

Optimalizace multiplex PCR pro současnou detekci kolicinů a mikrocinů

Bc. Lucie Janáková

Diplomová práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav biochemie a analýzy potravin
akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie JANÁKOVÁ**
Osobní číslo: **T080372**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Optimalizace multiplex PCR pro současnou detekci kolicinů a mikrocinů**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Bakteriociny produkované kmeny *Escherichia coli*.
2. Metody molekulární biologie využívané pro stanovení bakteriocinů.
3. Multiplex PCR.

II. Praktická část

1. Identifikace kmenů *E.coli* netudou PCR.
2. Detekce kolicinu a mikrocinu u kolicinogenních kmenů *E.coli* pomocí PCR.
3. Optimalizace multiplex PCR.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

- [1] ŠMARDA, J. a OBDRŽÁLEK, V. Incidence of colicinogenic strains among human Escherichia coli. J. Basic Microbiol. 2001; 41: 367-374.
[2] ŠMARDA, J., ŠMAJS, D. Colicins -- Exocellular Lethal Proteins. Folia Microbiol. 1998; 43: 563-582.
[3] TRAUTNER, B.W., HULL, R.A., DAROUICHE, R.O. (2005): Colicins prevent colonization of urinary catheters. J. Antimicrob. Chemother. 56: 413-415.
[4] KRÁLOVÁ, B. Bioanalytické metody. 1.vyd., Praha: VŠCHT 2001, s.254.

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Magda Doležalová, Ph.D.

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

4. ledna 2010

Termín odevzdání diplomové práce:

19. května 2010

Ve Zlíně dne 8. dubna 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: *Bc. Janáková Lucie*.....

Obor: *THFVP*.....

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně *12. 5. 2010*

Janáková
.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

V teoretické části diplomové práce byla charakterizována bakterie *Escherichia coli*, producent antibakteriálních proteinů – bakteriocinů. Byly popsány základní vlastnosti kolicinů a mikrocinů, jejich klasifikace a detekce pomocí metody PCR, která je věnována část teoretické práce. Cílem praktické části bylo nejdříve ověřit metodou PCR identifikaci *Escherichia coli* u daného souboru kmenů izolovaných z potravin a ověřit specifitu primerů pro detekci *E. coli* na souboru kmenů *E. coli* a na souboru kmenů jiných než *E. coli* a dále optimalizovat multiplex PCR pro detekci bakteriocinů. Byl tedy sestaven systém pro detekci bakteriocinů. Použitím tohoto postupu bylo možno detekovat při jedné reakci dva různé bakteriociny. Tento systém byl aplikován na kolicinogenní kmeny *E. coli* izolované z chlazené drůbeže. Tyto kmeny produkují osm typů kolicinů a jeden typ mikrocinu. Nejčastěji byly zastoupeny koliciny E7, Ia a Ib.

Klíčová slova: polymerázová řetězová reakce (PCR), *Escherichia coli*, bakteriocin, optimalizace

ABSTRACT

Escherichia coli, producer of antibacterial proteins – bacteriocins, were characterized in the theoretical part. The basic properties, detection by PCR method and classification of colicins and microcins were described. The aim of this work was at first verified identification of *Escherichia coli* by PCR in a given set of strains isolated from food. Next part of the work was subjected to verify the specificity of primers for detection of *E. coli* on a set of *E. coli* strains and a set of strains other than *E. coli*. The main aim was to optimize multiplex PCR for the detection of bacteriocins. The system for the detection of bacteriocins was established. It was possible to detect two different bacteriocins in one reaction. This system was applied on colicinogenic *E. coli* strains isolated from chilled poultry. These strains produced eight types of colicins and one type of microcin. The most frequently were represented in the colicins E7, Ia and Ib.

Keywords: polymerase chain reaction, *Escherichia coli*, bacteriocin, optimization

Touto cestou bych ráda poděkovala své vedoucí diplomové práce Mgr. Magdě Doležalové, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady, připomínky a náměty, čímž mi významně pomohla ke zpracování zadaného tématu.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| ÚVOD | 10 |
| I TEORETICKÁ ČÁST | 11 |
| 1 ESCHERICHIA COLI | 12 |
| 1.1 <i>ESCHERICHIA COLI</i> NISSLE 1917 | 12 |
| 1.2 <i>ESCHERICHIA COLI</i> O157:H7 | 13 |
| 2 BAKTERIOCINY | 14 |
| 2.1 KOLICINY | 14 |
| 2.1.1 Kolicin E1 | 17 |
| 2.1.2 Kolicin D | 17 |
| 2.2 MIKROCINY | 18 |
| 2.2.1 Mikrocín E492 | 19 |
| 2.3 VYUŽITÍ BAKTERIOCINŮ | 19 |
| 2.3.1 Potravinářství | 19 |
| 2.3.2 Medicína a farmakologie..... | 20 |
| 3 METODY MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE | 21 |
| 3.1 PCR | 22 |
| 3.1.1 Jednotlivé komponenty PCR..... | 22 |
| 3.2 PRINCIP PCR | 24 |
| 3.3 MULTIPLEX PCR..... | 26 |
| II PRAKTICKÁ ČÁST | 28 |
| 4 CÍL PRÁCE | 29 |
| 5 MATERIÁL A METODY | 30 |
| 5.1 MATERIÁL..... | 30 |
| 5.1.1 Přístrojová technika..... | 30 |
| 5.1.2 Kultivační média | 30 |
| 5.1.3 Chemikálie | 31 |
| 5.1.4 Příprava roztoků | 31 |
| 5.1.5 Použité bakteriální kmeny..... | 32 |
| 5.2 METODY..... | 33 |
| 5.2.1 Příprava vzorků pro PCR | 33 |
| 5.2.2 Amplifikace PCR | 34 |
| 5.2.3 Amplifikace PCR bakteriocinů | 35 |
| 5.2.4 Detekce PCR produktů..... | 38 |
| 5.2.5 Stanovení biologické aktivity kolicinů kvalitativně – vpichový pokus | 38 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 6 | VÝSLEDKY A DISKUZE | 39 |
| 6.1 | DETEKCE BAKTERIE <i>ESCHERICHIA COLI</i> | 39 |
| 6.2 | KOLICINOGENIE KMENŮ <i>ESCHERICHIA COLI</i> | 43 |
| 6.3 | DETEKCE BAKTERIOCINŮ METODOU PCR | 44 |
| 6.4 | MULTIPLEX PCR | 45 |
| 6.4.1 | Vytvoření PCR systému detekce bakteriocinů | 46 |
| 6.4.2 | Využití PCR systému detekce bakteriocinů u kolicinogenních izolátů | 48 |
| | ZÁVĚR | 51 |
| | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 53 |
| | SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK | 60 |
| | SEZNAM OBRÁZKŮ | 61 |
| | SEZNAM TABULEK | 62 |
| | SEZNAM PŘÍLOH | 63 |

ÚVOD

Escherichia coli, patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*, je nejprozkoumanějším bakteriálním druhem. Přítomnost bakterie *E. coli* v potravinách považujeme za ukazatele fekálního znečištění. Ne všechny kmeny rodu *Escherichia* jsou patogenní, např. *E. coli* Nissle 1917 je využíván jako probiotikum při střevních onemocněních.

Bakteriociny jsou bohatou a rozmanitou skupinou antimikrobiálních látek bakteriálního původu, kterými bakterie mezi sebou soupeří. Přináší producentům určité výhody oproti konkurenčním druhům. Tyto látky jsou známy již několik desetiletí. Nejvíce probádanými bakteriociny jsou bezpochyby koliciny, proto se jimi v této práci budeme zabývat. Jsou produkovány mnoha kmeny *Escherichia coli* a příbuznými druhy čeledi *Enterobacteriaceae*.

Bakteriociny tvořené bakterií *Escherichia coli* se nazývají koliciny a mikrociny. Identifikace prvního kolicinu V byla provedena v roce 1925. Baquero a kol, v roce 1978 oddělil mikrociny od kolicinů na základě molekulové hmotnosti.

Bakteriociny reagují s citlivými bakteriemi pomocí receptorů v plazmatické membráně. Jejich tvorba je většinou kódována extrachromozomálně - na plazmidech. Bakteriociny mohou být díky svým vlastnostem využívány v různých oborech.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 *ESCHERICHIA COLI*

Escherichia coli, patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*, je nejprozkoumanějším bakteriálním druhem [1]. *E. coli* byla objevena v roce 1885 německým pediatrem a bakteriologem Theodorem Escherichem [2]. *E. coli* zkvašuje cukry za intenzivní tvorby kyselin a plynu. Z těchto cukrů tvoří hlavně kyselinu mléčnou, pyrohroznovou, octovou a mravenčí, přičemž část kyseliny mravenčí rozkládá na oxid uhličitý a vodík [3].

Některé kmeny, tzv. enteropatogenní *Escherichia coli*, mohou způsobovat různá onemocnění: střevní infekce, infekce močových cest, meningitidy, záněty pobřišnice, mastitidy, infekce krve a selhání ledvin. Rizikovou skupinou jsou malé děti, starší lidé a lidé s oslabenou imunitou [4]. Zvláště nebezpečný je kmen *Escherichia coli* O157:H7. Tento kmen navíc produkuje toxiny a způsobuje kažení potravin (nejčastěji dochází ke kažení sýru a masa). Může tak docházet k otravám z potravin [2]. Na druhou stranu kmen *E. coli* Nissle 1917 (O6:K5:H1) se používá jako lék při střevním onemocnění [1].

Escherichia coli produkuje dva typy bakteriocinů: koliciny a mikrocinny [5]. Baquero a kol. (1978) v roce 1978 oddělil mikrocinny od kolicinů na základě molekulové hmotnosti [6]. Vznikly dvě skupiny bakteriocinů – koliciny s molekulovou hmotností nad 10 kDa a mikrocinny s molekulovou hmotností pod 10 kDa. Mikrocinny nejsou doposud tolik probádané jako koliciny [7], [8].

Rod *Escherichia* má kromě druhu *E. coli* ještě další druhy a to *E. blattae*, *E. hermannii*, *E. vulneris*, *E. fergusonii* [9].

1.1 *Escherichia coli* Nissle 1917

V roce 1917 informoval profesor Alfred Nissle o objevu nového kmene *E. coli*, který nevykazuje patogenní vlastnosti a má inhibiční vliv na růst jiných mikrobů. Tento bakteriální kmen byl označen jménem svého objevitele a rokem, kdy byly popsány jeho vlastnosti [10].

Nepatogenní kmen *E. coli* Nissle 1917 (O6:K5:H1) se využívá jako probiotikum, hlavně při střevních onemocněních. Komerčně prodávaný probiotický preparát z tohoto kmene se nazývá Mutaflor [11]. Tento kmen byl původně izolován ze střevní mikroflóry jediných dvou zdravých příslušníků vojenské roty postižené dysenterii v průběhu první světové války. Byla definována sérologická typizace (O6:K5:H1), uskutečněna mikrobiologická charakteristika s 21 kmenově typickými metabolickými charakteristikami, biochemická typi-

zace membránových lipidů a lipopolysacharidů a bylo stanoveno spektrum buněčných bílkovin [12].

Na základě uvedených charakteristik jde o jedno z nejlépe typizovaných a prověřených probiotik, které lze použít v terapii zánětlivých chorob střev, infekčních průjmů a průjmů spojených s podáváním antibiotik [10].

1.2 *Escherichia coli* O157:H7

Na počátku osmdesátých let začala být evidována onemocnění způsobená kmenem *E. coli* O157:H7. Tato bakterie byla předtím považována za zcela neškodného obyvatele zažívacího traktu lidí i zvířat. Tento kmen se vyskytuje zejména na syrovém mase, především hovězím, dále v neošetřeném mléce a vodě. V roce 1987 byla provedena studie, která zjišťovala, přítomnost *E. coli* v masných výrobcích prodávaných v supermarketech. V testovaných vzorcích byla bakterie nalezena v hovězím mase (3,7 %), vepřovém mase (1,5 %), drůbežím a krůtím mase (1,5 %) a jehněčího masa (2 %) [13].

E. coli (EHEC) O157:H7 způsobuje hemoragický zánět tlustého střeva, který je charakterizován hemolytickou anémií, trombózou a poruchami centrální nervové soustavy, které mohou vyrůst až do selhání ledvin (hemolyticko-uremický-syndrom) a způsobit ohrožení na životě [14]. Zatím však stále neexistuje mechanismus dohledávání zdrojů nálezů a ani testování na přítomnost *E. coli* na jatkách a u zpracovatelů masa není zatím běžně prováděno [13].

2 BAKTERIOCINY

Bakteriociny jsou bohatou a rozmanitou skupinou antimikrobiálních látek bakteriálního původu, kterými bakterie mezi sebou soupeří. Rodina bakteriocinů zahrnuje proteiny různé velikosti a mikrobiálního účinku. Bakteriociny jsou produkovány grampozitivními i gramnegativními bakteriemi [15].

Bakteriociny jsou bílkoviny usmrcující citlivé kmeny téhož nebo příbuzného bakteriálního druhu či rodu. Některé bakteriociny působí na plazmatickou membránu bakteriální buňky, jiné nepříznivě ovlivňují funkci ribozomů. Nejlépe jsou prostudovány bakteriociny tvořené kmeny *Escherichia coli* nazývané koliciny a mikrocin [1].

Expresí bakteriocinů přináší producentům selekční výhodu oproti konkurenčním bakteriálním druhům. Baktericidní účinek je obvykle zacílen na blízké příbuzné kmeny stejného druhu [16]. První objev na toto téma je z roku 1925, kdy Gratia publikoval svoje poznatky o antibakteriálních substancích, později známých jako koliciny [17]. Ovšem bakteriociny prokazatelně působí nejen na buňky prokaryotické, ale i na eukaryotické, a to zejména na buňky nádorově transformované [18].

Většina buněk populace *E. coli* produkuje nejméně jeden bakteriocin. Může se jednat o jeden a více kolicinů, nebo současně o koliciny a mikrocin. Možnost produkce více bakteriocinů najednou dává buňce selekční výhodu, protože může likvidovat nejen senzitivní buňku, ale každou buňku v populaci, která je citlivá k jednomu z bakteriocinů [19]. Je známo, že kolicin Ia a mikrocin V jsou obvykle kódovány na velkých konjugativních plazmidech, avšak neví se, zda jsou tyto bakteriociny na jednom, nebo na dvou plazmidech. Nejčastěji nalezenými typy kolicinů či mikrocinů u kmenů izolovaných od osob žijících v Austrálii dle procentuálního výskytu byly: mikrocin H47, mikrocin M, kolicin Ia, kolicin E1, mikrocin V, kolicin M a kolicin E7. Další sledované bakteriociny se vyskytovaly již v množství menším než 2 % [20].

2.1 Koliciny

Koliciny jsou intenzivně studovanou podskupinou bakteriocinů. Tyto cytotoxické exoproteiny jsou produkovány bakteriální buňkou v průběhu růstu kultury. Bakteriemi schopnými produkce kolicinů jsou zejména *Escherichia coli* a některé další bakterie příbuzných rodů z čeledi *Enterobacteriaceae* (třída γ -proteobacteria) [22]. Šmarda a Obdržálek (2001) uvádí, že 41 % humánních izolátů *E. coli* je kolicinogenních [21]. Citlivé bakterie jsou nejčas-

těji stejného druhu jako produkční, protože na svém povrchu obsahují podobné struktury důležité pro vstup kolicinu do buňky.

Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* produkují nejen koliciny, ale také jiné bakteriociny, které byly pojmenovány podle rodového nebo druhového jména producenta [15]. Mají pouze základní vlastnosti a tato skupina patří do nadřazené skupiny bakteriocinů. Zatímco bakteriociny rodů *Shigella* a *Serratia* byly od počátku klasifikace bakteriocinů označovány jako koliciny, bakteriociny rodů *Enterobacter* a *Yersinia* a nověji *Serratia* se označují jinak, např. u *Enterobacter cloacae* kloaciny, u *Yersinia pestis* pesticiny a u *Serratia marcescens* marcesciny.

Klasifikace kolicinů souvisí se způsobem jejich interakce s citlivou buňkou. Koliciny se označují velkými písmeny podle receptoru citlivé buňky, se kterým interagují. Protože některé koliciny využívají stejný receptor, na základě absence zkřížené imunity se dělí do subtypů označovaných čísly. Koliciny jsou zařazovány a označovány na základě své receptorové specifity. Známe 34 kolicinů, ale pouze 21 z nich je popsáných do detailu a to A, B, D, E1 - E9, Ia, Ib, Js, K, M, N, U, 5, 10 [22]

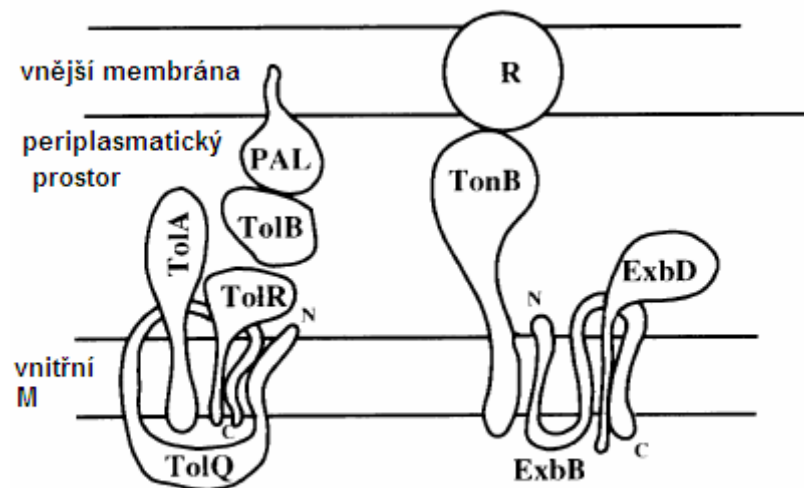
Jako doplňkové kritérium klasifikace se využívá typ transportního mechanismu kolicinů, který koliciny dělí do dvou skupin – A a B. Skupina A využívá systém Tol-Pal zahrnující proteiny TolA, TolB, TolQ, TolR, Pal a patří do něj koliciny – A, E1-E9, K, L, N, S4, U a Y. Skupina B využívá systém TonB zahrnující proteiny TonB, ExbB, ExbD a obsahuje koliciny B, D, H, Ia, Ib, M, 5 a 10 [23].

