L. rhamnosus</i> GG	Valio
<i>L. rhamnosus</i> GR-1	Urex Biotech
<i>L. rhamnosus</i> 271	Probi AB
<i>L. rhamnosus</i> LB 21	Essum AB
<i>L. salivarius</i> UCC 118	Univesity College Cork
<i>L. lactis</i> L 1A	Essum AB

2.1.2.3 Účinek probiotik

Probiotika se vyznačují celou řadou zdravích prospěšných vlastností. Mohou chránit hostitelský organismus před infekcí patogenními bakteriemi. Účinek probiotik spočívá v kompetici s patogeny o živiny, v adhezi k střevnímu epitelu a redukci pH v zažívacím traktu hostitele. Většina probiotik syntetizuje bakteriocidní peptidy nebo látky (organické sloučeniny, peroxid vodíku), které mohou zabránit množení patogenních mikroorganismů. Probiotika ovlivňují tvorbu hleny, vstřebávání v GIT a eliminaci toxinů produkovaných patogeny [12]. Takto inhibují účinek např. patogenních druhů *Clostridium difficile*, *Helicobacter pylori* a *Listeria monocytogenes* [13].

Probiotické mikroorganismy mohou také působit proti vzniku rakoviny. Jsou schopny inhibovat karcinogeny různými mechanismy: adsorpcí karcinogenních látek či produkcí enzymů nebo dalších látek degradující karcinogeny [12]. Jejich přítomnost v GIT snižuje aktivitu fekálních enzymů přeměňujících prekarcinogeny na karcinogeny (azoreduktáza, β -glukoronidáza) a zkracuje dobu průchodu fekálií střevem [15]. Kromě toho probiotika produkují látky prospěšné pro hostitele jako thiamin, riboflavin, niacin, pyridoxin, folacin nebo vitamín B₁₂ [2]. Zmírňují průběh řady průjemových onemocnění (vyvolané užíváním antibiotik nebo virového původu) a zácpy. Používají se také jako prevence těchto onemocnění [10]. V Tab. 2 je shrnuta řada doposud zaznamenaných klinických účinků významných probiotických kmenů a jogurtových kultur.

Tab. 2 Klinické účinky vybraných probiotických kmenů *Lactobacillus* [14]

Kmen	Klinický účinek
<i>Lactobacillus johnsonii</i> La1/Lj1	udržování střevní mikroflóry, zlepšení imunity, adjuvant při léčbě onemocnění vyvolané <i>Helicobacter pylori</i>
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	udržování střevní mikroflóry, snížení aktivity fekálních enzymů, pozitivní vliv na průběh rakoviny močového měchýře
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	snížení aktivity fekálních enzymů, léčba průjmů vyvolaných užíváním antibiotik u dětí, léčba a prevence akutních průjmů a průjmů vyvolaných rotavirem u dětí, léčba průjmů bakteriálního původu (<i>Clostridium difficile</i>), zmírnění symptomů atopické dermatitidy u dětí
<i>Lactobacillus plantarum</i>	udržování střevní mikroflóry, snížení obsahu fekálních mastných kyselin
<i>Lactobacillus reuteri</i> (Biogaia)	léčba akutních průjmů a průjmů vyvolaných rotavirem u dětí, bezpečný a dobře přijímaný HIV pozitivními jedinci

2.1.2.3.1 Bakteriociny

Bakteriociny jsou sloučeniny peptidické povahy produkovány některými bakteriemi např. bakteriemi mléčného kvašení (mající dlouhou historii v přípravě fermentovaných potravin), které vykazují antimikrobiální vlastnosti. Podle FAD (Food and Drug Administration) se jedná o látky bezpečné pro potravinářské účely. Bakteriociny lze rozdělit do dvou základních skupin a to na bakteriociny produkovány grampozitivními (např. *Lactobacillus acidophilus*) a gramnegativními bakteriemi (např. *E. coli*) [16].

Bakteriociny produkovány bakteriemi mléčného kvašení jsou označovány jako lantibiotika. V potravinářském průmyslu nacházejí tyto látky využití např. jako náhrada chemických konzervačních látek při výrobě potravin se zvýšenou trvanlivostí. V Tab. 3 jsou shrnuty bakteriociny produkovány probiotickými laktobacily [16].

Tab. 3 Bakteriociny produkované probiotickými druhy rodu *Lactobacillus* [17]

Produkční mikroorganismus	Bakteriocin	Inhibovaný mikroorganismus
<i>Lactobacillus brevis</i>	Brevicin 286	<i>Listeria innocua</i> , <i>Listeria grayi</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus ssp.</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i>
	Brevicin 37	<i>Lactobacillus ssp.</i> , <i>Leuconostoc ssp.</i> , <i>Pediococcus ssp.</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Lactacin B	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus leichmanii</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Plantaricin A	<i>Lactobacillus ssp.</i> , <i>Leuconostoc ssp.</i> , <i>Pediococcus ssp.</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
	Plantaricin B	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus damnosus</i>
	Plantaricin S	<i>Lactobacillus ssp.</i> , <i>Leuconostoc ssp.</i> , <i>Pediococcus ssp.</i> , <i>Lactococcus ssp.</i>

2.1.2.4 Prebiotika

Stav střevní mikroflóry je možné zlepšit používáním prebiotik. Prebiotika jsou nestravitelné složky potravy, které selektivně stimulují růst a/nebo aktivitu bakterií kolonizujících tlusté střevo [13]. Zahrnují hlavně oligosacharidy (xylo-, gluko-, isomalto-, fruktooligosacharidy) nebo laktulosu. U zdravého jedince by prebiotika měla tvořit v potravě asi 10% energetického příjmu a až 20% celkové příjmu [12]. Potraviny obsahující směs prebiotik a probiotik, které vzájemně ovlivňují střevní mikroflóru, se označují jako synbiotika. Prebiotika mohou do určité míry chránit probiotika obsažená v potravinách během výroby a skladování potravin nebo při průchodu GIT [13].

2.1.3 Využití rodu *Lactobacillus* v potravinářství

Díky bakteriálnímu antagonismu našli zástupci rodu *Lactobacillus* široké uplatnění v potravinářském průmyslu. Významná je antimikrobiální aktivita hlavně vůči gramnegativním bakteriím (včetně lidských patogenů) [10]. Inhibičně na jiné mikroorganismy působí hlavně látky uvolňované laktobacily do prostředí. Jedná se o produkci:

- kyseliny mléčné nebo kyseliny octové (vzniklé kyselé prostředí pak brání růstu a rozšíření méně acidotolerantních mikroorganismů),
- peroxidu vodíku (pouze za přítomnosti kyslíku),
- bakterocinů (viz. výše kapitola 2.1.2.3.1) [6].

Neopomenutelné je využití bakterií rodu *Lactobacillus* v mlékárenském průmyslu.

2.1.3.1 Termofilní sýrařské kyselé kultury

Úloha termofilních kyselé baktérií, s optimální teplotou růstu v rozmezí 40 až 45 °C, při

výrobě sýrů je fermentování laktózy na kyselinu mléčnou a uplatnění jejich proteolytické aktivity. Mezi bakterie kyselých kultur jsou řazeny druhy *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus*, často je zařazován i druh *Lactobacillus casei*, přestože jeho optimální teplota růstu je 30 °C [7].

2.1.3.2 Termofilní jogurtové kultury

Při výrobě jogurtů nebo jogurtových nápojů se využívá bakterií druhu *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, které mají symbiotický vztah a spolu se vyznačují rychlou tvorbou kyseliny mléčné. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* díky své vysoké proteolytické aktivitě stimuluje růst *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, který má jen malou schopnost hydrolyzovat bílkoviny. *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* tvorbou kyseliny mravenčí naopak stimuluje metabolismus *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* [7].

2.2 Identifikace probiotických laktobacilů pomocí PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) se stala jednou z nejdůležitějších metod v molekulární biologii. Důvodem je relativní jednoduchost jejího provedení. Koncept PCR byl navrhnut Kary Mullisem, který za něj získal Nobelovu cenu [18]. Jedná se o enzymatickou amplifikaci DNA *in vitro* o syntézu mnoha kopií vybrané sekvence templátové DNA v cyklické reakci s využitím termostabilní DNA polymerázy [19].

Pro klasickou PCR je nutné znát nukleotidovou sekvenci fragmentu amplifikované DNA. Na základě této informace je možné chemicky nasyntetizovat primery, které jsou komplementární k 3' a k 5'-koncovým sekvencím úseku DNA, který má být zmnožen [18]. Od 3' konců těchto dvou primerů, pak dochází k syntéze nových vláken DNA [20]. Jednotlivé kroky amplifikace zahrnují denaturaci DNA, nasednutí (hybridizaci) primerů a syntézu nových komplementárních vláken DNA polymerázou. Opakování těchto kroků vede k syntéze PCR produktů (fragmentů DNA) s konci definovanými primery, které tvoří hlavní produkt reakce (amplikon). Dochází k syntéze i jiných fragmentů, ale jejich množství se v průběhu reakce snižuje a v konečném produktu tvoří zanedbatelné množství [21].