Výjimečný v tomto ohledu je kolicin Js, který nevyužívá ani jeden z těchto translokačních mechanismů a vyžaduje i odlišný typ receptoru na bakteriálním povrchu. I přes malou velikost (94 AMK) není řazen mezi mikrociny z důvodu odlišného mechanismu uvolňování z buňky [24].

TonB a ExbD, stejně jako TolA a TolR, jsou proteiny zakotvené N-koncem v plazmatické membráně, TolQ a ExbB jsou integrální membránové proteiny a TolB, který nemá analogii v Ton-systému, je lokalizován především v periplazmě. Protein TolA je analogický proteinu TonB, nejsou však vzájemně zastupitelné. Homologie mezi nimi je omezena jen na transmembránový úsek, který je důležitý pro interakci s proteinem TolQ resp. ExbB. ExbB, ExbD a TolQ, TolR proteiny mají 75% homologii a vzájemně funkční zastupitelnost. Protein TolC, který pro svou translokaci vyžadují koliciny E1, 5 a 10, není součástí

transkripční skupiny *tolQRAB* a také svým umístěním v zevní membráně odpovídá spíše receptoru, nicméně jeho receptorová funkce dosud nebyla prokázána.

Schéma proteinů translokačních systémů Tol a TonB je znázorněno na Obr. 1. Translokační systém Tol se skládá z proteinů PAL, TolA, TolB, TolQ a TolR. Translokační systém TonB se skládá z proteinů TonB, ExbB a ExbD [25].



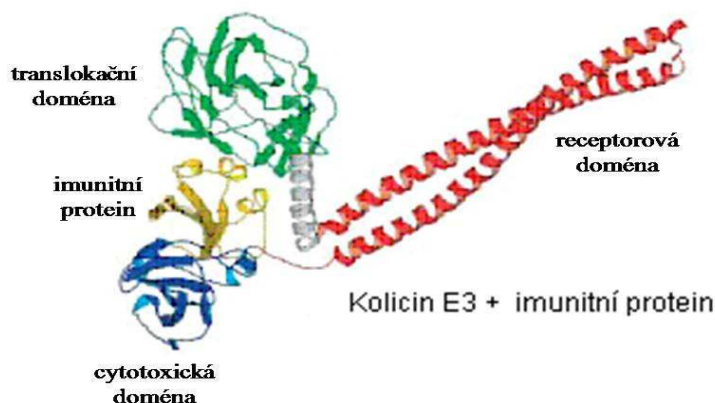
Obr. 1. Tol a Ton-B translokační systémy [25].

Další studie rozděluje koliciny podle sekvenčních podobností v letální doméně kolicinu do dvou skupin: A-typ a E1-typ. Typ A obsahuje koliciny A, B, N a U. Typ E1 zahrnuje koliciny E1, 5, K, 10, Ia, Ib [26].

Podle typu letálního účinku kolicinové molekuly můžeme rozlišovat do skupin:

- koliciny depolarizující plazmatickou membránu (A, E1, B, Ia, Ib, K, N, S4, U, Y, 5, 10);
- koliciny s endonukleázovou aktivitou (E2, E7, E8, E9);
- koliciny blokuující proteosyntézu (D, E3, E4, E5, E6);
- koliciny degradující či inhibující syntézu peptidoglykanu (M) [23].

Kolicinový operon je nesen na kolicinovém plazmidu (Col-plazmid). Skládá se obvykle ze tří genů: gen pro kolicin, gen pro imunitní protein, gen pro lytický protein. Struktura kolicinu je znázorněna na Obr. 2. Kolicinový operon je řízen promotorem, který je SOS-inducibilní např. UV-zářením či mitomycinem C [23]. Proti letálnímu efektu syntetizovaného kolicinu se produkční kmen brání produkcí tzv. imunitního proteinu. Interakce mezi volně rozpustným kolicinem a membránově vázaným imunitním proteinem je vhodným modelem pro studium protein-proteinových interakcí [27].



Obr. 2. Struktura kolicinu E3 [28].

2.1.1 Kolicin E1

Kolicin E1, stejně jako všechny koliciny depolarizující plazmatickou membránu se skládá ze tří funkčních domén, které souhrnně působí tvorbou pórů na citlivé bakterie. Vazebné a translokační domény kolicinu E1 jsou vysoce specifické na rozdíl od letální domény, naznačující, že kolicin E1 by mohly být v zásadě široce efektivní. Ve studii Patton a kol. (2007) byla vyhodnocována účinnost kolicinu E1 proti *Listeria monocytogenes* v bujónu a na povrchu potravin určených k přímé spotřebě [29]. Výsledky naznačují, že kolicin E1 je vysoce účinný proti bakterii *Listeria monocytogenes*.

2.1.2 Kolicin D

Kolicin D je složen výhradně z aminokyselin, a proto je jednoduchá bílkovina, která nevytváří komplexy s lipidy nebo lipopolysacharidy. Jedna molekula obsahuje šest zbytkových molekul cysteinu. Chování kolicinu D v roztoku dodecylsulfátusodného a 2-merkaptoetanolu signalizuje, že se neskládá z dílčích jednotek a existuje jako jednotlivý polypeptidový řetězec. Vysoká molekulární hmotnost a přítomnost šesti cysteinových zbytků v molekule rozlišuje kolicin D od všech dříve popsaných kolicinů. Ačkoliv koliciny D a E3 mají podobné mechanismy působení, jejich molekulární vlastnosti jsou zcela rozdílné [30].

2.2 Mikrociny

Escherichia coli produkuje kromě kolicinů také další skupinu bakteriocinů - mikrociny [20]. Mikrociny mají zpravidla menší velikost molekuly než koliciny. Sdílí některé podobnosti s bakteriociny gram pozitivních bakterií: jsou termostabilní, relativně hydrofobní a rezistentní k vyššímu pH [31].

Mikrociny se liší od kolicinů některými fyzikálními vlastnostmi a nejsou tak dobře prozkoumány jako koliciny. Na rozdíl od kolicinů vznikají mikrociny jako prekurzory, které často podléhají četným posttranslačním modifikacím a genetická informace o syntéze mikrocinu může být primárně nesena na chromozomu [32] nebo plazmidech [33]. Jejich produkce je indukována za stresových podmínek, zejména při nedostatku živin [32].

Uvolnění mikrocínů z buňky není záležitostí lyze, ale jsou z buňky aktivně exportovány. Export mikrocínů také zahrnuje mikrocín-specifické proteiny. Mechanismus, kterým mikrociny zabíjejí buňku, není dostatečně dobře znám, ale je známo, že některé mikrociny narušují membránový potenciál [34].

Syntéza mikrocínů je rychle aktivována, když buňky dosáhnou stacionární fáze růstu nebo při nedostatku fosforečnanu, uhlíku a dusíku (MccB17), nedostatku uhlíku a fosforečnanu (MccJ25), nebo nedostatku uhlíku (MccC51) v prostředí. Produkce mikrocínů buňkou má pravděpodobně za následek to, že buňka produkující mikrocín inhibuje ostatní mikroorganismy citlivé na účinky mikrocínů a tím získává pro sebe více živin. Mikrociny by mohly také působit jako signalizační molekuly [33].

Mikrociny mohou být rozděleny dle biochemických vlastností a mechanismu účinku na 2 třídy:

- **Třída 1** - zahrnuje peptidy s molekulovou hmotností pod 5 kDa (mikrociny B17, C7, D93, J25). Tyto mikrociny bývají často silně posttranslačně modifikovány a mají různý mechanismus účinku; např. mikrocín B17 účinkuje jako inhibitor DNA-gyrázy, mikrocín C7 inhibuje proteosyntézu [32].
- **Třída 2** - zahrnuje mikrociny E492, H47, V, L, 24 s molekulovou hmotností v rozmezí 7-10 kDa [32]. Sdílejí mnoho společných vlastností s koliciny, ale na rozdíl od kolicinů mohou být kódovány nejen plazmidem, ale i chromozomálně - např. mikrociny H47 a E492 [35].

2.2.1 Mikrocin E492

Mikrocin E492 je bakteriocin produkovaný druhem *Klebsiella pneumoniae*, aktivní proti různým druhům z čeledi *Enterobacteriaceae*. Baktericidní účinky spočívají zejména v tvorbě iontových kanálků v buněčné membráně [36].

Mikrocin E492 má také cytotoxický účinek na lidské nádorové buňky. Cytotoxický mechanismus je přes apoptózu, požadovaným mechanismem pro léčbu rakoviny. Živé buňky bakterie mohou být případně využívány jako nepřetržitý zdroj produkce mikrocinů E492 ve specifických nádorech [37]. Při nízké (5 $\mu\text{l/ml}$) a střední (10 $\mu\text{l/ml}$) koncentraci indukuje mikrocin E492 biochemické a morfologické změny typické pro apoptózu, a potenciální ztráty mitochondriální membrány. Ve vyšších koncentracích (>20 $\mu\text{l/ml}$) bylo pozorováno odumření buněk. Indukce apoptózy byla spojována s vydáním vápníku z vnitrobuněčných prostor, pravděpodobně poté, co mikrocin spustil kanálovou formaci iontu. Apoptóza je geneticky určená forma buněčné smrti, která hraje důležitou roli při rozvoji a buněčné rovnováze vícebuněčných organismů. Nekrotická buňka je obvykle důsledek fyzického zranění a bez aktivní účasti buňky. Apoptóza může být odlišována od nekrózy na základě několika morfologických a stejně tak biochemických znaků, jako jsou jaderná kondenzace, ztráta buněčného objemu a fragmentace DNA [36].

2.3 Využití bakteriocinů

2.3.1 Potravinářství

Ve studii Patton a kol. (2007) byla studována účinnost kolicinu E1 proti *Listeria monocytogenes* v bujónu a na povrchu potravin určených k přímé spotřebě [29]. Výsledky naznačují, že kolicin E1 má výrazný inhibiční účinek vůči patogenní bakterii *Listeria monocytogenes*. Tato studie prokázala potenciál využití kolicinů při zvyšování bezpečnosti potravin.

Bakteriociny, zejména produkované grampozitivními bakteriemi, mají velký potenciál jako přírodní konzervanty v potravinářském průmyslu. Aplikace bakteriocinů v procesu konzervování přináší mnoho výhod, jako příklad lze uvést lepší zachování vitaminů a výživných látek v potravinách, prodloužení trvanlivosti potravin, snižování přídavek chemických látek atd. Kromě dnes již dostupných komerčních preparátů nisinu a pediocinu PA-1/AcH, lze chemické konzervanty v mléčných produktech nahrazovat např. enterocinem 1146, který má antilisteriální vlastnosti, ale nepůsobí negativně na startovací kultury [38].

2.3.2 Medicína a farmakologie

Od objevu penicilinu v roce 1928 bylo nalezeno a vyvinuto přes 100 antibiotik účinných proti širokému spektru lidských patogenů. Je však nesporné, že rezistence bakterií proti antibiotikům dramaticky narůstá. Vědci se zaměřují na bakteriociny, které jsou velkým příslibem další generaci antimikrobiálních látek. Většina bakteriocinů se liší od tradičních antibiotik jedním zásadním způsobem: mají relativně úzké spektrum působení, a jsou tedy toxické pouze pro bakterie. Bakteriociny pravděpodobně nikdy plně nenahradí antibiotika, zejména při léčbě septických stavů. Nicméně mají léčebný potenciál při mikrobiologickém onemocnění zažívacího traktu, hnisavých infekcích kůže a spojivky [31].

Probiotické bakterie pomáhají hostitelskému organismu udržovat a obnovovat jeho přirozenou mikroflóru. Schopnost těchto bakterií eliminovat nežádoucí druhy je často způsobena produkcí účinných antimikrobiálních toxinů, a to nejčastěji bakteriocinů. Mnoho studií se zabývá využitím těchto bakteriálních rodů v probiotických terapiích pro lidský organizmus (gastrointestinální trakt, ústní dutina, dýchací trakt, vagina), dobytek a vodní kultury [39]. Ve studii Trautnera a kol. (2005) bylo *in vitro* prokázáno, že kolicin E2 produkovaný kmenem *E. coli* K-12 inhibuje růst uropatogenních kmenů *E. coli* a tím předchází vzniku infekcí močového traktu při používání katetrů [40].

3 METODY MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

Molekulární biologie je v současnosti snad nejprogresivněji se rozvíjející oblast vědy, která se využívá téměř ve všech ohledech chemického i biologického zkoumání. Z historického hlediska patří molekulární, resp. molekulárně-genetické a biotechnologické metody v oblasti přírodních věd k nejmladším [41]. Až do poloviny 60. let 20. století, kdy začaly být rutinně aplikovány postupy tzv. „biochemické genetiky“, nebylo až na výjimky možno studovat živé organizmy hlouběji než na úrovni buněk, případně větších organel. Za zakladatele genetiky, předchůdkyně biomolekulárních věd, je považován Johann Gregor Mendel, který položil základy moderních genetických zákonů [42]. Přelomový okamžik v genetice i velkém množství jiných vědních disciplín nastal v roce 1952, kdy J. Watson společně s F. H. C. Crickem objasnili strukturu molekuly DNA jako pravotočivé šroubovice. Za tento objev obdrželi roku 1962 Nobelovu cenu [43].

Metody molekulární biologie umožňují analýzu biologicky významných molekul, zejména těch, které nesou a následně uskutečňují genetickou informaci – nukleových kyselin a bílkovin. Rozvoj těchto metod v posledních dvaceti letech umožnil detailní analýzu genetické informace a od ní odvozených vlastností u původců nemocí - patogenů i u jejich hostitelů – pacientů [44].

Molekulárně biologické metody lze velmi obecně rozdělit do dvou skupin, a to na klasické metody, bez amplifikace cílové sekvence, a metody amplifikační - z polymerázové řetězové reakce (PCR, z anglického Polymerase Chain Reaction) jako hlavní metodou. Non-amplifikační metody (Northern blot, Southern blot apod.) vyžadují velké množství nukleových kyselin z často heterogenních buněk nebo tkání, klasická PCR má oproti jiným metodám mnoho výhod, jako je např. vysoká specifita a citlivost [45].

Dnes nejužívanější metody v diagnostice jsou založeny na PCR. Jejich výhody spočívají především ve vysoké specifitě, citlivosti, možnosti standardizovaného přístrojového provedení s minimálním množstvím biologického materiálu potřebného k vyšetření. Ve svých důsledcích se tyto výhody projeví včasnou a přesnou diagnostikou při respektování komfortu pacienta. Zásadní nedostatek: na konci reakce nekoreluje množství PCR produktu s počtem cílových sekvencí ve vzorku [44]. Tento problém je vyřešen u real - time PCR umožňující přesnou kvantifikaci hledané cDNA sekvence vzorku. Principem je přímá detekce a kvantifikace PCR produktů v každém jednotlivém cyklu PCR. Během amplifikace je stanovena změna intenzity fluorescenčního záření [46].

3.1 PCR

Polymerázová řetězová reakce byla popsána roku 1983 Kary Mullisem jako *in vitro* metoda pro enzymatickou syntézu definované sekvence DNA [47] a vynesla jejímu objeviteli v roce 1993 Nobelovu cenu [48]. PCR je nejčastěji používanou molekulárně – biologickou amplifikační technikou v diagnostice. Cílová DNA bývá často ve vzorcích analyzovaných většinou pro účely genotypizace nebo detekce mikroorganismů přítomna v tak nízkých koncentracích, že jí není možno po izolaci přímo detekovat. Proto je nezbytné zvýšit analytickou senzitivitu její mnohonásobnou replikací [49].

Pomocí této metody lze na základě komplementarity bází obsažených v molekule nukleové kyseliny namnožit cílovou nukleovou kyselinu. Přítomnost cílové nukleové kyseliny ve vyšetřovaném vzorku je dále prokazována různými postupy (elektroforéza s následnou vizualizací v UV světle nebo hybridizace se specifickými sondami nukleové kyseliny s následnou imunoenzymatickou vizualizací) [50]. Základem úspěšné reakce je použití neporušeného úseku DNA, který má být amplifikován. Velmi důležitým předpokladem pro úspěšnou reakci je navržení vhodných primerů tak, aby byla zajištěna specificita reakce. Jak návrh oligonukleotidových primerů, tak programování reakčních kroků vychází z obecné znalosti struktury DNA a ze znalosti sekvence, k níž jsou příslušné oligonukleotidy komplementární. Je tedy nutné zdůraznit, že pro PCR je nutno znát sekvence alespoň hraničních úseků fragmentu, který má být amplifikován [51].

3.1.1 Jednotlivé komponenty PCR

- **DNA templát**

DNA je tvořena dvěma komplementárními řetězci spojenými interakcemi dusíkatých bází nukleotidů (A, G, C, T). Lineární sekvence těchto bází poskytuje informaci genetického kódu, kde tři po sobě následující báze určují jednu aminokyselinu. Komplementarita párování bází mezi dvěma řetězci je A s T a G s C.

Stabilita dvoušroubovice DNA, a tím i teplota, při níž dochází k denaturaci, závisí na několika faktorech [51]. Dvouřetězcová struktura DNA ovšem není stabilizována pouze vodíkovými můstky, ale i sendvičovým uspořádáním bází a dalšími interakcemi. Dochází přitom k úplnému rozdělení na dvě vlákna. Tento proces se nazývá denaturace DNA, protože molekula ztrácí své přirozené uspořádání [52]. Především se na tepelné stabilitě podílí obsah guaninu a cytozinu. S jejich molárním poměrem roste teplota nutná k denaturaci. Tep-

lota, při níž k denaturaci dochází, se nazývá teplota tání a je označována jako T_m (melting temperature) [51].

- **dNTP**

Směs volných nukleotidových zbytků deoxyadenozintrifosfát (dATP), deoxyguanozintrifosfát (dGTP), deoxytymidintrifosfát (dTTP), deoxycytidintrifosfát (dCTP), které jsou zařazovány DNA-polymerázou do nově vznikajícího řetězce [53].

- **MgCl₂**

Vyšší koncentrace hořčnatých iontů stabilizuje dvoušroubovici DNA. Příliš vysoká koncentrace brání úplné denaturaci. Snižuje se tím specifičnost nasedání primerů, jelikož primery v prostředí s nízkou stringencí se můžou navázat na jakékoliv jen částečně komplementární místo. Je-li koncentrace těchto iontů nižší než 0,5 mmol/l, netvoří se komplex primer-templát nebo se celý komplex krátce po začátku prodlužování rozpadá. Některé z hořčnatých iontů jsou vychytávány dNTP [54].

- **Taq DNA-polymeráza**

DNA-polymeráza je izolována z termofilních bakterií, žijících v pramenech horkých až 100 °C, která vykazuje dostatečnou enzymovou aktivitu po celou dobu syntézy. Nejpoužívanější termostabilní polymeráza je *Taq*, která pochází z eubakterie *Thermus aquaticus* [55]. Použití termostabilní DNA-polymerázy zajišťuje dostatečnou aktivitu enzymu po celou dobu amplifikace. *Taq* DNA-polymeráza má teplotní optimum při 75 °C a poločas inaktivace je přibližně 40 minut při 95 °C. Jedná se o enzym, který má pouze 5'→3' polymerázovou aktivitu a postrádá 3'→5' exonukleázovou aktivitu, což znamená, že tento enzym není schopen opravovat chyby vzniklé při replikaci [51]. V současné době už však *Taq* DNA-polymeráza není získávána izolací z bakterií, ale její produkce se stala předmětem genetického inženýrství. Činnost enzymu je závislá na mnoha faktorech: kvalitě a koncentraci templátové DNA, primerech, přítomnosti stimulátorů nebo inhibitorů její aktivity [56].

Kromě *Taq* DNA-polymerázy jsou používány také *Pwo* a *Pfu* DNA polymerázy (zdroj: *Pyrococcus woesei* a *Pyrococcus furiosus*). Tento enzym má kromě polymerázové aktivity také 3'→5' exonukleázovou aktivitu umožňující opravu chybně inkorporovaných deoxynukleotidů. Produkty tohoto enzymu jsou syntetizovány s desetinásobně vyšší předností ve srovnání s *Taq* polymerázou. Proto je tento enzym vhodnější pro přípravu produktů pro klonování a pro přípravu značených sond. Syntetizuje pouze fragmenty do délky cca 3 kb [51].

- **pufr**

Každá firma, která vyrábí chemikálie pro PCR reakce, dodává k DNA polymeráze i pufr, jehož složení odpovídá optimálnímu prostředí pro aktivitu polymerázy.

- **oligonukleotid - primery**

Primery jsou krátké oligonukleotidové DNA sekvence nejčastěji v rozmezí 18-30 bází. Jedná se o řetězce komplementární vždy k 3' konci oblasti vybrané části templátové DNA. Existuje několik pravidel výběru primerů, potažmo oblastí templátové DNA. V přítomnosti velice nízké koncentrace templátu se krátké sekvence primerů na sebe specificky „lepí“ a jejich 3'-konec tvoří pozici pro nasednutí DNA polymerázy [57].

Zásadní pravidla pro navrhování primerů:

- nesmí být k sobě komplementární
- jejich délka by se měla pohybovat mezi 18-30 bp a rozdíl v počtu bází jejich délek by neměl být větší než 3
- disociační teplota T_m by měla být přibližně stejná

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$$

$$T_m = 69,3 + (0,41 \times (\%G+C)) - 650/\text{délka}$$

$$T_m = 81,5 + 16,6(\log_{10}[K+]**) + 0,41(\%G+C) - 600/\text{délka}$$

* T_m bývá běžně určována výrobcem primerů

** $[K+]$ koncentrace monovalentních kationtů v reakční směsi

- obsah GC by měl být v rozmezí 40–60 % [58]
- teplota T_m primeru alespoň 50 °C
- podobná teplota T_m u obou primerů
- specifická primerů na matricové DNA nesmí být nespecifická vazebná místa

Pro návrh primerů v analyzovaných oblastech sekvence DNA existuje řada počítačových programů, které umožňují zohlednit výše zmíněná pravidla., např. Primer3, který je volně přístupný na internetu (<http://frodo.wi.mit.edu/>) [59].

3.2 Princip PCR

Vlastním principem polymerázové řetězové reakce je *in vitro* amplifikace specifického úseku nukleové kyseliny DNA. Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5'→3' prostřednictvím DNA-polymerázy, při níž se v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídají tři kroky, během nichž probíhají tři odlišné děje s odlišnými nároky na teplotu (Obr. 3.) [54].

1. fáze (denaturace) – dochází k zahřátí roztoku na teplotu 94 - 95 °C, což způsobí denaturaci dvojitého řetězce DNA, rozpadnou se vodíkové můstky mezi vlákna DNA a vznikají dvě jednořetězcové DNA (ssDNA). V buňkách rozplétají dvoušroubovice speciální enzymy (helikázy, topoizmerázy) [61].

2. fáze (annealing) – annealingová teplota se pohybuje v dosti širokém intervalu (55 – 75 °C). Studovaný úsek nukleotidové sekvence je vymezen připojením dvou primerů, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'-konce směřují proti sobě. Takto se určí, od kterého místa a kterým směrem (od 3'-konce primeru) má DNA-polymeráza začít syntetizovat komplementární vlákno. To je v PCR zajištěno použitím dvou primerů, které nasedají na komplementární sekvence ve dvou templátových vláknech. Templátová vlákna vznikají denurací původně dvouvláknové DNA [60]. Pokud jsou ve směsi v nadbytku specifické oligonukleotidy, budou hybridizovat se svou komplementární sekvencí rychleji, než dlouhé jednořetězcové molekuly, jejichž koncentrace je mnohem nižší. Teplota, při níž hybridizace probíhá, je pro výsledek PCR kritická a musí být vhodně nastavena pro použitý pár primerů. Při příliš nízké teplotě mohou primery nasedat i na sekvence, které jsou komplementární jen z části, a vytvoří se nespecifický produkt. Při příliš vysoké teplotě zase budou primery málo hybridizovat a produktu se nevytvoří dostatečné množství [61].

Podmínky pro hybridizaci primerů závisí na zastoupení bází, délce oligonukleotid a hodnotě T_m produktu. Teplota pro připojení (hybridizaci) primerů (T_a) se stanovuje podle vztahu:

$$T_a = 0,3 \times T_m^{\text{primer}} + 0,7 \times T_m^{\text{produkt}} - 25$$

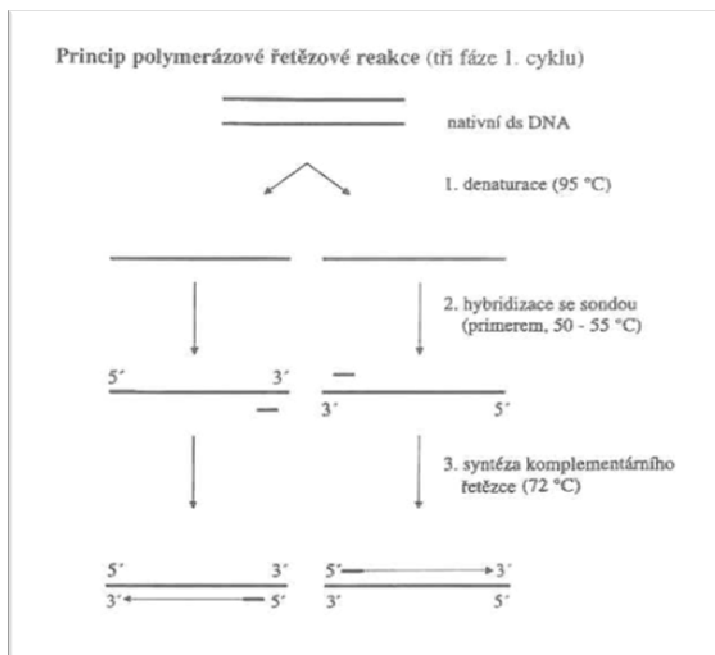
Avšak obecně užívaným pravidlem pro stanovení T_a je snížení teploty T_m o 5°C. Teplota T_a se obvykle pohybuje v rozmezí 55 až 68°C po dobu 30-60 s, doporučuje se však provést její optimalizaci [59].

3. fáze (elongace) - teplota se zvyšuje na 72 °C, kdy je aktivita *Taq* – polymerázy optimální. Oligonukleotidy, které dosedly na jednořetězcovou DNA (templát) v předchozím kroku, slouží v tomto kroku jako primery pro DNA-polymerázu. Od jejich 3'-konce začíná syntéza nového řetězce komplementárního s templátem [61].

Po prvním cyklu se počet řetězců DNA ve směsi zdvojnásobí. V dalším cyklu mohou jako templát pro polymerázu sloužit i nově vytvořené řetězce, takže se syntetizuje dvojnásobné množství produktu. Při opakujících se cyklech bude množství vytvořených řetězců přibývat exponenciálně. Po 30 cyklech PCR se teoreticky vytvoří asi 10^9 × více specifického produktu než ostatních úseků DNA, jejichž podíl je tak ve výsledné směsi prakticky zanedbatelný. Skutečný výtěžek PCR bývá podstatně nižší, než zmíněných 10^9 kopií na jednu

molekulu DNA po 30 cyklech. To je dáno postupným vyčerpáváním složek reakce v průběhu amplifikace. Po určitém počtu cyklů dosáhne koncentrace produktu plató a dále se již prakticky nezvyšuje [62].

Reakce PCR se provádějí v zařízení nazývaném termocykler, v němž se teplota mění automaticky v naprogramovaných časových intervalech. Hlavními požadavky jsou přesnost teploty a rychlost přechodu mezi jednotlivými teplotami [63].



Obr. 3. Princip polymerázové řetězové reakce [54].

3.3 Multiplex PCR

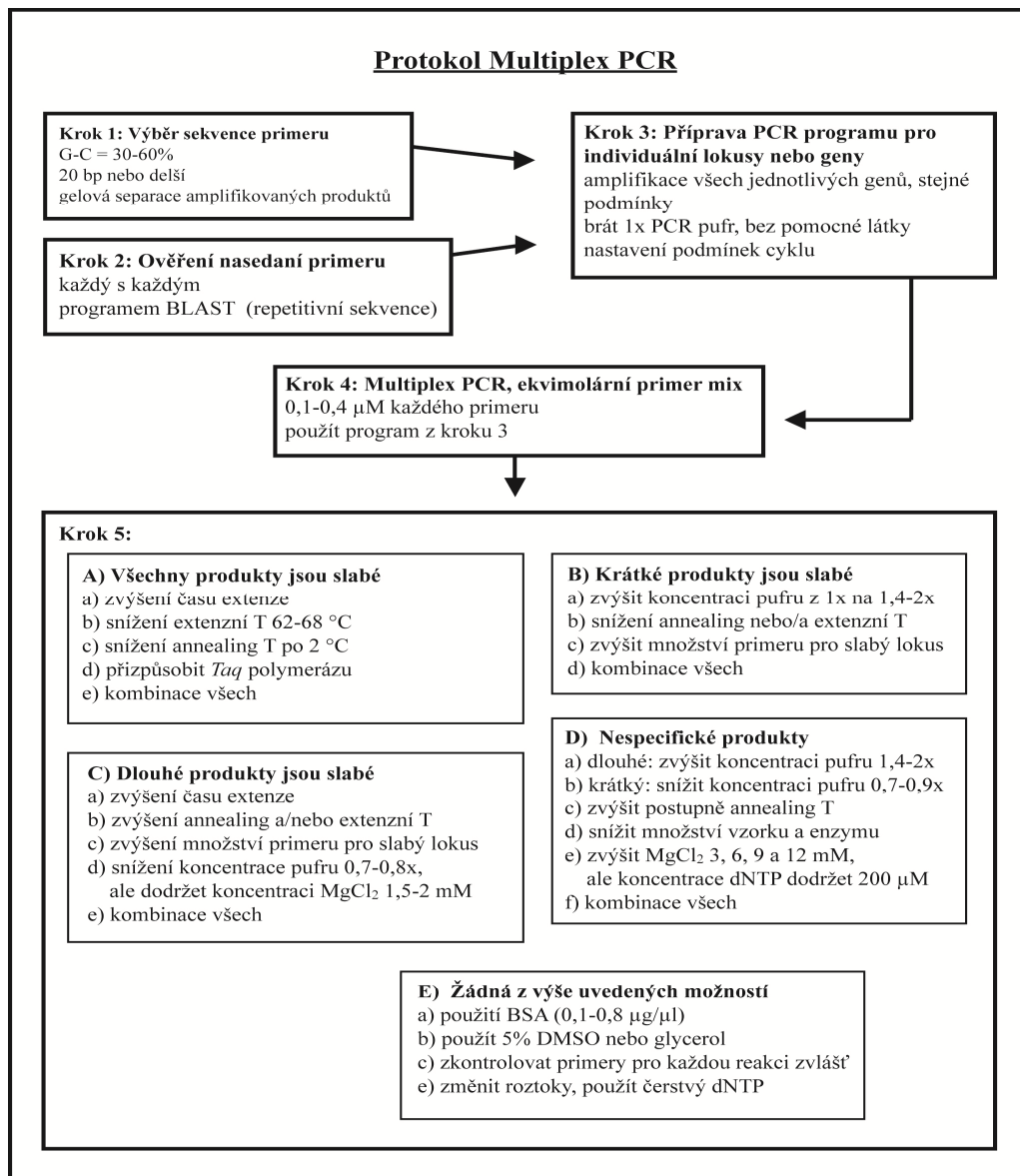
Mnohonásobná PCR je taková varianta PCR, kdy je do reakční směsi přidáno několik párů primerů rozpoznávajících několik rozdílných sekvencí, což umožňuje detekci několika genů současně v jedné reakční směsi. Reakční podmínky pro současnou amplifikaci všech produktů je nutno empiricky, krok za krokem optimalizovat. Hlavní výhodou této varianty jsou nižší cenové náklady než při samotných amplifikacích, a proto se používá pro vyhledávání změn na dlouhých sekvencích DNA, testování vzájemně nesouvisejících oblastí na DNA a zejména pro amplifikaci vnitřních kontrol současně se vzorky [59].

Současná amplifikace několika cílů najednou se provádí s několika záměry:

- mohou být sledovány změny v rozsáhlých oblastech DNA;
- mohou být sledovány různé segmenty cílového genomu;
- může být zahrnuta vnitřní kontrola amplifikovatelnosti vzorku;

- mohly by být vyvinuty cenově efektivní panely testů pro detekci více patogenů v jediném vzorku.

Nejsložitější je fáze přípravná, kdy je nutno vypracovat takové reakční podmínky (sekven-
ce nukleotidu, koncentrace primeru, optimální teploty jednotlivých kroku cyklu atd.), aby
amplifikační reakce pro každý testovaný úsek genomické DNA neprobíhala pouze v přípa-
dě, že se jedná o mutaci v příslušném místě. Pro každou reakci je zařazená pozitivní a ne-
gativní kontrola [64]. Tyto kroky pro optimalizaci jsou uvedeny na Obr. 4 [65].



Obr. 4. Optimalizace multiplex PCR [65].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo ověřit identifikaci *Escherichia coli* u daného souboru kmenů izolovaných z potravin. Dalším cílem bylo vytvořit systém rychlé detekce všech popsaných kolicinů a mikrocinů u kmenů *Escherichia coli* metodou PCR. Pro zpracování praktické části bylo nutné naplnit tyto dílčí cíle:

- ověřit specifitu primerů pro detekci *Escherichia coli*;
- otestovat sadu primerů pro detekci jednotlivých kolicinů a mikrocinů;
- optimalizovat multiplex PCR;
- detekovat koliciny a mikrocinů u kolicinogenních kmenů *Escherichia coli* izolovaných z potravin.