Pro PCR jsou potřebné tyto komponenty:

- DNA templát
- dva oligonukleotidové primery
- termostabilní DNA polymeráza
- směs dNTP
- vhodný pufr obsahující Mg^{2+}

2.2.1 Průběh PCR

Jeden cyklus PCR se skládá ze tří kroků (schematicky zobrazených na obr. 3) o definované teplotě a času:

1. Denaturace dvouvláknového DNA templátu (DNA matrice) je dosaženo zvýšením teploty

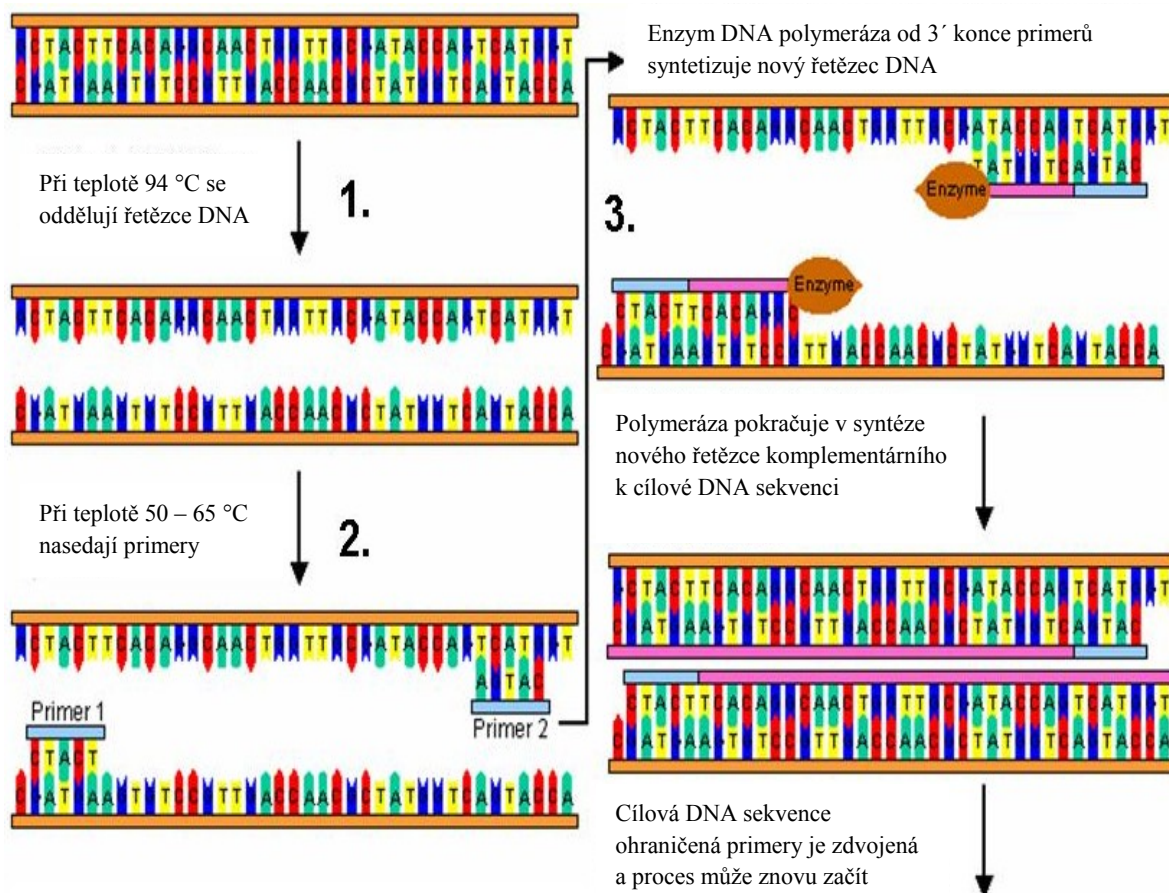
na 95 °C (je tolerováno rozpětí 92 – 98 °C), po dobu 0,5 – 1 minuty [19].

2. Snížení teploty na 50 – 65 °C umožní nasednutí primerů na komplementární sekvence na matricové DNA. Přesné určení teploty hybridizace je kritickým bodem PCR, protože na něm závisí specifita reakce. Jestliže je teplota příliš vysoká, nemusí k syntéze amplikonu vůbec dojít. Pokud je však teplota příliš nízká, vznikají nespecificky spárované primery a DNA templát, přičemž ne všechny báze vytvoří správné, stabilní páry [20]. Obecně platí, že hybridizace probíhá za teploty o 10 až 12 °C nižší než je denaturační teplota duplexu templátové DNA s primerem [22]. Tento krok trvá obvykle 0,5 – 1 minutu.

3. Po zvýšení teploty na 60 – 72 °C probíhá vlastní polymerační reakce a to syntéza komplementárního DNA vlákna katalyzovaná termostabilní DNA polymerázou. Pro fragmenty do 1 kb trvá tento krok 0,5 – 2 minuty [19].

Cykly PCR se mnohokrát opakují, zpravidla se jedná 30 – 40 cyklů. Primery na antiparalelní templátová vlákna DNA nasedají v protisměrné orientaci, takže po opakovaných cyklech denaturace, nasednutí primerů a syntéze komplementárního DNA vlákna vznikají produkty, které slouží jako templáty pro nový reakční cyklus. Pokud jsou na začátku prvního cyklu k dispozici dva templátové řetězce (jedna dvouřetězcová molekula), pak vzniknou na konci 1. cyklu jeho dvě kopie. Pro další cyklus jsou k dispozici už čtyři vlákna, podle kterých vzniknou 4 kopie, atd. Produkt se tedy hromadí geometrickou řadou [19], [20].

PCR je obvykle prováděna v tzv. termocykléru, což je programovatelný termostat.



Obr. 3. Jednotlivé kroky jednoho cyklu PCR [23]

2.2.2 DNA templát

Jako DNA templát se používá purifikovaná DNA nebo DNA z hrubých lyzátů buněk. Typická velikost amplifikovaných fragmentů (PCR produktů) se pohybuje kolem 100 – 1 000 párů bazí [19]. Přestože umístění cílové sekvence DNA na chromosomu ani velikost amplikonu není příliš rozhodující pro citlivost a specifitu metody, je komplikované amplifikovat větší fragmenty DNA (nad 1000-2000 bp). U takto velkých fragmentů je problematické udržet stabilitu denaturovaného templátu DNA [24].

2.2.3 Deoxyribonukleosidtrifosfáty (dNTP)

DNA se skládá z malých stavebních jednotek neboli deoxyribonukleotidů. Každý deoxyribonukleotid je složen z fosfátové skupiny, deoxyribózy a dusíkaté báze. Existují čtyři různé báze (adenin, thymin, guanin a cytosin) a tedy čtyři různé deoxyribonukleotidy: deoxyadenosin monofosfát (A), deoxythymidin monofosfát (T), deoxyguanosin monofosfát (G) a deoxycytidin monofosfát (C). Dvouvláknová DNA je tvořena dvěma polynukleotidovými vlákny, které jsou spojeny prostřednictvím vodíkových můstků mezi bázemi. Komplementární párování mezi bázemi je pouze dvojí a to mezi adeninem a thyminem a mezi cytosinem a guaninem. Z principu párování neboli komplementarity bází metoda PCR vychází [25]. V PCR se jako stavební kameny DNA používají deoxynukleotidtrifosfáty (deoxyadenosin trifosfát, deoxyguanosin trifosfát, deoxycytidin trifosfát a deoxythymidin trifosfát).

2.2.4 Požadavky na primery

Pro řádný průběh PCR je nejdůležitějším krokem navrhnutí vhodného páru oligonukleotidových primerů [18]. Při návrhu primerů musí být zajištěno několik aspektů. Oba primery bývají dlouhé asi 15 – 30 bazí. Není ale podmínkou, aby se velikostně shodovaly [24]. Naopak velmi důležité je, aby oba primery hybridizovaly při stejné teplotě s komplementární sekvencí v templátové DNA. Proto musí mít duplexy templátové DNA s primerem přibližně stejnou teplotu tání (tolerance 1 – 2 °C) [20], [24]. Teplota tání primerů je ovlivněna zejména poměrem G-C a A-T párů. Platí, čím více je vodíkových můstků v molekule, tím vyšší je teplota tání. A proto by primery měly mít vyvážený poměr G-C a A-T párů [24]. Přijatelná teplota tání (melting temperature, T_m) se pohybuje v rozmezí 55 °C až 65 °C, vyšší teplota zpravidla představuje vyšší specifitu PCR. Teplotu tání primerů lze stanovit použitím jednoduchého vzorce:

$$T_m = (4 \cdot [G + C]) + (2 \cdot [A + T]),$$

kde $[G + C]$ je počet bazí GC a $[A + T]$ je počet bazí AT v sekvenci primerů [20].