5 MATERIÁL A METODY

Praktická část zahrnovala dva experimenty. Experiment 1 navazoval na předchozí diplomovou práci [66] a cílem bylo ověřit funkčnost použitých primerů (Tab. 4.) pro detekci *Escherichia coli*. V Experimentu 2 byla u vybraných bakteriálních kmenů *E. coli* zkoumána produkce kolicinů a mikrocinů. Dále byla navržena a optimalizována multiplex PCR pro jejich jednodušší a rychlejší detekci.

5.1 Materiál

Tyto materiály byly použity v Experimentu 1 a 2.

5.1.1 Přístrojová technika

- autokláv 135 S, H+P Varioklav - H+P Labortechnik AG, Německo
- digitální váha KB 800-2 - Kern&Sohn GmbH, Německo
- biologický termostat BT 120 - Laboratorní přístroje Praha, Česká republika
- automatické mikropipety – Nichiryo, Japonsko
- laboratorní chlazená centrifuga 2300K - Hermle Labortechnik, Německo
- termoblok BIO TDB-100 - Dry Block Heating Thermostat, Litva
- termocykler DNA Engine PTC-200 - Bio-Rad Thermal Cycler, USA
- elektroforéza - Owl Separation Systems, USA
- UV-transluminátor UC-4100 - Ultra Lum Inc., USA
- fotoaparát Power Shot G6 s UV filtrem – Canon, Japonsko
- běžné laboratorní sklo a plast

5.1.2 Kultivační média

- MPA2 - agar
 - masový výtažek 10 g
 - pepton 10 g
 - chlorid sodný NaCl 5 g
 - agar 15 g
 - destilovaná voda 1000 ml
 - pH 6,8 - 7
- MPB2 - bujon
 - masový výtažek 10 g

- pepton 10 g
- chlorid sodný NaCl 5 g
- destilovaná voda 1000 ml
- pH 6,8 – 7

5.1.3 Chemikálie

- 100 bp DNA standard pro elektroforézu – New England BioLabs Inc., USA
- dNTP mix/12,5 mM (mixture of dATP, dCTP, dGTP, dTTP) – Jena Bioscience GmbH, Německo
- *Taq* DNA-polymeráza (Taq DNA Polymerase with ThermoPol Buffer) + pufr (10x ThermoPol Reaction Buffer) – New England BioLabs Inc., USA
- primery – Invitrogen, USA (Tab. 1)
- etidium bromid (zásobní roztok 10 mg/ml) – SERVA Electrophoresis GmbH, Německo
- LE agarose - Cambrex Bio Science Rockland, Inc., USA

5.1.4 Příprava roztoků

- 100bp DNA ladder
 - 20 μ l DNA ladder
 - 50 μ l nanášecího pufru
 - 180 μ l H₂O
- TAE pufr 50x
 - Trizma 242 g
 - 0,5 M EDTA 100 ml
 - kyselina octová 57,1 ml
 - destilovaná voda doplnit do 1000 ml
- TAE pufr 1x
 - TAE pufr 50x 20 ml
 - destilovaná voda 980 ml
- nanášecí pufr LB (6x koncentrovaný)
 - bromfenolová modř 10 mg
 - 0,5M EDTA 1,2 ml
 - 10% SDS 600 μ l
 - glycerol 1,2 ml

- destilovaná voda doplnit do 10 ml

5.1.5 Použité bakteriální kmeny

Kmeny *Escherichia coli* byly získány ze sbírky Ústavu technologie a mikrobiologie potravin (ÚTMP), Fakulty technologické, Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, dále z Biologického ústavu, Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně a České sbírky mikroorganismů v Brně (CCM).

Kmeny ze sbírky ÚTMP byly izolovány z kůže chlazených kuřat, kromě *Salmonella Typhimurium*. Přehled použitých kmenů je uveden v Tab. 1. a Tab. 2. Kmeny v Tab. 2. byly získány z potravin zakoupených v místních prodejnách, voda byla získána ze soukromé studny na pitnou vodu.

Tab. 1. Seznam použitých bakteriálních kmenů.

| CCM | Sbírka BÚ LF MU | Sbírka ÚTMP FT UTB |
|--|-----------------------------------|---------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> CCM 3954 | <i>Escherichia hermanii</i> 941 | <i>E. coli</i> 17 |
| <i>Bacillus cereus</i> CCM 2010 | <i>Escherichia fergusonii</i> 873 | <i>E. coli</i> 59 |
| <i>Bacillus subtilis</i> CCM 2216 | <i>Shigella boydii</i> U8 | <i>E. coli</i> 62 |
| <i>Micrococcus luteus</i> CCM 732 | <i>Shigella sonnei</i> 17 | <i>E. coli</i> 64 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> CCM 2798 | <i>Shigella flexneri</i> | <i>E. coli</i> 66 |
| | <i>Enterobacter aerogenes</i> | <i>E. coli</i> 92 |
| | <i>Kluyvera ascorbata</i> 1606 | <i>E. coli</i> 93 |
| | <i>Yersinia frederiksenii</i> Y26 | <i>E. coli</i> 94 |
| | <i>Yersinia intermedia</i> Y418 | <i>E. coli</i> 99 |
| | <i>Yersinia kristensenii</i> Y281 | <i>E. coli</i> 104 |
| | <i>E.coli</i> DH10B | <i>E. coli</i> F' |
| | <i>E.coli</i> U1K1 | <i>E. coli</i> B' |
| | <i>E.coli</i> XL10-Gold | <i>E. coli</i> E' |
| | <i>E.coli</i> Row | <i>E. coli</i> D' |
| | <i>E.coli</i> φ | <i>Pseudomonas fragi</i> |
| | <i>E.coli</i> B1 | <i>Pseudomonas putida</i> |
| | | <i>Moraxella</i> |
| | | <i>Acinobacter</i> sp. |
| | | <i>Aeromonas</i> sp. |
| | | <i>Klebsiella oxytoca</i> |
| | | <i>Serratia marcescens</i> |
| | | <i>Pantoea agglomerans</i> |
| | | <i>Serratia liquefaciens</i> |
| | | <i>Leclercia adecarboxylata</i> |
| | | Enteric Group 69 |
| | | <i>Yersinia enterocolitica</i> |
| | | <i>Proteus vulgaris</i> |
| | | <i>Staphylococcus</i> sp. |

Pokračování Tab. 1.

| CCM | Sbírka BÚ LF MU | Sbírka ÚTMP FT UTB |
|-----|-----------------|--|
| | | <i>Staphylococcus aureus</i> sub-sp. <i>aureus</i> |
| | | <i>Enterococcus</i> sp. |
| | | <i>Salmonella</i> Typhimurium ÚTMP 10 |
| | | <i>E. coli</i> EY1 |
| | | <i>E. coli</i> EU1 |

Tab. 2. Seznam kmenů izolovaných z potravin a vody

| | |
|-----------|---|
| 1 | kuřecí kůže, 1. 12. 2009 |
| 2 | voda ze studny, 3. 11. 2009 |
| 3 | ovčí sýr, 19. 10. 2009 |
| 4 | kravský sýr, 19. 10. 2009 |
| 5 | Eidam vnitřní vrstva, 1. 12. 2009, vzorek 1 |
| 6 | Eidam vnitřní vrstva, 1. 12. 2009, vzorek 2 |
| 7 | Eidam vnitřní vrstva, 1. 12. 2009, vzorek 3 |
| 8 | kuřecí křídlo chlazené, 4. 2. 2010, 14 |
| 9 | kuřecí křídlo chlazené, 4. 2. 2010, 19 |
| 10 | kuřecí křídlo chlazené, 4. 2. 2010, 20 |
| 11 | krutí biskup chlazený, 4. 2. 2010 |

5.2 Metody

5.2.1 Příprava vzorků pro PCR

DNA byla z bakteriálních buněk uvolněna lyzí metodou povaření. Narostlé buňky z bujony byly převedeny do eppendorfky (500 µl) a centrifugovány při 4000 ot./5 min. Supernatant byl odlit a zbytek resuspendován ve 100 µl 1x ředěného PCR pufru. Suspenze byla inkubována v termobloku 20 minut při 95 °C. Po povaření byla provedena centrifugace při 10000 tis. ot./4 min. Supernatant byl převeden do čisté eppendorfky a použit jako templát do PCR reakce. DNA se nachází v supernatantu a skladuje se při 20 °C několik měsíců.

Pro ověření přítomnosti DNA byla použita metoda PCR pro detekci části genu 16S rRNA za použití primerů 27F a 1492R (30 cyklů, 94 °C/45 s, annealing 54 °C/45 s, 72 °C/90 s) uvedeny Tab. 4. Washio a kol. (2005) použili ve své práci také tyto primery pro zjištění správné extrakce DNA ze čtyř vzorků bakterií izolovaných z ústní dutiny člověka [67].

5.2.2 Amplifikace PCR

PCR reakce byly provedeny v termocykleru v celkovém objemu amplifikační směsi 25 μ l. Jednotlivé komponenty pro prováděné reakce byly připravovány ve formě master mixu (Tab. 3).

Amplifikační reakce pro detekci *E. coli* byla provedena za těchto podmínek:

| | |
|-------------------|--------------------------------|
| Úvodní denaturace | 95 °C/ 5 minut |
| Opakování cyklu | 35x |
| Denaturace | 95 °C/1 minuta |
| Annealing | 56,6 °C nebo 56,9 °C/ 1 minuta |
| Extenze | 72 °C/ 1 minuta |
| Závěrečná extenze | 72 °C/3 minuty |
| Chlazení | 4 °C/ ∞ |

Tab. 3. Složení amplifikační směsi PCR pro detekci *E. coli*.

| Složka PCR směsi | Objem (μ l) |
|--------------------|------------------|
| PCR pufr | 2,5 |
| dNTP mix | 0,5 |
| Taq DNA polymeráza | 0,1 |
| primer-F | 0,25 |
| primer-R | 0,25 |
| templátová DNA | 0,5 |
| H ₂ O | 21 |

Tab. 4. Použité primery

| Název primeru | Sekvence primeru 5' - 3' | Velikost produktu (bp) |
|---------------|--------------------------|------------------------|
| LZL-389 | ATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCC | 264 |
| LZR-653 | GGTTTATGCAGCAACGAGACGTCA | |
| 27F | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG | 1,5 |
| 1492R2 | TACGGTTACCTTGTTACGACTT | |

5.2.3 Amplifikace PCR bakteriocinů

Jedna reakce byla prováděna v celkovém objemu 25 μl . Jednotlivé komponenty pro reakci byly míchány ve formě master mixu (Tab. 5.).

Amplifikační reakce byla prováděna za jiných podmínek než v Experimentu 1.

Podmínky reakce pro detekci kolicinů a mikrocinů:

| | |
|-------------------|-----------------|
| Úvodní denaturace | 95 °C/ 5 minut |
| Opakování cyklu | 35x |
| Denaturace | 95 °C/1 minuta |
| Annealing | 55 °C/ 1 minuta |
| Extenze | 72 °C/ 1 minuta |
| Závěrečná extenze | 72 °C/3 minuty |
| Chlazení | 4 °C/ ∞ |

Tab. 5. Složení amplifikační směsi pro bakteriociny.

| Složka PCR směsi | Objem (μl) |
|-----------------------|-------------------------|
| PCR pufr | 2,5 |
| dNTP mix | 0,5 |
| Taq DNA polymeráza | 0,1 |
| primer-F ₁ | 0,25 |
| primer-R ₁ | 0,25 |
| templátová DNA | 0,5 |
| H ₂ O | 21 |

Gordon a O'Brien (2006) použili ve své práci specifické primery pro PCR detekci vybraných druhů kolicinů (Tab. 6.). Stejně sekvence primerů byly použity i v této práci a to u kolicinů B a E1, ostatní primery byly získány z Biologického ústavu Lékařské fakulty MU v Brně. Velikosti vzniklých PCR produktů jsou uvedeny v Tab. 6. [20].

Tab. 6. Použité kolicinové primery.

| Označení | Typ kolicinu | Název primeru | Sekvence primeru 5'-3' | Velikost produktu (bp) |
|----------|--------------|---------------|------------------------|------------------------|
| 1 | A | ColA-F | CGTGGGGAAAAGTCATCATC | 475 |
| | | ColA-R | GCTTTGCTCTTTCCTGATGC | |
| 2 | B | ColB-F | AAGAAAATGACGAGAAGACG | 492 |
| | | ColB-R | GAAAGACCAAAGGCTATAAGG | |
| 3 | D | ColD-F | CTGGACTGCTGCTGGTGATA | 420 |
| | | ColD-R | GAAGGTGCGCTTACTACTGC | |
| 4 | E1 | ColE1-F | TGTGGCATCGGGCGAGAATA | 649 |
| | | ColE1-R | CTGCTTCCTGAAAAGCCTTTT | |
| 5 | E2 | ColE2-R | TGATGCTGCTGCAAAAGAG | 409 |
| | | ColE2-R | TTCAAAGCGTTCCTACCAC | |
| 6 | E3 | ColE3-F | TAAGCAGGCTGCATTTGATG | 413 |
| | | ColE3-R | TCGGATTCCGACCTTTCAAC | |
| 7 | E4 | ColE4-F | GAAGGCTGCATTTGATGCT | 409 |
| | | ColE4-R | CGGATCCGGACCTTTAATTT | |
| 8 | E5 | ColE3-F | TAAGCAGGCTGCATTTGATG | 430 |
| | | ColE5-R | TTGAATTCTCGAATCGTCCA | |
| 9 | E6 | ColE6-F | ACCGAACGTCCAGGTGTT | 399 |
| | | ColE6-R | TTTAGCCTGTGCTCCTGAT | |
| 10 | E7 | ColE7-F | GCATTCTGCCATCTGAAAT | 431 |
| | | ColE7-R | CTTCTGCCCACTTTCCTTCG | |
| 11 | E8 | ColE3-F | TAAGCAGGCTGCATTTGATG | 449 |
| | | ColE8-R | GACTGATTGGCTTGTCGTGA | |
| 12 | E9 | ColE3-F | TAAGCAGGCTGCATTTGATG | 418 |
| | | ColE9-R | GACTTTTCTCCCTCCGACCT | |
| 13 | Ia | ColIa-F | GCATGCAAATGACGCTCTTA | 473 |
| | | ColIa-R | GAGGACGCCAGTTCTCTGTC | |
| 14 | Ib | ColIb-F | AACGAGTGGGTGATGATTC | 464 |
| | | ColIb-R | CCTTTTCTGCGCTCGTATTC | |
| 15 | K | ColK-F | CAGAGGTCGCTGAACATGAA | 469 |
| | | ColK-R | TCCGCTAAATCCTGAGCAAT | |
| 16 | L | Col28b-F | TGCATATTGAAAGCGTCAGC | 449 |
| | | Col28b-R | CAGGTTATCCCCTCTCACCA | |
| 17 | M | ColM-F | GCTACCACTTCGCAAACC | 429 |
| | | ColM-R | GAGCGACTCTCCGATAATGC | |
| 18 | N | ColN-F | AGCTTGCGAGTATCTTGGA | 401 |
| | | ColN-R | CAACACAGCCCCGAATAAAC | |
| 19 | U | ColU-F | TGATTGCTGCGAGAAAATG | 485 |
| | | ColU-R | TCTGACAGCCTCTCCCTGTT | |
| 20 | Y | ColY-F | GCAGGCAGAAAAGAACAAGG | 477 |
| | | ColY-R | CGGACGTTATTTGCCTTCAT | |
| 21 | Js | ColJs-F | TCAAAAATGTTTGGGCTCCTC | 254 |
| | | ColJs-R | TAATCTGCCCTGTCCCCTG | |

Pokračování Tab. 6.

| Označení | Typ kolicinu | Název primeru | Sekvence primeru 5'-3' | Velikost produktu (bp) |
|----------|--------------|---------------|------------------------|------------------------|
| 22 | 5 | Col5-F | CATTGGCAAAAGCGAAATTC | 443 |
| | | Col5-R | TGCAACTCTGGAAACAATCG | |
| 23 | 10 | Col10-F | GGTTACCGGATTTTCCTGGAT | 448 |
| | | Col10-R | TTCTGAATGCTTGGCCCACT | |
| 24 | S4 | ColS4-F | TATATGGCCCAACTGCTGGT | 456 |
| | | ColS4-R | CGTAAGGACGGACACCTGTT | |

Dále také Gordon a O'Brien (2006) ve své práci použili specifické primery pro PCR detekci vybraných druhů mikrocinů (Tab. 7.). V této práci byla stejná sekvence primerů použita u mikrocinů mccB17, mccH47, mccJ25, mccL a mccM, ostatní primery byly získány z Biologického ústavu Lékařské fakulty MU v Brně Velikost vzniklých PCR produktů je uvedena v Tab. 7. [20]Chyba! Nenalezen zdroj odkazů..

Tab. 7. Použité mikrocinové primery.

| Pořadí | Typ mikrocinu | Název primeru | Sekvence primeru 5'-3' | Velikost produktu (bp) |
|--------|---------------|---------------|-------------------------------------|------------------------|
| 25 | B17 | Mcc B17-F | TCACGCCAGTCTCCATTAGGTGTTGG CATT | 135 |
| | | Mcc B17-R | TTCCGCCGCTGCCACCGTTTCCACCA CTAC | |
| 26 | C7 | Mcc C7-F | CGTTCAACTGTTGCAATGCT | 134 |
| | | Mcc C7-R | AGTTGAGGGGCGTGTAATTG | |
| 27 | J25 | Mcc J25-F | TCAGCCATAGAAAGATATAGGTGTA CCAAT | 175 |
| | | Mcc J25-R | TGATTAAGCATTTCATTTTAATAAA GTGT | |
| 28 | H47 | Mcc H47-F | CACTTTCATCCCTTCGGATTG | 227 |
| | | Mcc H47-R | AGCTGAAGTCGCTGGCGCACCTCC | |
| 29 | V | Mcc V-F | CACACACAAAACGGGAGCTGTT | 680 |
| | | Mcc V-R | CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT | |
| 30 | L | Mcc L-F | GGTAAATGATATATGAGAGAAATAA CGTTA | 233 |
| | | Mcc L-R | TTTCGCTGAGTTGGAATTTTCCTGCTG CATC | |
| 31 | M | Mcc M-F | CGTTTATTATTTTATGAATA | 456 |
| | | Mcc M-R | AAACGGAAGAATGGATGATCTCGCA AA | |
| 32 | E492 | Mcc E492-F | GTCTCTCCTGCACCAAAAAGC | 291 |
| | | Mcc E492-R | TTTTCAGTCATGGCGTTCTG | |

5.2.4 Detekce PCR produktů

DNA fragmenty vzniklé PCR reakcí byly detekovány pomocí elektroforézy v 1,5% agarózovém gelu. Pro přípravu gelu bylo naváženo 0,75 g agarózy a zalito 50 ml 1x TAE pufru, který byl naředěný ze zásobního 50x koncentrovaného roztoku TAE. Vzniklá směs byla za občasného míchání rozpouštěna v mikrovlnné troubě. Takto připravený roztok agarózy byl samovolně zchlazen. Poté byly k roztoku přidány 3 μl etidumbromidu (výsledná koncentrace etidumbromidu v gelu byla 0,5 μg/ml) a roztok byl nalit do připravené elektroforetické vaničky s hřebínkem.

Po ztuhnutí gelu byly nanášeny vzorky DNA v objemu 12 μl roztoku, tvořeného 2 μl nanášecího pufru a 10 μl PCR produktu. Jako standard byl použit 100 bp marker, který byl nanášen v objemu 12 μl.

Elektroforetická separace proběhla za stálého napětí 75-90 V, cca 50 minut. Časový úsek, během kterého migrovala DNA, byl závislý na velikosti separovaných fragmentů. Separace probíhala tak dlouho, dokud bromfenolová modř obsažená v nanášecím pufru nedoputovala do 2/3 až 3/4 gelu. Po ukončení elektroforézy byla DNA posouzena v UV světle pomocí UV transluminátoru. Výsledek byl zdokumentován pomocí digitálního fotoaparátu.

5.2.5 Stanovení biologické aktivity kolicinů kvalitativně – vpichový pokus

Testované kmeny *Escherichia coli* byly vpichem naočkovány do misky s MPA agarem a kultivovány 48 hod při 37 °C. Misky s makrokoloniemi byly nejdříve usmrceny parami chloroformu po dobu 30 min a poté přelity 3 ml 1,05% agaru s 0,1 ml kultury indikátorového kmene narosteného přes noc. Jako indikátorové kmeny bylo použito 5 kmenů *E. coli* (Row, B1, Φ, P400, Sabina 40) a jeden kmen *Shigella sonnei* 17. Po kultivaci v 37 °C přes noc byla zjišťována přítomnost inhibičních zón okolo nárůstu produkčních kmenů a hodnocena velikost zón.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Přítomnost *E. coli*, patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*, je ukazatelem fekálního znečištění nejen potravin [1]. Tradiční metody identifikace patogenů z potravin jsou časově náročné a pracné, tudíž je nutný rozvoj inovačních metod pro rychlou identifikaci potravinových patogenů [68]. V přímé diagnostice mikrobiologických patogenů je jednou z nejčastěji používaných metod PCR. Je považována za standardní metodu detekce některých nekultivovatelných nebo obtížně kultivovatelných patogenů [47].

E. coli je producentem dvou typů bakteriocinů, a to kolicinů a mikrocinů. Bakteriociny jsou bohatou a rozmanitou skupinou antimikrobiálních látek bakteriálního původu, kterými bakterie mezi sebou soupeří [69]. Tyto bakteriociny lze detekovat vpichovým pokusem za pomoci indikátorových kmenů nebo rychlejší cestou, a to metodou PCR. Před provedením vlastní PCR reakce je důležité správně provést izolaci DNA. V této práci byla izolace provedena povařením bakteriálních buněk v PCR pufru 1x ředěného, což je metoda málo časově a finančně náročná.

6.1 Detekce bakterie *Escherichia coli*

Detekce *E. coli* v potravinách a ve vodě molekulárně-biologickými metodami je zaměřena na geny *lacZ*, *lamB*, *uid* [70] a *malB* [71]. V této práci byla bakterie *E. coli* detekována metodou PCR. Bylo využito páru primerů LZL 389 a LZR 653 [70], jimiž je určena oblast genu *lacZ* (264 bp), který kóduje aktivitu β -galaktosidázy.

Gen pro β -galaktosidázu (*lacZ*), je umístěn na chromozomu ve shluku společně se třemi dalšími geny; *lacI* kóduje regulační bílkovinu, represor; *lacY* kóduje permeázu potřebnou pro aktivní transport laktózy do buňky; *lacA* kóduje transacetylační enzym, jenž snižuje toxicitu některých galaktozidů jejich acetylací. Všechny tyto geny jsou součástí obecného regulačního systému a tato regulační jednotka se nazývá laktózový (*lac*) operon [72].

Inkluzivita je vytvoření specifického produktu u detekovaného druhu (zde *E. coli*) a exkluzivita je nevytvoření specifického PCR produktu u kmenů jiných než detekovaný druh. Při PCR detekci *E. coli* byly testovány dvě různé annealingové teploty.

Teplota annealingu 56,6 °C

- Testování inkluzivity

PCR reakce se všemi kmeny *E. coli* byla provedena minimálně ve čtyřech nezávislých opakováních. Byl získán specifický PCR produkt (264 bp) u všech 21 kmenů

minimálně ve dvou opakováních. PCR neproběhla pouze u 4 kmenů (*E. coli* 104, 66, 59 a B´) ve dvou opakování.

- Testování exkluzivity

Pro ověření exkluzivity bylo použito 31 kmenů jiných než *E. coli*. PCR byla provedena minimálně ve třech nezávislých opakováních. Specifické PCR produkty nebyly vytvořené minimálně ve dvou opakováních u 26 kmenů. U 5 kmenů byl získán specifický produkt (*Proteus vulgaris*, *Enteric Group* 69, *Leclercia adecarboxylata*, *Klebsiella oxytoca*, *Acinetobacter* sp.) ve dvou opakování.

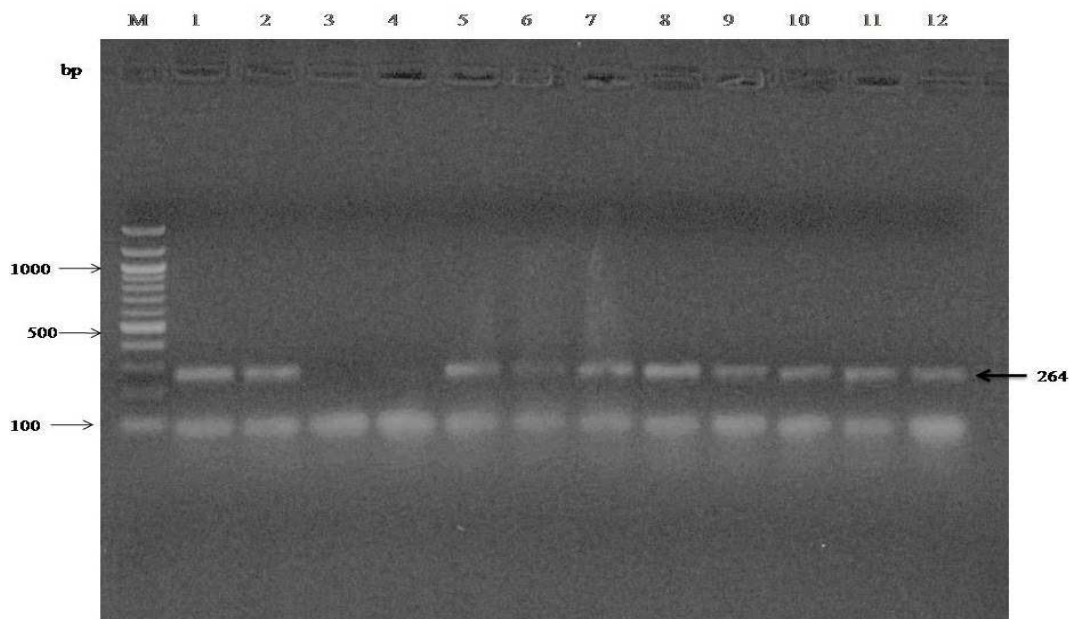
Teplota annealingu 56,9 °C

- Testování inkluzivity

Na PCR reakce byly použity stejné kmeny jako při testování annealingové teploty 56,6 °C. Opakování bylo provedeno minimálně dvakrát (Obr. 5). Ze všech testovaných kmenů se nevytvořily specifické produkty u 3 kmenů ani jednou (D´, *E. coli* 92 a *E. coli* 66).

- Testování exkluzivity

Při ověřování exkluzivity byly použity stejné kmeny jako při testování annealingové teploty 56,6 °C. Opakování bylo provedeno minimálně dvakrát (Obr. 5) a ze všech testovaných kmenů pouze u 3 kmenů byl vytvořen specifický PCR produkt (*Enteric Group* 69, *Klebsiella oxytoca* a *Proteus vulgaris*).



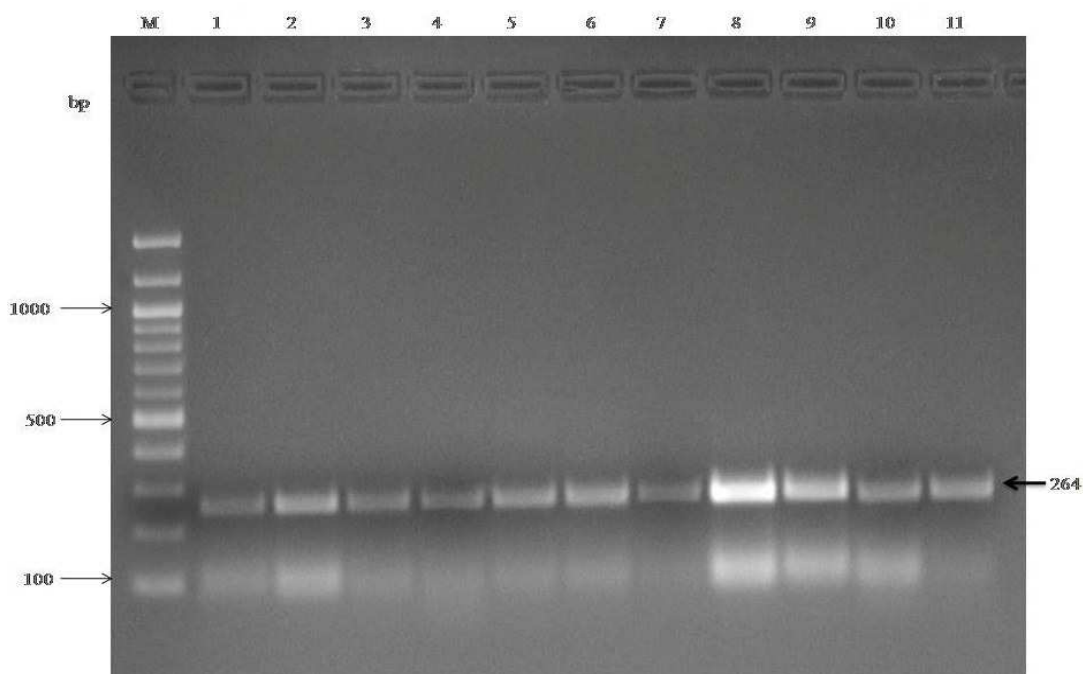
Obr. 5. Agarózový gel PCR produktů při detekci *E. coli* a jiných kmenů při teplotě 56,9 °C: 1-*E. coli* CCM3954, 2-*E. coli* 17, 3-*Escherichia hermanii* 941, 4-*Escherichia fergusonii* 873, 5-*E. coli* B', 6-*E. coli* Row, 7-*E. coli* 99, 8-*E. coli* 104, 9-*E. coli* 59, 10-*E. coli* 62, 11-*E. coli* 64, 12-*E. coli* 94.

Z vyhodnocených výsledků bylo zjištěno, že nejvhodnější annealingová teplota pro tyto primery je 56,9 °C. Vzorke určené jako *Enteric Group* 69, *Klebsiella oxytoca* a *Proteus vulgaris* vykazovaly pozitivní reakci, která by měla být pozitivní a specifická pouze pro *E. coli*. Dá se tedy spekulovat o tom, že tyto kmeny nebyly správně identifikovány do daných taxonů, bylo by tedy vhodné opakovat identifikaci např. pomocí biochemických testů či sekvenovat část DNA, např. gen pro 16S rRNA. Pokud tomu tak není a zvolené primery detekují nejen *E. coli*, ale také jiné rody z čeledi *Enterobacteriaceae*, je nutné stanovit, že tyto primery nejsou pro *E. coli* specifické a tudíž nesplňují podmínky 100% exkluzivity. Tato práce vyvrací původní studii [70], na druhou stranu práce Ficker a kol.(1994) toto tvrzení dokládá [75]. V této práci [75] byly pro detekci *E. coli* použity stejné primery LZL-389 a LZR-653. Bylo testováno 441 kmenů, z nichž 324 kmenů bylo určeno jako kolidformní bakterie a 117 kmenů jako *E. coli*. Sekvence byla také identifikována v 5 kmenech kolidformních bakterií (non-*E. coli*). Sada primerů *E. coli* správně identifikovala přibližně 70 % testovaných kolidformů [75].

Pro detekci koliformních bakterií je využívána oblast *lacZ* genu. Při vybraném optimalizačním cyklu a za použití primerů ZL-1675 a ZR-2548 byly výsledky pozitivní také při detekci *Enterobacter cloacae*, *Shigella flexneri* a *Klebsiella pneumoniae*. Při detekci bakterie *Salmonella* byl získán negativní výsledek [73]. V další studii byly pro detekci koliformních bakterií využity primery LZL a LZR (876 bp). Pozitivně byly detekovány všechny koliformní kmeny, a to *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Citobacter freundii*, *Enterobacter* sp., a *Shigella* sp. [74]. Ve studii Kaclíkové a kol. (2005) byly detekovány *E. coli* s využitím primerů Ert2F a Ert2R (619 bp). Specificita primerů byla prověřována inkluzivitou, kde bylo použito 24 kmenů *E. coli* a exkluzivitou s 37 kmeny jinými než *E. coli*. Výsledky byly pozitivní na 100 % jak u inkluzivity tak exkluzivity [76].

Z výsledků naší práce a jiných studií lze říci, že použité primery LZL-389 a LZR-653 jsou vhodné pro detekci koliformních bakterií, ale již nejsou vhodné pouze pro detekci *E. coli*.

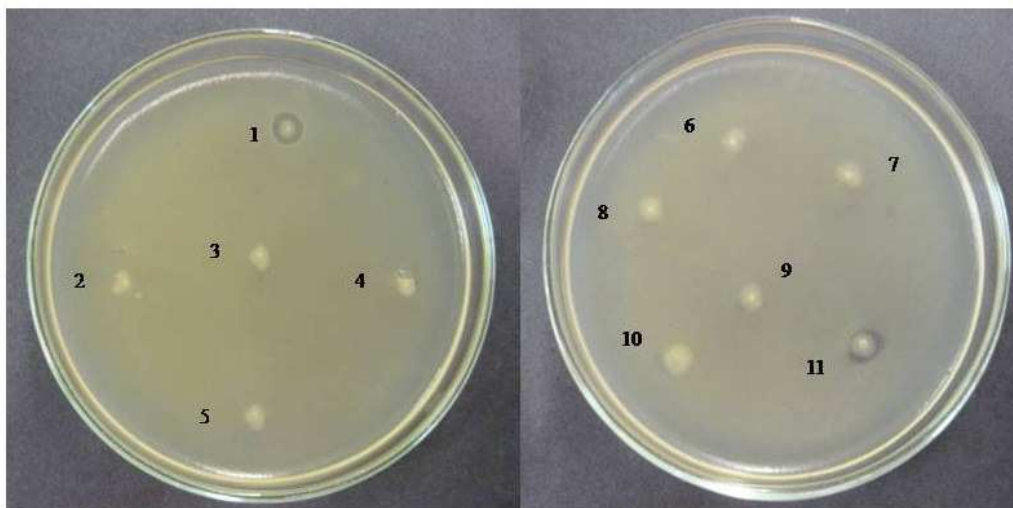
Primery LZL-389 a LZR-653 byly v další části experimentů použity pro ověření příslušnosti izolátů z různých potravin a vody určených jako *E. coli* podle typické morfologie kolonií s kovovým leskem na Endově agaru. U všech 11 kmenů byla PCR reakce pozitivní a výsledek je znázorněn na Obr. 6.