Primery nesmí být navzájem komplementární, aby nedocházelo k tvorbě dimerů nebo vlásenek [18]. Jejich optimální koncentrace v reakci je zpravidla 0,1 – 0,6 μM (vyšší koncentrace mohou vést ke vzniku nespecifických produktů). Optimální obsah GC párů je v rozmezí 40 – 60 %. Pokud jsou primery bohaté na GC, je vhodné zvolit primery delší [21]. Také je možné při návrhu primerů přidat na 5' konec nekomplementární sekvenci např. pro

zavedení restrikčního místa nebo promotor [18].

Existuje celá řada počítačových programů vytvořených pro návrh vhodných primerů [18].

2.2.5 Koncentrace Mg^{2+}

Mg^{2+} ionty jsou kofaktorem *Taq*-polymerázy a jejich koncentrace má přímý vliv na aktivitu a přesnost enzymu. Také byl zjištěn značný vliv hořečnatých kationtů na teplotu tání hybridů vznikajících v průběhu PCR, a to hybridů typu templát-primer nebo primer-primer. Koncentrací hořečnatých kationtů lze tedy ovlivnit některé parametry PCR. Nadbytek Mg^{2+} v reakční směsi zvyšuje výtěžnost PCR, na druhé straně ale dochází mnohem častěji k tvorbě nespecifických produktů. Optimální koncentrace Mg^{2+} v PCR směsi se pohybuje okolo 1,5 – 5 mmol/l [22], [26].

2.2.6 Termostabilní DNA polymeráza

V původním konceptu PCR byla používána DNA polymeráza Pol III izolovaná z *Escherichia coli* K 12. Zvýšením teploty na začátku cyklu došlo k denaturaci nejen dvouvláknové matricové DNA, ale i polymerázy, která musela být znovu přidávána každý nový cyklus. Dnes jsou používány termostabilní DNA polymerázy, které nejsou vysokou teplotou denaturovány [19]. Tyto enzymy jsou izolovány z mikroorganismů žijících v extrémních teplotních podmínkách [18].

Nejčastěji používanou je *Taq*-polymeráza, izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. Teplotní optimum enzymu se pohybuje kolem 75 °C a poločas inaktivace při 95 °C je asi 40 minut. Vyznačuje se polymerázovou a exonukleázovou aktivitou ve směru 5'→3'. Frekvence inkorporace chybných nukleotidů je přibližně 2×10^{-4} , protože tato polymeráza postrádá exonukleázovou aktivitu ve směru 3'→5' a nemůže opravit chyby vzniklé při syntéze nových DNA řetězců. Pro řadu aplikací však tato přesnost vyhovuje. Výhodou *Taq*-polymerázy kromě termostability je i vysoká procesivita [21].

Existují i další druhy termostabilních polymeráz, např. *Pfu*-polymeráza. Tento enzym byl izolován z hypertermofilní bakterie *Pyrococcus furiosus*. Je teplotně stabilnější než *Taq*-polymeráza a její teplotní optimum se blíží k 100 °C. Kromě toho se vyznačuje korektorskou aktivitou, tedy exonukleázovou aktivitou ve směru 3'→5' [18]. Vysoká přesnost *in vitro* replikace, kterou *Pfu*-polymeráza umožňuje, je jedním z nejdůležitějších parametrů v aplikacích PCR, určených pro klonování ampliconů nebo při charakterizaci málo častých mutací v DNA. Nevýhodou je nižší procesivita ve srovnání s *Taq*-polymerázou [21]. Přehled nejvyužívanějších termostabilních DNA polymeráz je uveden v Tab. 4.

Jiná DNA polymeráza izolovaná z termofilní *Thermus thermophilus* je *Tth*-polymeráza, jejíž teplotní optimum je asi 70 °C. Tato polymeráza je schopna za přítomnosti Mn^{2+} působit jako reverzní transkriptáza. Tato vlastnost se využívá pro metodu RT-PCR, která spočívá v reverzní transkripci RNA na cDNA a v následné amplifikaci cDNA [18].

Tab. 4 Přehled nejvyužívanějších termostabilních DNA polymeráz a jejich charakteristika podle exonukleazové aktivity

Polymeráza	5'→3'exonukleáza	3'→5'exonukleáza	Produkční mikroorganismy
<i>Taq</i>	ano	ne	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>Tfl</i>	ano	ne	<i>Thermus flavus</i>
<i>Tbr</i>	ano	ne	<i>Thermus brockianus</i>
<i>Tth</i>	ano	ne	<i>Thermus thermophilus</i>
<i>Tli</i>	ne	ano	<i>Thermococcus litoralis</i>
<i>Pfu</i>	ne	ano	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>Pwo</i>	ne	ano	<i>Pyrococcus woesei</i>

2.2.7 Hot-start v PCR

Úkolem tzv. hot-start (horkého startu) je redukovat průběh nespecifické amplifikace před nebo na začátku vlastní PCR. Nespecifické produkty zpravidla vznikají tvorbou dimerů primerů a po nespecifickém nasednutí primerů syntézou nespecifického komplementárního vlákna DNA. Jedním z důvodů je fakt, že *Taq* polymeráza vykazuje určitou aktivitu i při teplotách podstatně nižších než je její teplotní optimum. Proto syntéza nového DNA vlákna může být zahájena už během přípravy PCR směsi za laboratorní teploty [24].

Metod hot-start je celá řada. Jednou z nejběžnějších variant je tepelná aktivace *Taq*-polymerázy. Enzym je do PCR směsi dodáván v neaktivní formě a jeho aktivace je prováděna zahřátím na teplotu 94 – 96 °C po dobu 10 – 12 minut [22].

2.2.8 Inhibice PCR a zdroje chyb v PCR

Inhibice PCR může být částečná nebo úplná a může se projevit jako úplné selhání reakce nebo snížení citlivosti detekce. Mechanismy inhibice jsou různé. Inhibice může být způsobena přímou reakcí inhibitoru s DNA templátem (zpravidla se jedná o znemožnění nasednutí primerů) nebo ovlivněním stability termostabilní DNA polymerázy a to její degradací nebo blokadí enzymové aktivity. Kritickým faktorem je koncentrace Mg^{2+} , protože inhibitory PCR mohou snižovat dostupnost iontů nebo ovlivňovat vazbu Mg^{2+} k DNA polymeráze [27].

Problematickými jsou aplikace PCR např. v klinické medicíně nebo v potravinářství. V samotných vzorcích bývají obsaženy běžné exogenní inhibitory PCR (sloučeniny hemu nacházející se v krvi, heparin, moč, rostlinné polysacharidy, ionty Ca^{2+} , glykogen a další) [24], [27]. Inhibitory jsou také obsaženy v chemikáliích používaných během purifikace DNA nebo při PCR (SDS, NaCl, fenol, isopropanol, $MgCl_2$ a další) [24].

V některých případech může inhibice PCR vyústit ve falešně negativní výsledky. Takový výsledek může být způsoben přítomností nespecifické DNA ve vzorku, nebo pokud koncentrace jednotlivých komponent a teplota nasednutí primerů není dostatečně optimalizována [25].

Falešně pozitivní výsledky PCR lze získat, pokud použité primery hybridizují i s jinou

sekvencí DNA než jen se sekvencí, která má být amplifikována [25].

2.2.9 Optimalizace PCR

Vždy při návrhu nové PCR metody je nutné optimalizovat komponenty PCR směsi. Pokud je známá optimální teplota nasednutí primerů, kombinujeme různé koncentrace primerů, DNA polymerázy a Mg^{2+} iontů. Správně zvolené koncentrace, respektive jejich kombinace zajišťují optimální citlivost a specifitu reakce. Jestliže se změní jakákoliv proměnná analýzy, např. analyzovaná DNA je extrahovaná jinou metodou, musí být provedena nová optimalizace [22].

2.3 Detekce PCR produktů pomocí agarosové gelové elektroforézy

Agarosa je lineární polymer získaný z mořských červených řas. Jedná se o polysacharid složený z D-galaktosových jednotek spojených β -1,3 vazbou a 3,6-anhydrogalaktosových zbytků spojených α -1,4 vazbou. Agarosa se za horka rozpouští a po ochlazení tvoří gel, ve kterém se helikální vlákna agarosy spojují do trojrozměrných struktur [28].