Obr. 6. Agarózový gel PCR produktů při detekci laboratorních vzorků z potravin a vody: seznam vzorků uveden v Tab. 2.

6.2 Kolicinogenie kmenů *Escherichia coli*

Dalším úkolem bylo zjistit incidenci kolicinogenie u daného souboru 11 izolátů *E. coli*. Vpichovým pokusem byly sledovány inhibiční účinky na indikátorové kmeny (Obr. 7). Tímto pokusem bylo zjištěno, že dva vzorky (izolované z kuřecí kůže a krutího biskupu) jsou kolicinogenní a vytváří inhibiční zóny na všech šesti indikátorových kmenech. Tyto dva vzorky budou dále použity v Experimentu 2.



Obr. 7. Test na produkci bakteriocinů na indikátorovém kmeni *S. sonnei* 17: seznam vzorků uveden v Tab. 2.

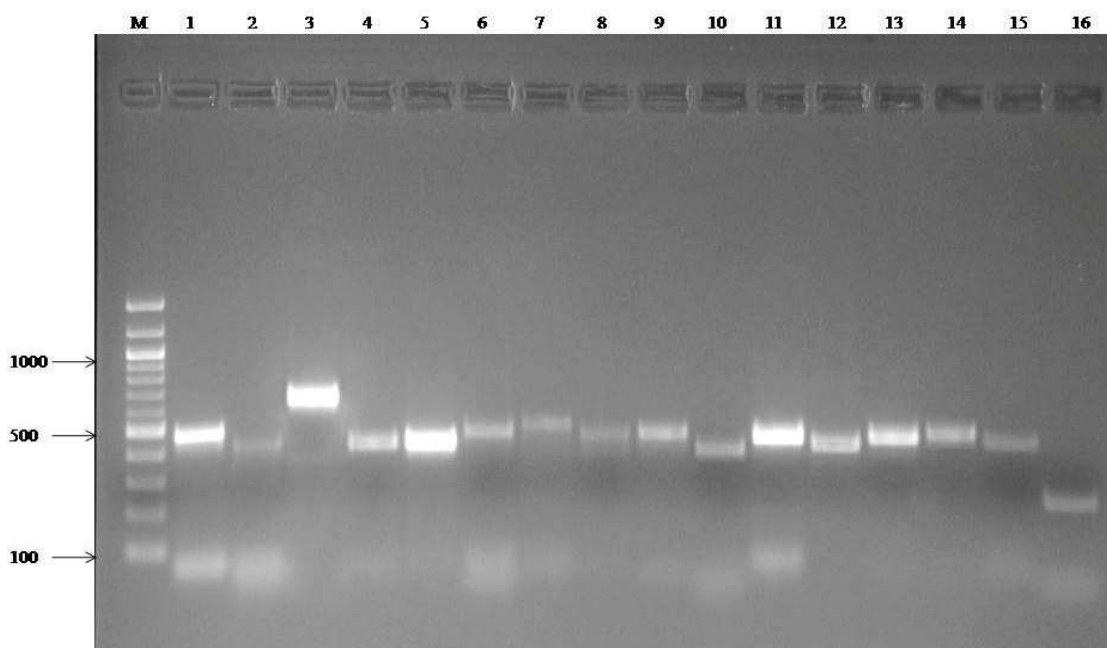
V mnoha studiích bylo tímto pokusem zjišťováno, zda jsou kmeny kolicinogenní, např. z 53 kmenů *E. coli* vytvářelo 43,4 % bakteriocinů s nízkomolekulární hmotností LMW (low-molecular-weight) a 5,7 % bakteriocinů s vysokomolekulární hmotností HMW (high-molecular-weight) [77]. Šmarda a kol. (2006) ve své práci izoloval 53 kmenů *E. coli* odebraných z tračníku zdravých lidí [78]. U těchto kmenů bylo zjištěno, že 22 z nich vytváří mikrocin, 6 koliciny a 2 produkovaly jiné specifické antibakteriální faktory [78]. V průběhu let 1993-1999 bylo izolováno 1043 kmenů *E. coli* z tračníků zdravých lidí bez zažívacích potíží a lidí s diagnostickou poruchou trávení bez přítomnosti patogenních nebo podmíněně patogenních mikrobů. Pro kontrolní sadu bylo vybráno 278 kmenů, z nichž bylo 115 kolicinogenních. U pacientů trpících salmonelózou byl poměr kolicinogenních kmenů stejný, jako u zdravých lidí a u pacientů s nespecifickým zánětem tračníku byl výskyt kolicinů mírně zvýšený [79].

Šmarda a kol. (2002) v další práci izoloval různé druhy *Escherichia*: *E. hermannii*, *E. vulnerris* a *E. fergusonii*. Bylo izolováno 30 kmenů *E. hermannii* z lidských orgánů, ani v jednom

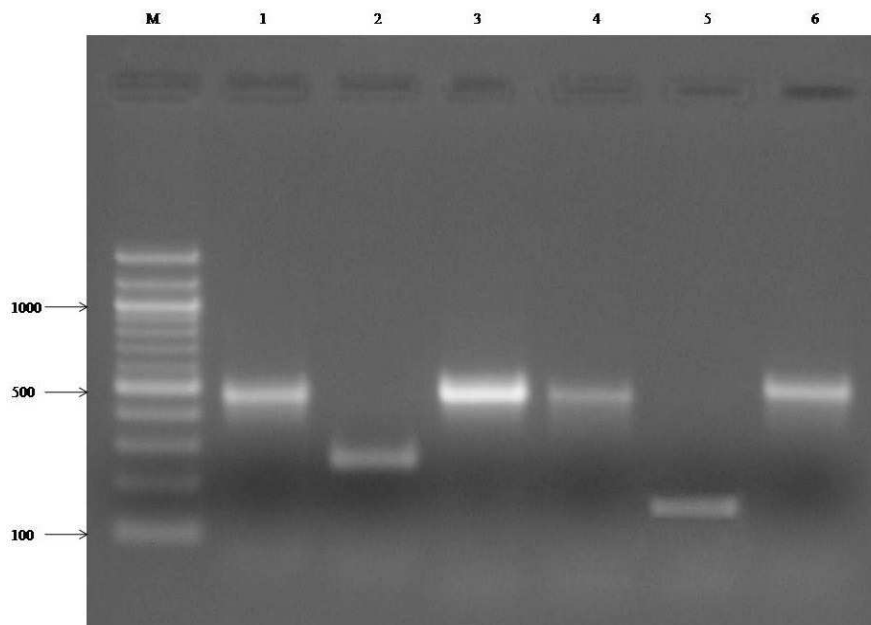
nebyl detekován žádný bakteriocin. Dále 30 kmenů *E. vulneris* a to 26 z člověka a 4 z čističky vod, u žádného nebyl detekován bakteriocin. Poslední *E. fergusonii* byl izolován z 50 kmenů, z nichž bylo 48 z člověka, 1 z vepře a 1 z čističky odpadních vod. Z kmene *E. fergusonii* bylo 6 bakteriocinogenních [80].

6.3 Detekce bakteriocinů metodou PCR

Bakteriociny byly detekovány metodou PCR. Použitý amplifikační profil a složení směsi jsou uvedeny v metodice pod kapitolou amplifikace PCR bakteriocinů. U bakteriocinů, kde byla k dispozici pozitivní kontrola pro ověření funkce navržených specifických primerů, byla tato kontrola použita. Pozitivní kontrolou se rozumí DNA izolovaná z typového bakteriálního producenta daného bakteriocinu. Prostřednictvím specifických primerů bylo v našich podmínkách možno detekovat geny pro 20 z 24 typů kolicinů a dva z osmi mikrocinů (Obr. 8 a 9).



Obr. 8. Agarózový gel PCR produktů kolicinů a mikrocinů: zleva Col A (475 bp), D (420 bp), E1 (649 bp), E2 (409 bp), E3 (413 bp), S4 (490 bp), U (485 bp), Col 5 (443 bp), Col 10 (448 bp), E4 (409 bp), E5 (430 bp), E6 (399 bp), E7 (431 bp), E9 (418 bp), M (429 bp), mcc H47 (227 bp).



Obr. 9. Agarózový gel PCR produktů kolicinů a mikrocinů
2.část: zleva Col Y (477 bp), Js (254 bp), Ia (473 bp), Ib (464 bp), mcc B17 (135 bp), B (492 bp).

6.4 Multiplex PCR

Metodou multiplex PCR dochází ke zkrácení času pro přípravu PCR mixu a jsou také ušetřeny náklady na reakční komponenty. Aplikací metody mohou být odhaleny negativní výsledky [81]. Pro použití metody multiplex PCR je důležité, aby annealingové teploty všech použitých primerů byly podobné a aby velikosti jednotlivých PCR produktů byly odlišné. V našem případě byly obě podmínky splněny, a proto byla provedena optimalizace této metody pro detekci bakteriocinů *E. coli*.

Na základě získaných výsledků (Kapitola 6.2) byly navrženy dvojice bakteriocinů, které mohou být detekovány paralelně. Páry byly přiřazovány k sobě na základě velikosti PCR produktů. Optimalizace annealingové teploty nemusela být prováděna, jelikož je pro všechny koliciny a mikrocinů stejná a to 55 °C. Při optimalizaci bylo vyzkoušeno několik možností, změna množství DNA templátu, DNA *Taq*-polymerázy, dNTP a přídavek $MgCl_2$ (Tab. 8). V různých pracích se množství těchto komponent liší. V rámci svých prací autoři uvádějí různé koncentrace použitých komponent, např. DNA templát 2 μ l nebo 10 ng, *Taq*-polymeráza 1 U nebo 1,5 U, dNTP 0,2 mmol/l nebo 0,4 mmol/l, $MgCl_2$ bylo zkoušeno ve více koncentracích 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 a 4 mmol/l [82] [83].

Tab. 8. Protokol optimalizace.

| Komponenty | Objem [μl] | Koncentrace | Výsledky |
|-------------------|---------------|-------------|----------|
| DNA templát | 1 | / | - |
| DNA | 0,2 | 1U | - |
| Taq-polymeráza | 0,3 | 1,5U | - |
| dNTP | 1 | 0,4 mmol/l | - |
| MgCl ₂ | 1 | 2,4 mmol/l | + |
| | 1,5 | 2,6 mmol/l | +S |
| | 2 | 2,8 mmol/l | - |
| | 2,5 | 3 mmol/l | - |

+ pozitivní specifický produkt PCR
 +S slabě pozitivní specifický produkt
 - negativní specifický produkt

Z výsledků je patrné, že pro optimalizaci multiplex PCR byl nejvhodnější přírůstek MgCl₂, při přírůstku 1 μl (koncentrace 2,4 mmol/l). Při kombinaci duplex PCR u všech vybraných párů bakteriocinů byly pozitivní specifické produkty. Při kombinaci triplex PCR však nejdelší ze specifických produktů nebyl detekován vůbec nebo jen velmi slabě. V některých případech u multiplex PCR docházelo k tvorbě nespecifických bandů o velikosti pod 100 bp. Optimalizace multiplex PCR pro více jak dva bakteriociny nebyla dokončena z důvodů časové náročnosti. Bylo by vhodné v této práci pokračovat, protože tato metoda usnadňuje detekci kolicinů a mikrocinů z hlediska časového a ekonomického.

6.4.1 Vytvoření PCR systému detekce bakteriocinů

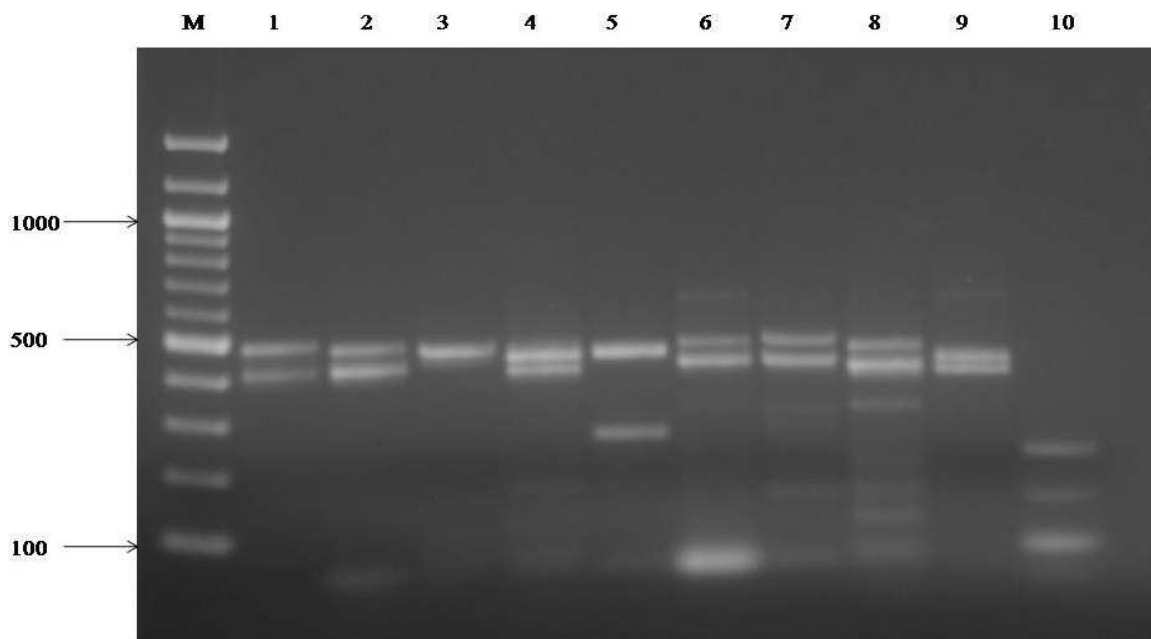
Bakteriociny byly nejdříve detekovány samostatně a poté k sobě přiřazovány různé dvojice a trojice bakteriocinů podle velikosti specifických produktů. Amplifikační profil PCR systému pro detekci bakteriocinů byl pro všechny bakteriociny stejný (35 cyklů, denaturace 95 °C/1 min., annealing 55 °C/ 1 min., extenze 72 °C/ 1 min.). Jedna reakce byla prováděna v celkovém objemu 25 μl. Jednotlivé komponenty pro jednotlivou, duplex a triplex reakci jsou uvedeny v Tab. 9.

Tab. 9. Složení PCR směsi pro jednu reakci.

| Složka PCR | Monoplex | Duplex | Triplex |
|--------------------|----------|-----------|----------------|
| PCRpufr | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| dNTP mix | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Taq DNA polymeráza | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| primer F | 0,25 | 0,25/0,25 | 0,25/0,25/0,25 |
| primer R | 0,25 | 0,25/0,25 | 0,25/0,25/0,25 |
| templátová DNA | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| MgCl ₂ | - | 1 | 1 |
| H ₂ O | 21 | 20 | 19 |

Z výsledků bylo vyhodnoceno, že pro zjištění produkovaného typu kolicinů či mikrocinů u produkčního kmene je zapotřebí provést 22 reakcí. Z toho metodou duplex PCR bylo provedeno 10 reakcí, čímž jsme detekovali 20 různých bakteriocinů. Tyto bakteriociny byly přiřazeny do těchto párů podle velikosti specifického PCR produktu (Obr. 10):

- | | |
|------------------------------------|-------------------------------------|
| 1) ColE9 (418 bp) + ColU (485 bp) | 6) ColA (475 bp) + ColD (420 bp) |
| 2) ColIa (473 bp) + ColE2 (409 bp) | 7) ColE5 (430 bp) + ColB(492 bp) |
| 3) ColM (429 bp) + ColY (477 bp) | 8) ColIb (464 bp) + ColE3(413 bp) |
| 4) ColE4 (409 bp) + Col5 (443 bp) | 9) ColE6 (399 bp) + ColE7(431 bp) |
| 5) ColJs (254 bp) + Col10 (448 bp) | 10) mccH47(227 bp) + mccB17(135 bp) |



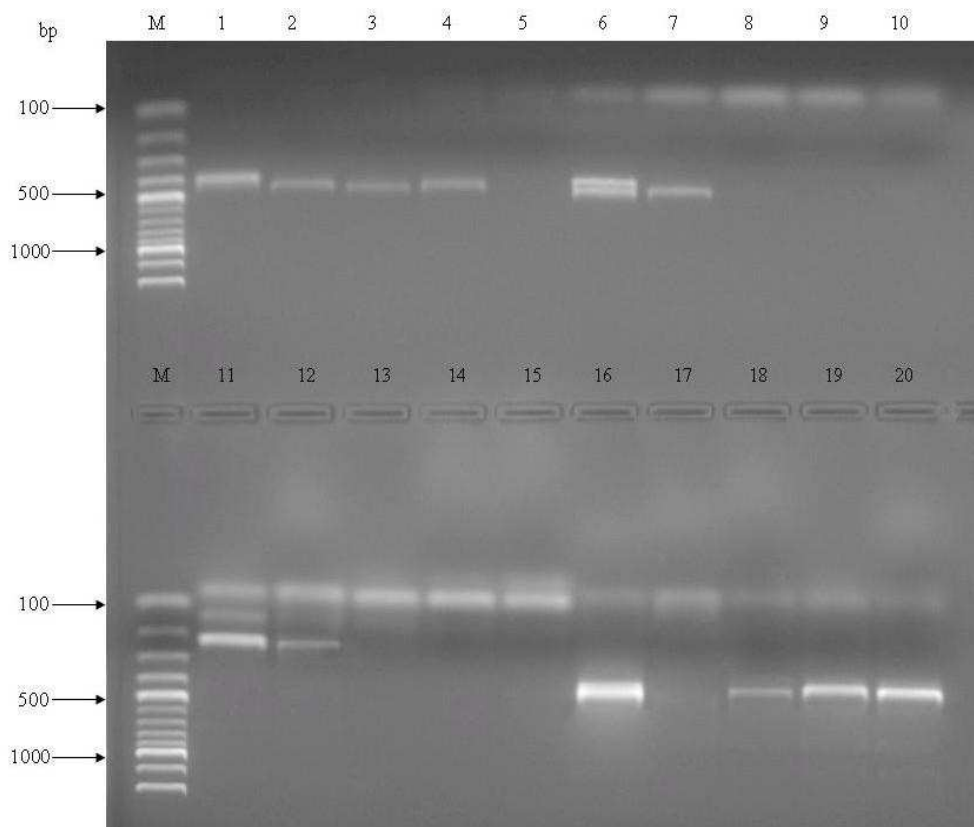
Obr. 10. Agarózový gel PCR produktů metodou duplex: číslování párů bakteriocinů viz.: text (Kapitola 6.3).

U zbylých 12 reakcí bylo možno detekovat pouze jeden bakteriocin (ColE1, ColE8, ColS4, ColK, ColL, ColN, mccC7, mccJ25, mccV, mccL, mccE492, mccM). Tyto bakteriociny byly detekovány zvlášť z těchto důvodů:

- nebyla k dispozici pozitivní kontrola (mccL, mccM, mccE492);
- kontrola byla k dispozici, ale nebyly detekovány specifické PCR produkty (ColE8, ColK, ColL, ColN, mccC7, mccV, mccJ25);
- kontrola byla k dispozici, specifické PCR produkty byly detekovány, ale při duplex PCR tyto specifické produkty nebyly vytvořeny (ColE1, ColS4).

6.4.2 Využití PCR systému detekce bakteriocinů u kolicinogenních izolátů

Metoda PCR systému detekce byla použita pro detekci kolicinů a mikrocinů na čtyřech kolicinogenních kmenech izolovaných z povrchu chlazené drůbeže. Na Obr. 11 je znázorněna detekce osmi různých kolicinů a mikrocinů pomocí duplex PCR.



Obr. 11. Agarózový gel PCR produktů kolicinogenních kmenů: pozitivní kontrola-1:ColE3 (413 bp), Ib (464 bp); 6:ColB (492 bp), E5 (430 bp); 11:mccB17 (135 bp), mccH47 (227 bp); 16:ColE6 (399 bp), E7 (431 bp). Vzorky: kuře Raciola-2,7,12,17; krůtí biskup-3,8,13,18; EY1-4,9,14,19; EU1-5,10,15,20.

K rozlišení produkujícího typu kolicinu či mikrocinu byly kmeny podrobeny PCR-typizaci na všech 24 kolicinů a 8 mikrocinů, tzn. že byly navíc zahrnuty i ty koliciny a mikrocinu, k nimž nebyla detekována pozitivní kontrola. U dvou vzorků (kuře Raciola a krůtí biskup) byla kolicinogenie zjištěna v této práci. Dále byly použity dva kolicinogenní kmeny (EY1 a EU1) ze sbírky Ústavu technologie a mikrobiologie potravin Fakulty technologické UTB ve Zlíně.

Bylo zjištěno, že studované izoláty produkují 8 typů kolicinů a 1 typ mikrocinu. Všechny produkují více než 2 koliciny, avšak pouze jeden kmen produkuje mikrocin. Určené typy kolicinů a mikrocinů jsou uvedeny v Tab. 10. Autoři Gordon a O'Brien (2006) ve své studii testovali 266 humánních izolátů *E. coli*, z nichž 102 kmenů bylo produkčních (38 %). Z těchto kmenů 42 % produkovalo aspoň 1 kolicin, 41 % dva koliciny, 16 % tři koliciny a jeden kmen produkoval 4 koliciny [20]. V jiné práci bylo testováno 50 kmenů, z nichž

bylo 48 izolováno z humánního materiálu, 1 z prasete a 1 z čističky vod. Z toho 3 produkovaly kolicin E1, dva kolicin Ib a jeden produkoval kolicin Ia [80].

Tab. 10. Výsledky PCR typizace kolicinogenních kmenů.

| Koliciny a mikrocin | Kolicinogenní kmeny | | | | Koliciny a mikrocin | Kolicinogenní kmeny | | | |
|---------------------|---------------------|--------------|-----|-----|---------------------|---------------------|--------------|-----|-----|
| | Kuře Raciola | Krůtí biskup | EY1 | EU1 | | Kuře Raciola | Krůtí biskup | EY1 | EU1 |
| A | + | - | - | - | M | + | - | - | - |
| B | + | - | - | - | N | - | - | - | - |
| D | - | - | - | - | U | - | - | - | - |
| E1 | - | - | - | - | Y | - | - | - | - |
| E2 | - | - | - | - | Js | - | - | + | + |
| E3 | - | - | - | - | 5 | - | - | - | - |
| E4 | - | - | - | - | 10 | - | - | - | - |
| E5 | - | - | - | - | S4 | - | - | - | - |
| E6 | - | - | - | - | mccV | - | - | - | - |
| E7 | - | + | + | + | mccH47 | + | - | - | - |
| E8 | - | - | - | - | mccL | - | - | - | - |
| E9 | - | - | - | - | mccJ25 | - | - | - | - |
| Ia | + | + | - | - | mccM | - | - | - | - |
| Ib | + | + | + | - | mccB17 | - | - | - | - |
| K | - | - | - | - | mccC7 | - | - | - | - |
| L | - | - | - | - | mccE492 | - | - | - | - |

+ přítomnost specifických produktů

- nepřítomnost PCR produktů

Nejčastěji byly zastoupeny koliciny E7, Ia a Ib. Dále se vyskytovaly koliciny A, B, M a Js, z mikrocinů H47. Z testované sady se zbytek kolicinů a mikrocinů nevyskytoval vůbec.

U sledovaných kmenů platí, že všechny kmeny produkující kolicin B produkují i kolicin M. Současný výskyt kolicinu B a M byl již dříve v literatuře popsán u humánních izolátů. Dále bylo zaznamenáno, že při výskytu kolicinu Ia se vyskytuje také kolicin Ib. Rozlišení, o který typ kolicinu se jedná, by bylo nutno provést sekvenováním PCR produktu, jelikož geny pro tyto dva koliciny vykazují vysokou sekvenční homologii [84]. S porovnáním jiných studií [80], kde byly studovány humánní izoláty *E. coli* by se dalo naznačit, že vícenásobná produkce kolicinů a mikrocinů je u drůbežích izolátů rozšířeným jevem.

ZÁVĚR

Escherichia coli produkuje dva typy bakteriocinů nazývané koliciny a mikrocin. Bakteriociny jako antibakteriální látky jsou známy již několik desetiletí a jsou zkoumány pro mnoho různých způsobů využití. Sleduje se jejich uplatnění v potravinářství jako náhrady chemických konzervantů, při ochraně potravin vůči patogenům, jako nové generace antibiotik ve farmakologii, v medicíně jako probiotik a konečně i jako protinádorových látek.

Cílem práce bylo ověřit identifikaci *Escherichia coli* u souboru kmenů izolovaných z potravin. Bylo využito páru primerů LZL-389 a LZR-653. Těmito primery je určena oblast genu *lacZ* (264 bp), který kóduje enzym β -galaktosidázu. Pro ověření specifity těchto primerů bylo použito 21 kmenů *E. coli* a 31 kmenů jiných než *E. coli*. Z vyhodnocených výsledků bylo zjištěno, že nejvhodnější annealingová teplota pro tyto primery je 56,9 °C. Ze všech testovaných kmenů *E. coli* se nevytvořily specifické produkty u tří kmenů ani jednou. Vzorky určené jako *Enteric Group 69*, *Klebsiella oxytoca* a *Proteus vulgaris* vytvořily specifické produkty, které by měly být specifické pouze pro *E. coli*. Při ověření specifity použitých primerů bylo prokázáno, že nejsou zcela vyhovující pro detekci *E. coli*, jelikož nesplňují podmínky 100 % inkuzivity a exkluzivity. Tyto výsledky byly prezentovány na konferenci XIV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů pořádané Masarykovou univerzitou ve dnech 20. - 21. dubna 2010 v Brně (Příloha I, II).

Dalším cílem bylo detekovat metodou PCR všechny popsané koliciny a mikrocin u kolicinogenních kmenů *E. coli*. Nejdříve byly testovány sady primerů na kmenech, produkujících jednotlivé typy kolicinů a mikrocinů. Na základě velikosti specifických PCR produktů byly k sobě přiřazeny různé páry bakteriocinů a detekovány metodou multiplex PCR. Tato metoda byla optimalizována a její výsledky jsou uvedeny v protokolu optimalizace. Paralelně bylo možno detekovat pouze dva bakteriociny, nicméně pro více bakteriocinů již úspěšná nebyla. Optimalizace multiplex PCR pro současnou detekci tří a více typů kolicinů by bylo vhodné v další práci dokončit, jelikož tato metoda usnadňuje detekci kolicinů a mikrocinů z hlediska časového a ekonomického. Systém PCR je hojně využíván, v medicíně, archeologii, soudnictví a kriminalistice.

Optimalizovaná metoda byla použita pro detekci kolicinů a mikrocinů na čtyřech vzorcích kolicinogenních kmenů izolovaných z drůbežího masa. Bylo zjištěno, že studované izoláty produkují 8 typů kolicinů a 1 typ mikrocinu. Všechny produkují více než 2 koliciny, avšak

pouze jeden produkuje mikrocin. Nejčastěji byly zastoupeny koliciny E7, Ia a Ib. Dále se vyskytovaly koliciny A, B, M a Js, z mikrocinů byl detekován mikrocin micH47. Bylo zjištěno, že vícenásobná produkce kolicinů a mikrocinů je u drůbežích izolátů zřejmě rozšířeným jevem.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 1.vyd. Praha 1995, 361 s. ISBN 80-85605-71-6.
- [2] The free encyclopedia Wikipedia- *Escherichia coli* [on-line]. [cit. 06-10-2009]. Dostupný z WWW:
<http://en.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli>
- [3] PARTYKOVÁ, V. *Hladovění pro zdraví*. 1. vyd. Benešov 1999, 294 s. ISBN 80-86231-06-2.
- [4] KOMPRDA, T. *Obecná hygiena potravin*. 1.vyd. Brno: MZLU 2004. 148 s. ISBN 978-80-7157-757-7.
- [5] SABLE, S., PONS, A., GENDRON-GAILLARD, S., COTTENCEAU, G. Antibacterial Activity Evaluation of Microcin J25 against Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, vol. 10, s. 4595–4597.
- [6] BAQUERO, F., BOUANCHAUD, D., MARTINEZ-PEREZ, M. C., FERNANDEZ, C. Microcin plazmid: a group of extrachromosomal elements coding for molecular weight antibiotics in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1978, vol. 135, no. 2, s. 342-47.
- [7] DESTOUMIEUX-GARZÓN, D., PEDUZZI, J., REBUFFAT, S. Focus on modified microcins: structural features and mechanisms of action. *Biochimie*. 2002, vol. 84, s. 511-519.
- [8] DUQUESNE, S., PETIT, V., PEDUZZI, J., REBUFFAT, S. Structural and functional diversity of microcins, gene-encoded antibacterial peptides from *Enterobacteriaceae*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2007, vol. 13, s. 200-209.
- [9] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. 1.vyd. Brno: Masarykova univerzita 2007, 270 s. ISBN 80-210-4207-9.
- [10] *Escherichia coli* (*Escherichia coli* kmen Nissle 1917, sérotyp O6:K5:H1) jako probiotikum v klinické praxi. Ročník 2003/4 [online]. Dostupný z WWW:
< <http://www.remedia.cz> >
- [11] GROZDANOV, L.; RAASCH, C.; SCHULZE, J.; SONNENBORN, U.; GOTTSCHALK, G., HACKER, J.; DOBRINDT, U. Analysis of the genome structure of nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strains Nissle 1917. *Journal of Bacteriology*. 2004, vol. 186, s. 5432-5441.

- [12] CUKROWSKA, B., LODÍNOVÁ-RÁDNÍKOVÁ, R., ENDERS, C., a kol. Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with nonpathogenic probiotic *E. coli* strain Nissle 1917. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2002, vol. 55, no. 2, s. 204–9.
- [13] *Onemocnění potravinového původu* [online]. [cit. 16-08-2007]. Dostupný z WWW:
< <http://www.vegspol.cz/view.php?cisloclanku=2004080004> >
- [14] LEVIN, R. E. *Rapid detection and characterization of foodborne pathogens by molecular techniques*. CRC Press. 2009, 608 s. ISBN 978-1-4200-9242-4.
- [15] RILEY, M. A. a WERTZ, J. E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Review of Microbiology*. 2002, vol. 56, s. 117-137.
- [16] CORNOUT, G., FORTIN, C., SOULIERES, D. Antineoplastic Properties of Bacteriocins: revisiting potential active agents. *American Journal of Clinical Oncology*. 2008, vol. 31, s. 399-404.
- [17] RUSSELL, J. B., MANTOVANI, H. C. The bacteriocins of ruminal bacteria and their potential as an alternative to antibiotics. *Journal of Molecular. Microbiology and Biotechnology*. 2002, vol. 4, s. 347-355.
- [18] *Bacteriocin*. [on-line], [cit. 16-12-2009]. Dostupný z WWW:
<<http://en.wikipedia.org/wiki/Bakteriocin>>
- [19] RILEY, M. A., GORDON, D. M. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends Microbiology*. 1999, vol. 7, s. 129-133.
- [20] GORDON, D.; O'BRIEN, L. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. *Microbiology*. 2006, vol. 152, s. 3239-3244.
- [21] ŠMARDA, J., OBDRŽÁLEK, V. Incidence of colicinogenic strains among human *Escherichia coli*. *Journal of Basic Microbiology*. 2001, vol. 41, s. 367-374.
- [22] ŠMARDA, J., ŠMAJS, D. Colicins – Exocellular Lethal Proteins. *Folia Microbiologica*. 1998, vol. 43, s. 563-582.
- [23] CASCALES, E.; BUCHANAN, S.; DUCHE, a kol. Colicin Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2007, vol. 71, s. 158-229.
- [24] BRAUN, V., PATZER, S. I., HANTKE, K. Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie*. 2002, vol. 84, s. 365-80.