Elektroforéza patří mezi elektromigrační metody a principem je pohyb částic v elektrickém poli. Fragmenty DNA jsou děleny v elektrickém poli v závislosti na jejich velikosti. Kromě velikosti DNA je pohyblivost ovlivněna také tvarem molekuly respektive fragmentu DNA. Jednotlivé formy DNA o stejné molekulové hmotnosti mají různou pohyblivost. Např. plasmidová nadšroubovicová (superhelikální) forma je nejkompaktnější a za standardních podmínek migruje rychleji. Otevřená cirkulární forma se zpravidla pohybuje o něco pomaleji než lineární forma. Pohyblivost je dále závislá na podmínkách elektroforézy např. na iontové síle pufru nebo na použitém napětí [21].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použitý probiotický mléčný výrobek

Actimel Natur (DANONE)

Prodávající v ČR: DANONE a.s, Vinohradská 2828/151,
130 000 Praha 3, ČR

Datum spotřeby: 17. 3. 2009

Složení: mléko, cukr, glukóza, jogurtová kultura a
Lactobacillus casei Imunitass®. Obsah tuku nejméně 0,9%
hmot. Balení po 1 lahvičce = 94,6ml.

www.actimel.cz



3.2 Chemikálie

Všechny chemikálie byly v čistotě p. a. Roztoky byly připravovány ze sterilních zásobních roztoků (sterilizace při 121 °C, 20 minut). Ředění bylo prováděno sterilní destilovanou H₂O.

3.2.1 Chemikálie pro lyzi bakteriálních buněk

- EDTA (Serva, Heidelberg, SRN)
- Hydroxid sodný (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Lysozym (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- Proteináza K (Sigma, St. Louis, USA)
- SDS (Sigma, St. Louis, USA)
- Tris base (Amaresco, Solon, USA)

Příprava 0,5 M EDTA (pH 8,0):

- 186,1 g EDTA rozpuštěno v 800 ml destilované vody
- pomocí NaOH bylo upraveno pH na 8,0
- roztok byl doplněn do objemu 1 l destilovanou H₂O

Příprava zásobního roztoku 1 M Tris HCl (pH 7,8):

- 12,1 g Tris base
- 70 ml destilované H₂O
- pomocí HCl bylo upraveno pH na 7,8

Příprava lyzačního roztoku A:

- 10 mM Tris HCl (pH 7,8)
- 5 mM EDTA (pH 8,0)
- roztok byl připraven sterilně ze zásobních roztoků 1 M Tris HCl a 0,5 M EDTA

Příprava lyzačního roztoku B:

- lyzační roztoku A

- lysozym 3 mg/ml
- lysozym byl přidán do lyzačního roztoku před použitím

3.2.2 Chemikálie pro purifikaci DNA

- Ethanol (Pliva-Lachema, ČR)
- Fenol (Pliva-Lachema, ČR)
- Chloroform (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Isoamylalkohol (Amaresco, Ohio, USA)
- Octan sodný (Pliva-Lachema, Brno, ČR)

Příprava TE pufru:

- 10 mM Tris HCl (pH 7,8)
- 1 mM EDTA (pH 8,0)
- roztok byl připraven sterilně ze zásobních roztoků 1 M Tris HCl a 0,5 M EDTA

Příprava CIZ:

- směs chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1

3.2.3 Komponenty pro PCR

- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- Reakční pufr kompletní (10x koncentrovaný); složení: 750 mM Tris HCl (pH 8,8) 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 % Tween 20, 25 mM MgCl_2 (Top-Bio, Praha, ČR)
- dNTP směs 10 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), pH 7,5 (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery (Generi-Biotech, Hradec Králové, ČR)
- *Taq* DNA polymeráza 1.1 (1 U/ μl) (Top-Bio, Praha, ČR)

3.2.4 Komponenty pro agarosovou gelovou elektroforézu

- Agarosa pro elektroforézu DNA (Serva, Heidenberg, SRN)
- Bromfenolová modř (Sigma, St. Luis, USA)
- Ethidium bromid (Sigma, St. Louis, USA)
- Ficoll 400 (Pharmacia, Uppsala, Švédsko)
- PCR vkladací pufr Yellow load obsahující žluté barvivo – orange G (Top-Bio, Praha, ČR)
- PCR vkladací pufr obsahující barviva – bromofenolovou modř a xylen cyanol (Top-Bio, Praha, ČR)
- Kyseliny borité (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- DNA standard (Malamité, v.o.s) obsahující fragmenty DNA o velikosti 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 a 100 bp

Příprava TBE pufru (5× koncentrovaný):

- 54 g Tris HCl
- 27,5 g H_3BO_3
- 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

- roztok byl doplněn do objemu 1 l sterilní destilovanou vodou, před použitím 10x naředěn

Příprava nanášecího pufru (6x koncentrovaný):

- 0,04 g Bromfenolové modři
- 2,5 g Ficoll 400
- 100 ml destilovaná H₂O

3.3 Pomůcky a přístroje

- Laboratorní váhy (Kern and Sohn, Německo)
- Centrifuga Mini spin 14 500 min⁻¹ (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Exikátor (KIF LAB Freiburg, Německo)
- Mikropipety Discovery HTL o objemu 10, 20, 200 a 1000 µl (Varšava, Polsko)
- Mikrovlnná trouba SMW 5020 (SENCOR, ČR)
- Očkovací box (Fatran, ČR)
- Termostat Mini incubator (Labnet, USA)
- Termostat FTC 901 (VELP SCIENTIFICA, Milano, Itálie)
- Minicycler PTC 100 (MJ Research, USA)
- Termocycler PTC 200 (BIO-RAD Lab., USA)
- Transiluminátor TVR 3121 (Spectroline, USA)
- Zařízení pro elektroforézu Mini gel (Hoefer, USA)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Lighting Volt Power Supply, model OSP-300 (Owl Scientific, USA)
- NanoPhotometr (Implen, Německo)
- Digitální fotoaparát (Kodak, Dánsko)
- Bežné laboratorní sklo, umělohmotný laboratorní materiál a pomůcky

3.4 Použité metody

Popsané postupy byly prováděny podle učebních textů laboratorního cvičení a osobního sdělení doc. Španové.

3.4.1 Příprava hrubých lyzátů buněk z mléčného výrobku

- byl odebrán 1 ml mléčného výrobku do 1 ml ependorfe
- vzorky byly centrifugovány při 14 000 ot. /min po dobu 5 minut
- supernatant byl opatrně slit a sediment se nechal dobře okapat
- k sedimentu byl přidán 1 ml lyzačního roztoku B, ve kterém byl resuspendován
- po hodině inkubace při laboratorní teplotě bylo ke vzorku přidáno 50 µl 20% SDS a 5 µl proteinázy K (1 mg/ml)
- vzorky byly inkubovány do druhého dne při teplotě 55 °C
- pomocí gelové elektroforézy na agarosovém gelu byla ověřena přítomnost DNA v hrubých lyzátech buněk

3.4.2 Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk

3.4.2.1 Fenolová extrakce DNA

- k lyzátu buněk (500 µl) byl přidán stejný objem fenolu (předestilovaný, pH upraveno na 7,8)
- směs byla kývavým pohybem promíchána po dobu 4 minut
- vzorky byly centrifugovány při 15 000 ot. / min po dobu 3 minut
- byla odebrána vodní fáze s DNA do čisté eppendorfky, ke které bylo přidáno 700 µl CIZ směsi a opět kývavým pohybem promícháno asi po dobu 4 minut
- vzorky byly centrifugovány 15 000 ot. / min po dobu 3 minut
- znovu byla odebrána vodní fáze s DNA do čisté eppendorfky

3.4.2.2 Přesrážení DNA ethanolem

- ke vzorku DNA byla přidána 1/10 objemu 3 M octanu sodného, směs byla promíchána
- byl přidán 1 ml 96 % ethanolu, směs byla promíchána
- DNA byla ponechána k vysrážení při -20 °C po dobu 15 minut
- vzorky byly centrifugovány 15 000 ot. /min po dobu 15 minut, po centrifugaci byl supernatant slit
- sediment DNA byl vysušen v exikátoru po dobu asi 5 minut
- získaná DNA byla rozpuštěna v 200 µl TE pufru
- takto připravená DNA byla použita pro agrosovou elektroforézu a pro spektrofotometrické stanovení

3.4.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

- měření bylo prováděno na spektrofotometru NanoPhotometr Implen (lid 5)
- pro nastavení spektrofotometru byl nejprve proměřen TE pufr (objem 6 µl)
- poté byly proměřeny vzorky DNA (objem 6 µl)
- na přístroji byla přímo odečtena hodnota A_{260}/A_{280} (čistota DNA) a koncentrace vzorku DNA