- [25] LAZDUNSKI, C. J., BOUVERET, E., a kol. Colicin import into *Escherichia coli* cells. *Journal of Bacteriology*. 1998, vol. 180, no. 19, s. 4993-5002.
- [26] PILSL, H.; ŠMAJS, D.; BRAUN, V. The tip of hydrophobic hairpin of colicin U is dispensable for colicin U activity but is important for interaction with the immunity protein. *Journal of Bacteriology*. 1998, vol. 180, s. 4111-4115.
- [27] ŠMAJS, D., DOLEŽALOVÁ, M., MACEK, P., ŽÍDEK, L. Inactivation of colicin Y by intramembrane helix-helix interaction with its immunity protein. *Febs Journal*. 2008, vol. 275, no. 21, s. 5325-5331.
- [28] ZAKHAROV, S. D., CRAMER, W. A. On the mechanism and pathway of colicin import across the *E. coli* outer membrane. *Frontiers in Bioscience*. 2004, vol. 9, s. 1311-1317.
- [29] PATTON, BRENDA S., DICKSON, JAMES S. Inhibitory activity of colicin E1 against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 2007, vol. 70, s. 1256-1262.
- [30] TIMMIS, K. Purification and characterization of Colicin D. *Journal of Bacteriology*. 1972, vol. 109, s. 12-20.
- [31] GILLOR, O., NIGRO, L. M., RILEY, M. A. Genetically Engineered Bacteriocins and their Potential as the Next Generation of Antimicrobials. *Current Pharmaceutical Design*. 2005, vol. 11, s. 1067-1075.
- [32] PONS, A. M., DELANDE, F., DUARTE, M., BENOIT, S., a kol. Genetic Analysis and Complete Primary Structure of Microcin L. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004, vol. 48, s. 505-513.
- [33] SEVERINOV, K. a kol. Low-molecular-weight posttranslationally modified microcins. *Molecular Microbiology*. 2007, vol. 65, no. 6, s. 1380-1394.
- [34] GORDON, D. M., JEZIOROWSKI, A. Evolution of Microcin V and Colicin Ia Plasmids in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 2007, vol. 189, s. 7045-7052.
- [35] POEY, M. E., AZPIROZ, M. F., LAVINA, M. Comparative Analysis of Chromosome-Encoded Microcins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006, vol. 50, s. 1411-1418.
- [36] HETZ C., BONO, M. R., BARROS, L. F., LAGOS, R. Microcin E492, a channel-forming bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae* induces apoptosis in some human

- cell lines. *Proceedings of the National Academy Sciences of the USA*. 2002, vol. 99, s. 2696-2701.
- [37] LAGOS, R., TELLO, M., a spol. Antibacterial and antitumorigenic properties of microcin E492, a pore-forming bacteriocin. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2009, vol. 10, s. 74-85.
- [38] GÁLVEZ, A., ABRIOUEL, H., LÓPEZ, R. L., OMAR, N. B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*. 2007, vol. 120, s. 51-70.
- [39] GILLOR, O., ETZION, A., RILEY, M. A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008, vol. 81, s. 591-606.
- [40] TRAUTNER, B. W., HULL, R. A., DAROUICHE, R. O. Colicins prevent colonization of urinary catheters. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005, vol. 56, s. 413-415.
- [41] *History of molecular biology*. [on-line], [cit. 19-01-2010]. Dostupný z WWW: < http://en.wikipedia.org/wiki/History_of_molecular_biology >
- [42] *The Bioinformatics – Genetics: the early days*. [on-line], [cit. 19-01-2010]. Dostupný z WWW: < <http://www.bioinformatics.nl/webportal/background/history.html> >
- [43] MORANGE, M., MATTHEW, C. *A history of molecular biology*. 1.vyd. Harvard University Press. 1998, 336 s. ISBN 0-674-39855-6.
- [44] *Imalab – Molekulární biologie*. [on-line], [cit. 10-11-2009]. Dostupný z WWW: < <http://www.imalab.cz/kategorie/molekularni-biologie.aspx> >
- [45] NOVOTNÝ, D. *Molekulárně biologické vyšetřování patogenních nukleových kyselín*. Roche diagnostics. Dostupný z WWW: < <http://www.rochediagnostics.cz/download/la/0402/molekularne.pdf> >
- [46] *Real-time RT PCR (kvantitativní PCR v reálném čase)* [online]. [cit. 12-03-2010]. Dostupný z WWW: <<http://www.lem-olomouc.cz/real-time.htm>>
- [47] BEDNÁŘ, M. Molekulárně genetické metody v rutinní mikrobiologické diagnostice. *Remedia – Klinické mikrobiologie*. 1997, roč. 1, č. 4, s. 115-119.
- [48] CLARK, D. *Molecular biology*. 1. vyd. Elsevier Academic Press. 2005, 784 s. ISBN 0-12-175551-7.

- [49] ŠUBRT, I. *Metody molekulárně genetické diagnostiky*. [online], [cit. 14-04-2006].
Dostupný z WWW:
<<http://www.mzcr.cz/toISO-8859-2/data/c764/lib/suaav.htm>>
- [50] *Imunologie Ústí nad Labem o.p.s. Molekulární diagnostika* [online], [cit. 10-12-2009]. Dostupný z WWW:
<<http://www.imunol-usti.cz/?stranka=molekularni-diagnostika>>
- [51] KRÁLOVÁ, B. *Bioanalytické metody*. 1.vyd. VŠCHT. 2001, 254 s. ISBN 80-7080-177-8.
- [52] RACLAVSKÝ, V. *Ovlivnění DNA teplem* [online]. [cit. 08-04-2010]. Dostupný z WWW:
<<http://biologie.upol.cz/metody/Ovlivneni%20DNA%20teplem.htm>>
- [53] BRINGING LIFE TO SCIENCE. *dNTPs MIX* [online]. [cit. 08-04-2010]. Dostupný z WWW:
<<http://www.qbiogene.com/products/pcr/dntpsmix.shtml>>
- [54] PRŮŠA, R. *Základy analytických metod v klinické molekulární biologii*. 1. vyd. Lékařská fakulta UK. 1997, 45 s.
- [55] Onkologické centrum J. G. MENDELA. *Laboratoř molekulární biologie* [online]. [cit. 06-02-2010]. Dostupný z WWW:
<<http://www.onkologickecentrum.cz/downloads/vysetreni/laborator-metody.pdf>>
- [56] KNOLL, A., VYKOUKALOVÁ, Z. *Molekulární genetika zvířat: metody detekce polymorfizmů DNA genů*. 1.vyd. MZLU. 2002, 100 s. ISBN 80-7157-616-6.
- [57] ROSYPAL, S. a kol. *Úvod do molekulární biologie, díl čtvrtý*. 3. vyd. Brno. 2002, 300 s. ISBN 80-902562-4-4.
- [58] SAMBROOK, J., RUSSELL, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual, vol2*. 1. vyd. Third Edition. 2001, 2100 s. ISBN 0-87969-577-3.
- [59] ŠMARDA, J. *Metody molekulární biologie*. 1.vyd. MU. 2008, 171 s. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [60] RACLAVSKÝ, V. *Amplifikace DNA pomocí PCR*. [on-line], [cit. 20-11-2009].
Dostupný z WWW:
<<http://biologie.upol.cz/metody/>>
- [61] ONDŘEJ, M., DROBNÍK, J. *Transgeneze rostlin*. 1. vyd. Academia. 2002, 316 s. ISBN 80-200-0958-2.
- [62] *Polymerase Chain Reaction*. [on-line], [cit. 04-02-2010]. Dostupný z WWW:

< http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction >

- [63] ROSYPAL, S. a kol. *Úvod do molekulární biologie, díl třetí*. 3. vyd. Brno. 2000, 300 s. ISBN 80-902562-2-8.
- [64] PRIMROSE, S. B., TWYMAN, R. W., OLD, R. W. *Principles of gene manipulation*. 6. vyd. Blackwell Science. 2001, 390 s. ISBN 0-632-059540.
- [65] HENEGARIU, O., HEEREMA, N. A., DLOUHÝ, S. R., VOGT, P. H. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques*. 1997, vol. 23, no. 3, s. 504-511.
- [66] KOUBSKÁ, J. *Optimalizace PCR metody pro detekci Salmonella a E. coli*. Diplomová práce. 2009, s. 64.
- [67] WASHIO, J., SATO, T., a kol. Hydrogen sulfide-producing bacteria in tongue biofilm and their relationship with oral malodour. *Journal of Medical Microbiology*. 2005, vol. 54, s. 889-895.
- [68] NARAVANENI, R., JAMIL, K. Rapid detection of food-borne pathogens by using molecular techniques. *Journal of Medical Microbiology*. 2005, vol. 54, s. 51-54.
- [69] GILLOR, O., KIRKUP, B. C., RILEY, M. A. Colicins and microcins: the next generation antimicrobials. *Advances Applied Microbiology*. 2004, vol. 54, s. 129-146.
- [70] BEJ, A. K. a kol. Polymerase chain reaction- gene probe detection of microorganisms by using filter- concentrated samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 1991, vol. 57, s. 3529-3534.
- [71] CANDRIAN, U., FURRER, B., a kol. Detection of *Escherichia coli* and identification of enterotoxigenic strains by primer-directed enzymatic amplification of specific DNA sequences. *International Journal of Food Microbiology*. 1991, vol. 12, s. 339-351.
- [72] GREENWOOD, D., SLACK, R., PEUTHERER, J., a kol. *Lékařská Mikrobiologie*. 1. vyd. Praha. 1999, 690 s. ISBN 80-7169-365-0.
- [73] BEJ, A. K. Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990, vol. 56, s. 307-314.
- [74] TANTAWIWAT, S., TANSUPHASIRI, U., a kol. Development of multiplex PCR for the detection of total coliform bacteria for *Escherichia coli* and *Clostridi-*

- um perfringens* in drinking water. *Southeast Asian Journal of tropical medicine and public health*. 2005, vol. 36, s. 162-169.
- [75] FRICKER, E. J., FRICKER, C. R. Application of the polymerase chain reaction to the identification of *Escherichia coli* and coliforms in water. *Applied Microbiology*. 1994, vol. 19, s. 44-46.
- [76] KACLÍKOVÁ, E., PANGALLO, D., a kol. Quantification of *Escherichia coli* by kinetic 5'-nuclease polymerase chain reaction (real-time PCR) oriented to *sfmD* gene. *The Society Applied Microbiology*. 2005, vol. 41, s. 132-135.
- [77] ŠMARDA, J., ŠMAJS, D., LHOTOVÁ, H., DĚDIČOVÁ, D. Occurrence of strains producing specific antibacteriak inhibitory agents in five genera of *Enterobacteriaceae*. *Current Microbiology*. 2007, vol. 54, s. 113-118.
- [78] ŠMARDA, J., ŠMAJS, D., HORYNOVÁ, S. Incidence of lysogenic, colicinogenic and siderophore-producing strains among human non-pathogenic *Escherichia coli*. *Folia Microbiology*. 2006, vol. 51, s. 387-391.
- [79] ŠMARDA, J., OBDRŽÁLEK, V. Incidence of colicinogenic strains among human *Escherichia coli*. *Journal of Basic Microbiology*. 2001, vol. 41, s. 367-374.
- [80] ŠMARDA, J., ŠMAJS, D., LHOTOVÁ, H. Three recently acknowledged *Escherichia* species strikingly differ in the incidence of bacteriocinogenic and lysogenic strains. *Journal of Basic Microbiology*. 2002, vol. 42, s. 429-433.
- [81] EDWARDS, M. C., GIBBS, R. A. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *Genome Research*. 1994, vol. 3, s. 65-75.
- [82] GERMINI, A., MASOLA, A., a kol. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR. *Food Control*. 2009, vol. 20, s. 733-738.
- [83] MARKOULATOS, P., SIAFAKAS, N., MONCANY, M. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2002, vol. 16, s. 47-51.
- [84] MANKOVICH, J. A., CHI-HSIN HSU., KONISKY, J. DNA and Amino Acid Sequence Analysis of structural and Immunity genes of colicins Ia and Ib. *Journal of Bacteriology*. 1986, vol. 168, s. 228-236.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|----------|------------------------------|
| bp | párů bází |
| DNA | Deoxyribonukleová kyselina |
| dATP | Deoxyadenin trifosfát |
| dCTP | Deoxycytidin trifosfát |
| dGTP | Deoxyguanozin trifosfát |
| dNTP | Deoxynukleozid trifosfát |
| F primer | Forward primer |
| PCR | Polymerázová řetězová reakce |
| R primer | Reverse primer |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| Obr. 1. Tol a Ton-B translokační systémy..... | 16 |
| Obr. 2. Struktura kolicinu E3..... | 17 |
| Obr. 3. Princip polymerázové řetězové reakce..... | 26 |
| Obr. 4. Optimalizace multiplex PCR..... | 27 |
| Obr. 5. Agarózový gel PCR produktů při detekci E. coli a jiných kmenů při teplotě 56,9 °C..... | 41 |
| Obr. 6. Agarózový gel PCR produktů při detekci laboratorních vzorků z potravin a vody..... | 42 |
| Obr. 7. Test na produkci bakteriocinů na indikátorovém kmeni S. sonnei..... | 43 |
| Obr. 8. Agarózový gel PCR produktů kolicinů a mikrocinů..... | 44 |
| Obr. 9. Agarózový gel PCR produktů kolicinů a mikrocinů 2.část..... | 45 |
| Obr. 10. Agarózový gel PCR produktů metodou duplex..... | 48 |
| Obr. 11. Agarózový gel PCR produktů kolicinogenních kmenů..... | 49 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|--|----|
| Tab. 1. Seznam použitých bakteriálních kmenů. | 32 |
| Tab. 2. Seznam kmenů izolovaných z potravin a vody | 33 |
| Tab. 3. Složení amplifikační směsi PCR pro detekci E. coli. | 34 |
| Tab. 4. Použité primery..... | 34 |
| Tab. 5. Složení amplifikační směsi pro bakteriociny..... | 35 |
| Tab. 6. Použité kolicinové primery..... | 36 |
| Tab. 7. Použité mikrocinové primery. | 37 |
| Tab. 8. Protokol optimalizace. | 46 |
| Tab. 9. Složení PCR směsi pro jednu reakci..... | 47 |
| Tab. 10. Výsledky PCR typizace kolicinogenních kmenů. | 50 |

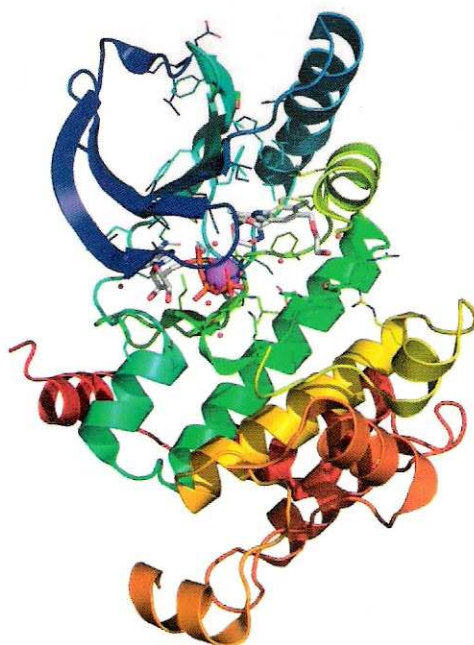
SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA I: Publikace výsledků diplomové práce na konferenci XIV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů

PŘÍLOHA II: Abstrakt publikované práce

**PŘÍLOHA I: PUBLIKACE VÝSLEDKŮ DIPLOMOVÉ PRÁCE NA
KONFERENCI XIV. SETKÁNÍ BIOCHEMIKŮ A MOLEKULÁRNÍCH
BIOLOGŮ**

XIV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů



Sborník příspěvků

**20.–21. dubna 2010
BRNO**

&
Studentský workshop v rámci OPVpK projektu
Podpora efektivní spolupráce biomedicínských oborů
MU a VUT Brno s účastí aplikační sféry 2009–2012
22. dubna 2010, BRNO

PŘÍLOHA II: ABSTRAKT PUBLIKOVANÉ PRÁCE

- Grochová D, Vaňková J, Damborský J, Ravčuková B, Šmarda J, Vojtěšek B, Šmardová J (2008). Analysis of transactivation capability and conformation of p53 temperature-dependent mutants and their reactivation by amifostine in yeast. *Oncogene* 27:1243 – 1252
- North S, Pluquet O, Maurici D, El-Ghissassi F, Hainaut P (2002). Restoration of wild-type conformation and activity of temperature-sensitive mutant of p53 (p53(V272M)) by the cytoprotective aminothiol WR1065 in the esophageal cancer cell line TE-1. *Mol.Carcinog.* 33:181-188

Tato práce vznikla za podpory grantů NS/10448-3 IGA MZ a MŠMT 0021622415.

DETEKCE *ESCHERICHIA COLI* A *SALMONELLA SP.* METODOU DUPLEX PCR

Lucie Janáková, Jana Koubská, Magda Doležalová

Ústav technologie a mikrobiologie potravin, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Náměstí TGM 275, 762 72 Zlín

Cílem této práce bylo současně detekovat dvě potravinářsky významné bakterie *Escherichia coli* a *Salmonella* sp. Pro rychlou detekci těchto bakterií byla vybrána metoda PCR, specifické primery byly navrženy dle literatury. Podmínky PCR reakce byly optimalizovány, teplota 56,9 °C byla určena jako nejvhodnější pro nasedání zvolených primerů (LZL-389 a LZR-653 pro *E. coli*; SAL-1F a SAL-2R pro *Salmonella* sp.). Specifita primerů pro detekci *E. coli* (inkluzivita a exkluzivita) byla prověřena na 21 kmenech *E. coli* a na 31 kmenech jiných než *E. coli* (soubor gramnegativních a grampozitivních bakterií). V další fázi experimentu bylo přistoupeno k detekci obou bakterií v jedné PCR reakci (duplex PCR). Po úspěšné optimalizaci byla tato duplex PCR aplikována při detekci *E. coli* a *Salmonella* sp. na uměle zaočkovaných vzorcích chlazené drůbeže. Touto metodou je možno paralelně stanovit přítomnost bakterie *Escherichia coli* a *Salmonella* sp. Na druhou stranu bylo zjištěno, že zvolené primery pro *E. coli* nejsou zcela vyhovující, jelikož nesplňují podmínku 100% inkluzivita a exkluzivita.

OPTIMALIZACE METODY PRO PRŮKAZ BAKTERIÍ RODU *BIFIDOBACTERIUM* V TVRDÝCH SÝRECH TYPU EIDAM

Jurečková Nela, Španová Alena, Rittich Bohuslav

Bakterie rodu *Bifidobacterium* jsou součástí běžné střevní flóry lidí i zvířat. Jsou známé pro svůj prospěšný vliv na zdraví a proto je lze využít v potravinách a farmaceutických produktech jako probiotika. Důležitým faktorem probiotických potravin je, aby obsahovaly živé mikroorganismy v dostatečném množství a byly schopny přežít jednotlivé kroky produkce potravin a prostředí gastrointestinálního traktu (Gomez a kol. 2009). Kmen *Bifidobacterium longum* ATTC 15707 byl kultivován v anaerobních podmínkách v MRS médiu s cysteinem a byl přidán k tvrdému sýru typu eidam. Celková DNA v kvalitě vhodné pro PCR byla izolována metodou fenolové extrakce a použitím magnetických částic P(HEMA-co-GMA) v přítomnosti polyethylenglykolu (PEG 6000) a chloridu sodného. Metoda PCR byla použita k identifikaci bakterií rodu *Bifidobacterium* s využitím rodově