3.4.4 Agarosová gelová elektroforéza hrubých lyzátů buněk a bakteriální DNA

- byl připraven 0,8 % agarosový gel (0,4 g agarosy, 50 ml 0,5× TBE pufru)
- směs byla důkladně rozvařena v mikrovlnné troubě a nalita do elektroforetické vaničky s hřebínkem
- gel tuhl při laboratorní teplotě 30 až 45 minut, před nanášením vzorků byl odstraněn hřebínek
- na polyethylenovém proužku byly smíchány vzorky DNA nebo hrubý lyzát (v objemu 15 µl) s 3 µl stop pufru
- takto připravená směs byla nanesena do komůrek gelu, do zvláštní komůrky byl nanesen velikostní standard
- vanička s gelem byla vložena do elektroforetické vany, převrstvena asi 250 ml 0,5× TBE pufru a elektroforéza byla spuštěna (pod napětím 60 V)

- přibližně po 2 hodinách byla elektroforéza zastavena, gel byl vyjmut a obarven v lázni připravené z 500 ml destilované vody a ethidium bromidu (výsledná koncentrace 1 µg/ml)
- gely s DNA byly dokumentovány digitálním fotoaparátem

3.4.5 Rodově a druhově specifická PCR s purifikovanou DNA

Při rodově specifické PCR byla prováděna amplifikace fragmentu DNA o délce asi 250 bp pomocí primerů LbLMA1 a R16-1 [29]. Tento fragment je specifický pro bakterie rodu *Lactobacillus*.

Při druhově specifické PCR byla prováděna amplifikace fragmentu DNA o délce 132 bp pomocí primerů F_case_IS a R_case_IS [30]. Fragment je specifický pro bakterie druhu *Lactobacillus casei*. Informace o použitých primerech jsou shrnuty v Tab. 1

Tab. 1 PCR primery pro detekci bakterií rodu *Lactobacillus* a druhu *Lactobacillus casei*

Specifická PCR	Primer	Sekvence (5'→3')	Velikost PCR produktu (bp)
rod <i>Lactobacillus</i>	LbLMA1	CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC	250
	R16-1	CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA	
druh <i>Lactobacillus casei</i>	F_case_IS	CTA TAA GTA AGC TTT GAT CCG GAG ATT T	132
	R_case_IS	CTT CCT GCG GGT ACT GAG ATG T	

3.4.5.1 Příprava PCR směsi

- všechny komponenty PCR směsi byly před použitím krátce centrifugovány
- komponenty byly míchány v pořadí, které je uvedeno v Tab. 2 (rodově specifická PCR) a v Tab. 3 (druhově specifická PCR)
- při každém přidání další složky byla směs dobře promíchána
- bylo připraveno 25 µl PCR směsi do 200 µl eppendorfků
- pro negativní kontrolu (kontrola kontaminace složek PCR) byla namísto DNA matrice přidána PCR voda o objemu 1 µl
- pro pozitivní kontrolu (kontrola specifity PCR) byla jako DNA matrice použita bakteriální DNA rodu *Lactobacillus* o koncentraci 10 ng/µl v případě rodově specifické PCR, pro druhově specifickou PCR byla použita bakteriální DNA druhu *Lactobacillus casei* (10 ng/µl)

Tab. 2 Komponenty a jejich množství v PCR směsi (25 µl) pro rodově specifickou PCR

Pořadí	Komponenta	Množství (µl)
1.	voda pro PCR	19
2.	10× reakční pufr kompletní	2,5
3.	směs dNTP (10 mM)	0,5
4.	primer LbLMA 1 (10 pmol/µl)	0,5
5.	primer R16-1 (10 pmol/µl)	0,5
6.	DNA polymeráza 1.1 (1 U/µl)	1
7.	DNA matrice	1

Tab. 3 Komponenty a jejich množství v PCR směsi (25 µl) pro druhově specifickou PCR

Pořadí	Komponenta	Množství (µl)
1.	voda pro PCR	19
2.	10× reakční pufr kompletní	2,5
3.	směs dNTP (10 mM)	0,5
4.	primer F_case_IS (10 pmol/µl)	0,5
5.	primer R_case_IS (10 pmol/µl)	0,5
6.	DNA polymeráza 1.1 (1 U/µl)	1
7.	DNA matrice	1

3.4.5.2 Průběh amplifikace

- vzorky obsahující všechny komponenty byly opatrně promíchány a krátce centrifugovány
- vzorky byly vloženy do termocycleru, který pracoval podle předem nastaveného programu LBC ROD (Tab. 4) a LBC CASEI (Tab. 5)

Tab. 4 Program PCR s rodově specifickými primery

Krok	Teplota (°C)	Čas
1. Hot start	95	5 ' "
2. Denaturace DNA	95	30 ' "
3. Hybridizace primerů	55	30 ' "
4. Syntéza DNA	72	30 ' "
5. Prodloužení syntézy DNA (poslední krok syntézy)	72	10 ' "

- po prvním cyklu byl krok 2 – 4 zopakován v dalších 29 cyklech, v posledním cyklu byla syntéza prodloužena na 10 minut

Tab. 5 Program PCR s druhově specifickými primery F_case_IS a R_case_IS

Krok	Teplota (°C)	Čas
1. Hot start	94	10 ´
2. Denaturace DNA	94	1 ´
3. Hybridizace primerů	50	1 ´
4. Syntéza DNA	72	2 ´
5. Prodloužení syntézy DNA (poslední krok syntézy)	72	10 ´

- po prvním cyklu byl krok 2 – 4 zopakován v dalších 34 cyklech, v posledním cyklu byla syntéza prodloužena na 10 minut

3.4.5.3 Detekce rodově a druhově specifických PCR produktů agarosovou gelovou elektroforézou

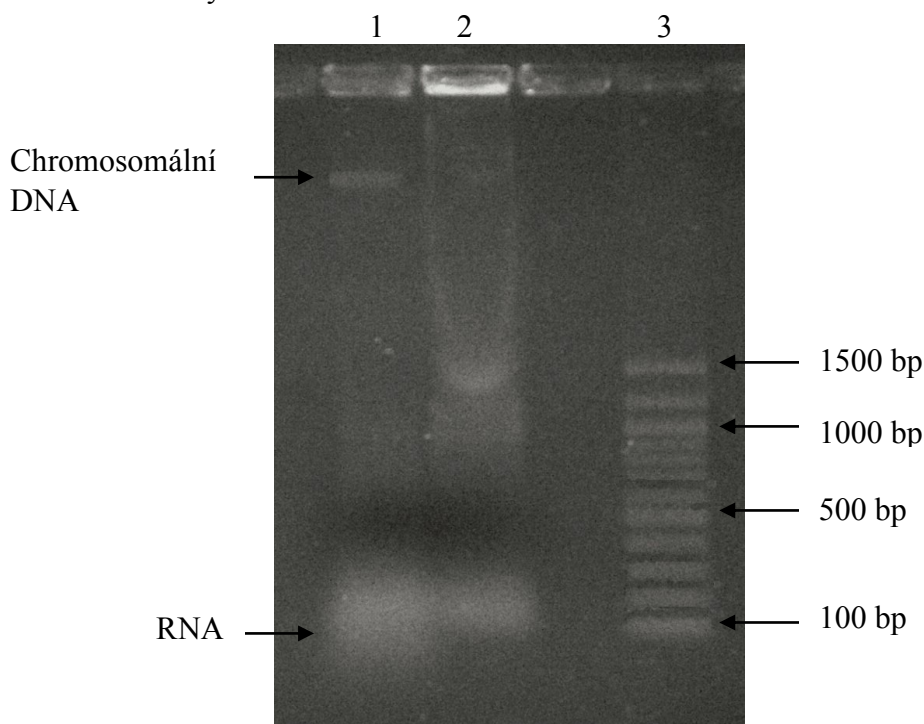
- byl připraven 1,8 % agarosový gel (0,9 g agarosy, 50 ml 0,5× TBE pufru), příprava viz. kap. 3.5.4
- k celkovému množství 25 µl PCR produktu bylo přidáno 5 µl stop pufru
- do jednotlivých komůrek gelu byly nanесeny směsi PCR produkt-stop pufr a velikostní standard
- elektroforéza byla spuštěna za stejných podmínek jako v kapitole 3.5.4
- elektroforéza byla ukončena, jakmile nanášecí pufr doputoval do 2/3 délky agarosového gelu
- gel byl obarven v lázni s ethidium bromidem (1 µg/ml), barvení probíhalo asi 1 hodinu
- obarvený gel byl prohlížen na transiluminátoru v UV světle
- výsledky byly zdokumentovány digitálním fotoaparátem

4 VÝSLEDKY

4.1 Izolace celkové DNA z výrobku Actimel

DNA byla izolovaná z mléčného výrobku Actimel Natur fenolovou extrakcí a vysrážena ethanolem. Kvalita izolované DNA byla zkontrolována agarosovou elektroforézou. Výsledek elektroforézy a popis gelu je znázorněn na Obr. 1.

Obr. 1 Agarosová gelová elektroforéza purifikované DNA a hrubého lyzátu buněk z mléčného výrobku Actimel Natur



Běh č. 1	Vzorek	Množství (μl)	Množství stop pufru (μl)	Detekce DNA
1	purifikovaná DNA	15	3	+
2	hrubý lyzáát buněk	20	3	+
3	velikostní standard	5	-	100 bp žebříček

+ DNA bylo detekováno

⇒ DNA izolovaná z výrobku Actimel Natur byla relativně intaktní a může být použita jako DNA matrice pro PCR.

4.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z výrobku Actimel

Pro spektrofotometrické stanovení koncentrace byla použita hodnota A_{260} . Čistota izolované DNA byla stanovena z poměru hodnot A_{260}/A_{280} . Výsledky měření na spektrofotometru jsou shrnuty v Tab. 1.

Tab. 1 Hodnoty absorbancí a koncentrace DNA izolované z výrobku Actimel Natur

	Koncentrace (ng/μl)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ / A ₂₈₀
Purifikovaná DNA	84	0,33	0,198	1,67

⇒ Částečně purifikovaná DNA byla izolovaná v c = 84 ng/μl. Vzorek byl znečištěn proteiny (poměr A₂₆₀/ A₂₈₀ byl 1,67).

4.2.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z výrobku Actimel po opakované purifikaci

Vzorek purifikované DNA částečně znečištěné proteiny byl opakovaně deproteinován fenolem, přesrážen ethanolem, rozpuštěn v TE pufru a proměřen na spektrofotometru. Výsledky spektrofotometrického měření jsou uvedeny v Tab. 2.

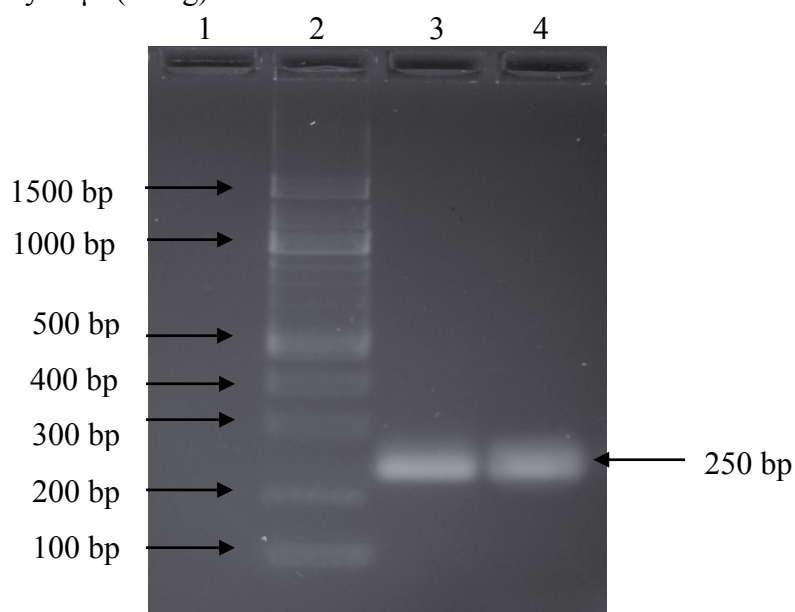
Tab. 2 Nově naměřené hodnoty absorbancí a koncentrace DNA po opakovaném přečištění

	Koncentrace (ng/μl)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ / A ₂₈₀
Purifikovaná DNA	71	0,285	0,163	1,75

⇒ Opakovaně purifikovaná DNA byla izolována v c = 71 ng/μl a ve vyhovující čistotě. Poměr A₂₆₀/A₂₈₀ byl 1,75.

4.3 Rodově specifická PCR *Lactobacillus* s celkovou DNA izolovanou z Actimelu

Rodově specifická PCR byla provedena pomocí primerů LbLMA1 a R16-1 jako kontrola amplifikovatelnosti DNA izolované z mléčného výrobku Actimel Natur. Výsledky agarosové gelové elektroforézy PCR produktů a popis gelu jsou uvedeny na Obr. 2.

Obr. 2 Agarosová gelová elektroforéza rodově specifických PCR produktů (250 bp). Amplifikován byl 1 μl (71 ng) celkové DNA izolované z Actimelu Natur

Běh č.	Vzorek	Množství PCR produktu (μl)	Detekce PCR produktu
1	Negativní kontrola	25	-
2	Velikostní standard (5 μl)	-	100 bp žebříček
3	Pozitivní kontrola (c = 10 ng/μl)	25	+
4	Purifikovaná DNA (c = 71 ng/μl)	25	+

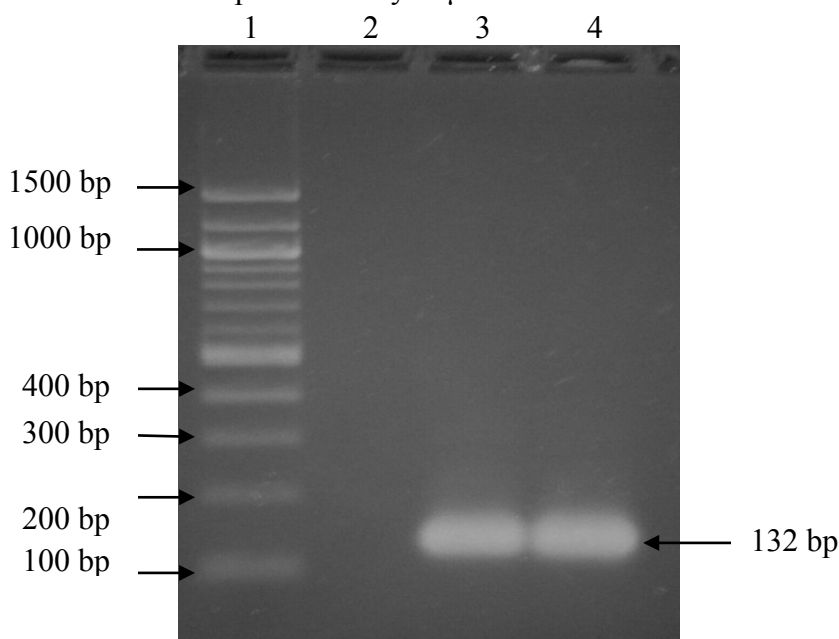
+ PCR produkt byl detekován, – PCR produkt nebyl detekován

⇒ DNA se v rodově specifické PCR amplifikovala.

4.4 Druhově specifická PCR *Lactobacillus casei* s celkovou DNA izolovanou z Actimelu

Druhově specifická PCR byla provedena pomocí druhově specifických primerů F_case_IS a R_case_IS. Výsledky detekce PCR produktů jsou uvedeny na Obr. 3.

Obr. 3 Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů (132 bp) specifických pro druh *Lactobacillus casei*. Amplifikován byl 1 μl celkové DNA izolované z Actimelu Natur



Běh č.	Vzorek	Množství PCR produktu (μl)	Detekce PCR produktu
1	Velikostní standard (5 μl)	-	100 bp žebříček
2	Negativní kontrola	25	-
3	Pozitivní kontrola (c = 10 ng/μl)	25	+
4	Purifikovaná DNA (c = 71 ng/μl)	25	+

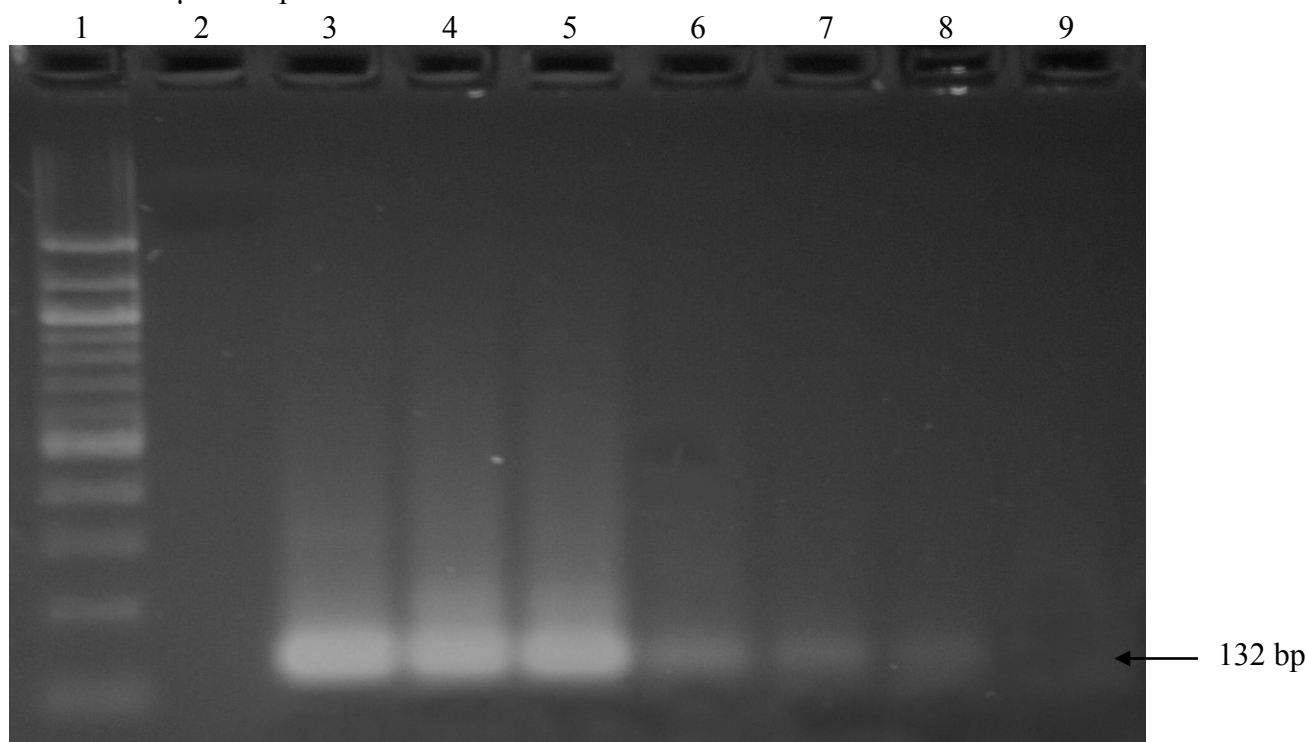
+ PCR produkt byl detekován, – PCR produkt nebyl detekován

⇒ DNA purifikovaná z výrobku Actimel byla amplifikována v PCR specifické pro druh *Lactobacillus casei*.

4.5 Stanovení nejnižšího množství DNA izolované z výrobku Actimel Natur dávající pozitivní PCR produkt

Citlivost PCR byla stanovena pomocí druhově specifických primerů F_case_IS a R_case_IS. K amplifikaci byla použita purifikovaná DNA izolovaná z Actimelu Natur, která byla naředěna na koncentraci 10 ng/μl, 1 ng/μl, 100 pg/μl až na 100 fg/μl. Výsledky agarosové gelové elektroforézy jsou uvedeny na Obr. 4.

Obr. 4 Agarosová gelová elektroforéza PCR produktů (132 bp) specifických pro *Lactobacillus casei*. Amplifikováno bylo různé množství DNA (10 ng – 10 fg). Na gel bylo nanášeno 25 μl PCR produktu



Běh č.	Vzorek	Množství DNA	Detekce PCR produktu
1	Velikostní standard (5 μl)		100 bp žebříček
2	Negativní kontrola		-
3	Pozitivní kontrola	10 ng	+
4		10 ng	+
5		1 ng	+
6	Purifikovaná DNA	100 pg	+
7		10 pg	+/-
8		1 pg	+/-
9		100 fg	-

+ PCR produkt byl detekován; - PCR produkt nebyl detekován

⇒ Nejnižší množství DNA izolované z Actimelu Natur, které bylo amplifikováno v PCR je 1 pg.

5 DISKUZE

Složení střevní mikrobioty je považováno za faktor výrazně ovlivňující zdraví hostitele. Pro udržení určitého optimálního složení mikrobioty v GIT je velmi důležité užívání probiotik (např. v podobě probiotických preparátů, fermentovaných mléčných výrobků). Aby bylo možné maximálně využít prospěšný účinek probiotik, je nutné, aby tyto mikroorganismy byly schopny přežít a množit se v GIT. Tudiž je nezbytné využití dostupných metod k identifikaci a zjištění počtu, aby bylo možné rozhodnout o užitečnosti daného probiotického mikroorganismu [3].

Nejčastěji využívanými metodami identifikace bakterií jsou amplifikační metody (např. PCR) založené na analýze nukleotidové sekvence kódující 16S rRNA nebo oblasti mezi geny pro 16S rRNA a 23S rRNA [24]. Pro identifikaci bakterií druhu *Lactobacillus casei* byla izolována a purifikována DNA z výrobku Actimel Natur s deklarovaným obsahem *Lactobacillus casei* DN 114-001 (obchodní název *Lactobacillus casei* Imunitass).

5.1 Izolace DNA metodou fenolové extrakce

Fenolová extrakce a následné přesrážení ethanolem je jednou z možných metod izolace bakteriální DNA. Přestože je tato metoda poměrně zdoluhavá, patří k nejpoužívanějším. Správné zvládnutí metody izolace DNA je předpokladem úspěšnosti PCR a obzvláště pokud se jedná o amplifikaci DNA izolované z reálných vzorků. Takové vzorky (v tomto případě z mléčného výrobku Actimel) běžně obsahují exogenní inhibitory PCR, které mohou být příčinou snížení citlivosti PCR nebo vzniku falešně negativních výsledků [27].

5.2 Stanovení kvality a kvantity DNA izolované z mléčného výrobku Actimel Natur

Pro stanovení koncentrace a čistoty DNA purifikované z mléčného výrobku Actimel byl vzorek proměřen na spektrofotometru. Směrodatnými hodnotami pro stanovení čistoty purifikované DNA jsou absorbance při vlnových délkách 260 nm a 280 nm. Poměru hodnot A_{260}/A_{280} vypovídá o čistotě DNA. Poměr absorbancí se pohybuje v rozmezí 1,8 – 2,0. Jestliže je vzorek znečištěn proteiny, pak je poměr menší než 1,8, naopak pro vzorek obsahující RNA je poměr větší nebo roven 2,0. Z hodnot měřených při 260 nm lze vypočítat koncentraci DNA ve vzorku [20]. V případě měření na nanospektrofotometru je hodnota koncentrace v ng/μl přímo odečtena.

Purifikovaná DNA byla izolovaná nejprve v $c = 84$ ng/μl a poměru A_{260}/A_{280} , který byl 1,67. Tento vzorek DNA byl částečně znečištěn proteiny. Proto byla opakována fenolová extrakce DNA. Přestože poměr A_{260}/A_{280} byl 1,75, což stále svědčí o částečné přítomnosti proteinů ve vzorku, byla purifikovaná DNA v čistotě vhodné pro PCR [26].

Přečištěním došlo ke snížení koncentrace DNA ($c = 71$ ng/μl), přesto bylo množství DNA dostačující pro její detekci agarosovou gelovou elektrofórou. Bylo zjištěno, že chromosomální DNA je relativně intaktní.

5.3 Rodově specifická PCR *Lactobacillus*

Identifikaci probiotických laktobacilů na úrovni rodu umožnilo použití specifických primerů LbLMA1 a R16-1 [30]. Velikost PCR produktu je 250 bp. DNA izolovaná z mléčného výrobku Actimel Natur byla amplifikována a detekce PCR produktů byla prováděna na 1,8 % agarosovém gelu. Detekovaný PCR produkt svědčí o přítomnosti bakterií rodu *Lactobacillus* ve vzorku.

5.4 Druhově specifická PCR *Lactobacillus casei* a stanovení její citlivosti

Fermentované mléčné výrobky se vyrábí za použití tzv. jogurtových kultur, mezi které patří i bakterie rodu *Lactobacillus*. Ne všechny laktobacily lze ale označit za probiotické. A vzhledem k tomu, že výrobek obsahoval jogurtové kultury, bylo žádoucí provést druhově specifickou PCR, aby byla prokázána přítomnost probiotického druhu *Lactobacillus casei*, který je ve výrobku deklarován.

Druhově specifická PCR byla provedena pomocí druhově specifických primerů F_case_IS a R_case_IS [30]. Detekce PCR produktů o velikosti 132 bp byla prováděna na 1,8 % agarosovém gelu.

Pro stanovení citlivosti druhově specifické PCR byla DNA izolovaná z výrobku Actimel naředěna na koncentraci 10 ng/μl, 1 ng/μl, 100 pg/μl, 10 pg/μl, 1 pg/μl a 100 fg/μl. Nejnižší koncentrace DNA dávající pozitivní PCR produkt byla $c = 1 \text{ pg/μl}$. Toto množství (1 pg) odpovídá asi 10^3 buněk/μl tj. 10^6 buněk/ml. Ve výrobku Actimel Natur je deklarováno 10^9 buněk *L. casei* Imunitass v 1 lahvičce o objemu 94,6 ml. Lze tedy předpokládat, že byla snížena citlivost druhově specifické PCR vlivem přítomnosti inhibitorů ve vzorku. Spektrofotometricky bylo zjištěno částečné znečištění vzorku DNA proteiny. Doposud ale nebyla u mléčných výrobků jednoznačně prokázána inhibice PCR proteiny. U vzorků získaných z mléčných výrobků má inhibice PCR zřejmě jinou příčinu. Ca^{2+} ionty obsažené v mléku mohou interferovat s Mg^{2+} ionty, které jsou kofaktorem *Taq*-polymerázy, snížit tak koncentraci Mg^{2+} iontů a ovlivnit citlivost PCR [27].

6 ZÁVĚR

V teoretické části práce byla provedena základní charakteristika bakterií rodu *Lactobacillus* a bylo pojednáno o využití tohoto rodu, včetně jeho využití jako probiotik a v potravinářském průmyslu. Pozornost byla věnována identifikaci probiotických laktobacilů využití metody PCR.

Cílem experimentální části práce bylo prokázat přítomnost probiotického druhu *Lactobacillus casei* v mléčném výrobku Actimel Natur.

DNA izolována z výrobku metodou fenolové extrakce byla relativně intaktní (detekce byla prováděna na 0,8 % agarosový gel). Pro ověření amplifikovatelnosti vzorku byla provedena rodově specifická PCR s primery LbLMA1 a R16-1. Detekcí PCR produktů o délce 250 bp na 1,8 % agarosovém gelu byla prokázána přítomnost bakterií rodu *Lactobacillus* ve výrobku. Probiotický druh *Lactobacillus casei* byl ve výrobku identifikován druhově specifickou PCR s primery F_case_IS a R_case_IS. PCR produkty o velikosti 132 bp byly detekovány na 1,8 % agarosovém gelu. Stanovením citlivosti druhově specifické PCR byly ve výrobku prokázány bakterie *Lactobacillus casei* v množství, které pravděpodobně odpovídá deklarovanému údaji.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] PETR P. *Nutraceutika: vybrané kapitoly z nutraceutické teorie a praxe*. 1. vyd. České Budějovice: Vysoká škola evropských a regionálních studií, 2006. 47 s. Studia VŠERS. ISBN 80-86708-17-9 .
- [2] SALMINEN S., OUWEHAND A. C, ISOLAURI E. Clinical applications of probiotic bacteria. *INTERNATIONAL DAIRY JOURNAL*. 1998, vol. 8, is. 5 – 6, pp. 563 – 572. ISSN 0958-6946 .
- [3] FUJIMOTO J., et al. Identification and quantification of *Lactobacillus casei* strain Shirota in human feces with strain-specific primers derived from randomly amplified polymorphic DNA. *INTERNATIONAL DAIRY JOURNAL*. 2008, vol. 126, is. 1 – 2, pp. 210 – 215. ISSN 0168-1605.
- [4] TOPLEY W. W. C, WILSON S. *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections : Bacteriology volume 2*. Hodder Arnold, 2005. 1544 p. ISBN 0340885653.
- [5] BERNARDEAU M., et al. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*. 2008, vol. 126, is. 3, pp. 278 – 285. ISSN 0168-1605 .
- [6] ADAMS M. R. *Food microbiology*. 2nd edition. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 2000. 479 p. ISBN 0-85404-611-9.
- [7] GÖRNER F., VALÍK L. *Aplikovaná mikrobiologie požívatín*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2009. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [8] The microscopy facility [online]. Utah State University, poslední změna 25. září 2002 [cit. 2009-01-25]. ISO-8859-1. Anglický. Dostupný z WWW: <<http://bioweb.usu.edu/microscopy/Research.htm>>.
- [9] NĚMCOVÁ Eva. *Separace a modifikace (fragmentace) bakteriálních nukleových kyselin s využitím nových typů nosičů*. Masarykova univerzita v Brně, 2007. 59 s. Vedoucí diplomové práce Doc. Ing. Bohuslav Rittich, Csc.
- [10] GEORGIEVA R. N., et al. Identification and in vitro characterisation of *Lactobacillus plantarum* strains from artisanal Bulgarian white brined cheeses. *Journal of Basic Microbiology*. 2008, vol. 48, is. 4, pp. 234 – 244.
- [11] VOTAVA M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 1. české vyd. Brno: Neptun, 2003. 495 s. ISBN 80-902896-6-5.
- [12] FRIC P. Probiotics and prebiotics – renaissance of a therapeutic principle. *Central European Journal of Medicine*. 2007, vol. 2, no. 3, pp. 237 – 270. ISSN 1644-3640 .

- [13] MATTILA-SANDHOLM T., et al. Technological challenges for future probiotic foods. *INTERNATIONAL DAIRY JOURNAL*. 2002, vol. 12, is. 3, pp. 173 – 182. ISSN 0958-6946 .
- [14] SAARELA M., et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties . *Journal of Biotechnology*. 2000, vol. 84, is. 3, pp. 197 – 215.
- [15] *Funkční potraviny* [online]. Masarykova univerzita v Brně, změněné 18. října 2005 [cit. 2009-02-13]. Windows-1250. Čeština. Dostupný z WWW: <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/mikrofloraGIT/funkcnipotrav/odk4.htm>>.
- [16] GILLOR O., ETZION A., RILEY M. A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics . *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008, vol. 81, is. 4, pp. 591 – 606. ISSN 1432-0614.
- [17] SUKOVÁ I. Význam a použití bakteriocinů. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* [online]. 2007, Jahrg. 103, Heft 11 [cit. 2009-02-20], s. 505 – 511. Dostupný z WWW: <<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=154&ch=13&typ=1&val=66436>>.
- [18] WALKER J. M., RAPLEY R. *Molecular biology and biotechnology*. 4th edition. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 2000. 563 p. ISBN 0-85404-606-2.
- [19] BERMINGHAM N., LUETTICH K. MINI-SYMPOSIUM: ADVANCES IN LABORATORY PRACTICE : Polymerase chain reaction and its applications. *Current Diagnostic Pathology*. 2003, vol. 9, is. 3, pp. 159 – 164.
- [20] BROWN T. A. *Klonování genů a analýza DNA: úvod*. 1. české vyd. Olomouc: Univerzita Palackého, 2007. 389 s. ISBN 978-80-244-1719-6.
- [21] RUML T., RUMLOVÁ M., PAČES V. *Genové inženýrství*. 1. vyd.: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2002. 270 s. ISBN 80-7080-499-8.
- [22] SACHSE K. Specificity and performance of PCR detection assays for microbial pathogens . *Molecular Biotechnology*. 2004, vol. 26, no. 1, pp. 61 – 79. ISSN 1559-0305.
- [23] *Polymerázová řetězová reakce* [online]. VŠCHT Praha, 2000, změněno 11. února 2009 [cit. 2009-03-04]. Windows-1250. Čeština. Dostupný z WWW: <<http://biomikro.vscht.cz/>>.
- [24] LISBY G. *PCR in Bioanalysis*. Vol. 92. Humana Press, 1998. ISBN 978-1-59259-575-4. Application of Nucleic Acid Amplification in Clinical Microbiology , pp. 1 – 29.
- [25] VANROMPAY D. Advances in nucleic acid-based diagnosis. *SEMINARS IN AVIAN AND EXOTIC PET MEDICINE*. 2000, vol. 9, is. 1, pp. 2 – 13. ISSN 1055-937X .
- [26] SAMBROOK J., RUSSEL D. W. *Molecular cloning. A laborator manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Press. New York. 2001. ISBN 978-087969577-4

- [27] WILSON I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. 1997, vol. 63, is. 10, pp. 3741 – 3751. ISSN 0099-2240.
- [28] NORMAND V., et al. New Insight into Agarose Gel Mechanical Properties. *Biomacromolecules* [online]. 2000, vol. 1, no. 4 [cit. 2009-02-15], pp. 730 – 738. Dostupný z WWW: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm005583j>>.
- [29] HAARMAN M., KNOL J. Quantitative real-time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. 2006, vol. 72, no. 4, pp. 2359 – 2365. ISSN 0099-2240.
- [30] DUBERNET S, DESMASURES N, GUEGUEN M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS MICROBIOLOGY LETTERS*. 2002, vol. 214, is. 2, pp. 271 – 275. ISSN 0378-1097 .

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AT	adenin a thymin
bp	pár bází (base pair)
cfu	colony forming unit (kolonie tvořící jednotku)
dATP	2'-deoxyadenosin 5'-trifosfát
dCTP	2'-deoxycytidin 5'-trifosfát
dGTP	2'-deoxyguanosin 5'-trifosfát
dNTP	deoxyribonukleosidtrifosfát
dTTP	2'-deoxythymidin 5'-trifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
GC	guanin a cytosin
GIT	gastrointestinální trakt
MRS	Mann, Rogosa, Sharpe (medium ke kultivaci)
PCR	polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
SDS	dodecylsulfát sodný
TBE	Tris-borát-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid