

RAPD profil vybraných kmenů laktokoků

Bc. Kateřina Bártová

Diplomová práce
2009



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav potravinářského inženýrství

akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina BÁRTOVÁ**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Téma práce: **RAPD profil vybraných kmenů laktokoků**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

- Charakteristika bakterií mléčného kvašení, zaměření na druh *Lactococcus lactis*
- Metoda PCR a její modifikace, zejména RAPD

II. Praktická část

- Optimalizace metodiky izolace DNA z bakterií rodu *Lactococcus*
- Srovnání fingerprintu 16 kmenů *Lactococcus lactis*

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] GORNER, F., VALÍK, L'. Aplikovaná mikrobiologie požívatin, Malé centrum 2004.
[2] AXELSSON, L. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology, 2nd Edition, Marcel Dekker Inc, New York, 1998.
[3] COCCONCELI, P.S., GALANDHINI, S., SENINI, L. Development of RAPD protocol for typing of lactic acid bacteria and enterococci, Letters in Applied Mikrobiology 21: 376-379, 1995.
[4] MACPHERSON, J., M., ECKSTEIN, P., E., SCOLES, G., J. a GAJADHAR, A., A. Variability of the random polymorphic DNA essay aminy thermal cyclers and efect of primer and DNA concentration, Moll. Cell. Probes, 7, 293 -- 229, 1993.
[5] SAMARŽIJA, D., SIKORA, S., REDŽEPOVIČ, S. Application of RAPD analysis for identification of Lactococcus lactis subsp. cremoris strains isolated from artisanal cultures, Microbiol. Res. 157, 13 -17.

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

9. února 2009

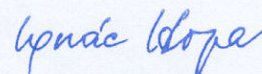
Termín odevzdání diplomové práce:

31. května 2009

Ve Zlíně dne 31. května 2009



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

V teoretické části diplomové práce byly charakterizovány bakterie mléčného kvašení se zaměřením na druh *Lactococcus lactis*. Dále byly popsány metody izolace bakteriální DNA, polymerázová řetězová reakce a její modifikace, zejména RAPD. Tato metoda byla popsána v rámci identifikace a rozlišení různých kmenů laktokoků či typizace bakterií mléčného kvašení. V praktické části byla provedena optimalizace metodiky izolace DNA z bakterií rodu *Lactococcus* a dále srovnání fingerprintu 16 studovaných kmenů *Lactococcus lactis* metodou RAPD s použitím různých primerů. Závěrem byly vyhodnoceny výsledky týkající se vzájemného odlišení poddruhů *lactis* a *cremoris*.

Klíčová slova: Bakterie mléčného kvašení; *Lactococcus lactis*; Bakteriální DNA; Polymerázová řetězová reakce (PCR); Agarózová gelová elektroforéza; Polymorfismus náhodně amplifikované DNA (RAPD); RAPD profil

ABSTRACT

In theoretical parts of Master thesis the lactic acid bacteria were characterized with a view to species *Lactococcus lactis*. Then the methods of isolation bacterial DNA, polymerase chain reaction (PCR) and its modification especially RAPD were described. RAPD method was characterized in terms of identification and separation of various strains of lactococci or typing of lactic acid bacteria (LAB). In practical parts the optimalization of methodics isolation DNA from bacteria of genus *Lactococcus* and subsequently the comparison of fingerprint of 16 *Lactococcus lactis* strains tested by RAPD method using the various primers were effected. At the conclusion the results of differentiation of species *lactis* and *cremoris* were evaluated.

Keywords: Lactic Acid Bacteria; *Lactococcus lactis*; Bacterial DNA; Polymerase Chain Reaction (PCR); Agarose gel electrophoresis; Randomly Amplified polymorphic DNA (RAPD); RAPD profile

Touto cestou bych ráda poděkovala své vedoucí diplomové práce RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a náměty, čímž mi významně pomohla ke zpracování zadaného tématu. Dále bych ráda poděkovala Ing. Františkovi Buňkovi, Ph.D. za pomoc při statistickém vyhodnocování analyzovaných gelů.

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně

.....

Podpis studenta

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	11
1.1 TAXONOMIE A VLASTNOSTI BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	11
1.2 METABOLISMUS BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	12
1.2.1 Elektronové akceptory BMK.....	15
1.3 VÝZNAM A VYUŽITÍ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	15
1.4 ROD <i>LACTOCOCCUS</i>	16
1.4.1 Historický vývoj taxonomie <i>Lactococcus lactis</i>	16
1.4.2 Vlastnosti <i>Lactococcus. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> a <i>Lactococcus. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	17
1.4.3 Izolace a výskyt laktokoků	18
1.4.4 Proteolytický systém <i>Lactococcus lactis</i>	20
1.4.5 Produkce exopolysacharidů	20
1.4.6 Požadavky na živiny BMK.....	21
2 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE – PCR.....	23
2.1 HISTORIE PCR.....	23
2.2 IZOLACE DNA.....	24
2.3 PODMÍNKY A PRŮBĚH POLYMERÁZOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCE	25
2.3.1 Požadavky na primery	25
2.3.2 Termostabilní DNA polymerázy.....	25
2.3.3 Průběh PCR	26
2.3.4 Termocykler.....	27
2.4 MODIFIKACE PCR	27
2.5 INHIBITORY PCR	28
2.6 VYUŽITÍ PCR	28
2.7 IDENTIFIKACE A SEPARACE DNA	29
2.7.1 Gelová elektroforéza	29
3 POLYMORFISMUS NÁHODNĚ AMPLIFIKOVANÉ DNA - RAPD	30
3.1 PRINCIP RAPD	30
3.2 PARAMETRY OVLIVŇUJÍCÍ RAPD TYPIZACI	30
3.2.1 Templátová DNA	30
3.2.2 Výběr primeru	31
3.2.3 Teplota a počet cyklů	31
3.2.4 Vizualizace.....	31
3.3 VÝHODY A NEVÝHODY RAPD	31
3.4 POUŽITÍ RAPD	32
3.4.1 Využití RAPD pro typizaci BMK.....	32
3.4.2 Aplikace RAPD k identifikaci <i>Lactococcus lactis</i>	33

3.4.3	Sledování <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> pomocí primerů HdiR a No.125	34
4	CÍL PRÁCE	36
II	PRAKTICKÁ ČÁST	37
5	MATERIÁL A METODY	38
5.1	BAKTERIÁLNÍ KULTURY	38
5.2	POUŽITÉ ROZTOKY A MÉDIA	39
5.2.1	Kultivační média a roztoky k izolaci bakteriální DNA	39
5.2.2	Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu	40
5.3	PŘÍPRAVA KULTIVAČNÍHO MÉDIA A KULTIVACE BAKTERIÁLNÍCH BUNĚK	40
5.3.1	Příprava MRS bujónu s glukózou	40
5.3.2	Kultivace bakterií	41
5.4	IZOLACE BAKTERIÁLNÍ DNA.....	41
5.4.1	Lyze buněk, izolace a purifikace bakteriální DNA	41
5.5	AMPLIFIKACE DNA	42
5.5.1	Polymerázová řetězová reakce s primery PALA 4 a PALA 14	42
5.5.2	Náhodně amplifikovaná polymorfní DNA (RAPD).....	43
5.6	AGARÓZOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA.....	44
5.6.1	Příprava agarózového gelu	44
5.6.2	Nanášení vzorku a průběh agarózové gelové elektroforézy	44
5.6.3	Hodnocení gelů	45
6	VÝSLEDKY.....	46
6.1	KULTIVACE, MORFOLOGICKÁ A MIKROSKOPICKÁ CHARAKTERISTIKA <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i>	46
6.2	IZOLACE BAKTERIÁLNÍ DNA.....	48
6.3	PCR S PRIMERY PALA 4 A PALA 14.....	49
6.4	CHARAKTERISTIKA KMENŮ POMOCÍ RAPD TYPIZACE	51
6.4.1	RAPD typizace s primerem CC1	53
6.4.2	RAPD typizace s primerem P16.....	57
6.4.3	RAPD typizace s primerem P2.....	61
6.4.4	RAPD typizace s primerem P17.....	65
6.4.5	RAPD typizace s primerem CORR1	69
6.4.6	RAPD typizace s primerem PER1	73
7	DISKUZE.....	77
7.1	IZOLACE BAKTERIÁLNÍ DNA <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i>	77
7.2	CHARAKTERISTIKA STUDOVANÝCH KMENŮ LAKTOKOKŮ POMOCÍ RAPD – TYPIZACE.....	77
	ZÁVĚR.....	79
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	80

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	84
SEZNAM OBRÁZKŮ	85
SEZNAM TABULEK.....	86

ÚVOD

Význam bakterií mléčného kvašení spočívá v jejich dlouhodobé tradici v potravinářském průmyslu. Hlavním znakem těchto bakterií je produkce kyseliny mléčné jako hlavního výsledného produktu fermentace sacharidů. Morfologicky se jedná o skupinu gram pozitivních a obvykle kataláza negativních koků nebo tyčinek, které rostou za mikroaerofilních až striktně anaerobních podmínek a tvoří spory. Do této heterogenní skupiny bakterií jsou řazeny rody *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Sporolactobacillus*, *Streptococcus*, *Weissella*, *Tetragenococcus* a *Vagococcus*.

Mezi ekonomicky nejvýznamnější bakterie mléčného kvašení patří bakterie rodu *Lactococcus*. Vzhledem k technologickému významu poddruhů *L. lactis* subsp. *lactis* a *L. lactis* subsp. *cremoris* je třeba tyto poddruhy vzájemně odlišit. Za tímto účelem se používají molekulárně diagnostické metody. Běžně používanou metodou se stala polymerázová řetězová reakce.

V současné době je snahou mnoha pracovišť vyvinout jednoduché metody k rozlišení obou poddruhů. Jednou z možných metod je i RAPD s využitím vhodných primerů.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Bakterie mléčného kvašení (BMK, LAB – Lactic Acid Bacteria) patří mezi průmyslově významné mikroorganismy, které jsou celosvětově využívány při výrobě fermentovaných mléčných potravin a nápojů. Homofermentativní a heterofermentativní kvašení způsobené mléčnými bakteriemi při přeměně sacharidů na kyselinu mléčnou jsou dobře prozkoumány a oba způsoby kvašení byly popsány v řadě studií. Ke vzniku charakteristickým rysů produktu, jako jsou vůně, textura a mnohdy i nutriční hodnota potravin, slouží vhodné uchování a aplikace bakterií mléčného kvašení [1].

Ze všech bakterií mléčného kvašení je nejrozsáhleji studovaným mikroorganismem *Lactococcus lactis*. Relativní jednoduchost metabolismu mikroorganismu *L. lactis*, při kterém dochází k přeměně sacharidů na pyruvát, spočívá v tom, že vytváří energii především přes stupeň fosforylace substrátu. Významnější průlom pro použití mikroorganismu *Lactococcus lactis* jako průmyslového mikroorganismu spočíval ve vývoji několika genetických postupů, které vedly k bližší charakterizaci těchto bakterií [1].

Mnoho zástupců bakterií mléčného kvašení hraje podstatnou roli v průběhu mléčného kvašení, při němž jsou tyto bakterie často používány jako startérové kultury ve výrobě různých druhů sýrů. V některých mléčně kvašených výrobcích se vyskytují další druhy mléčných bakterií, které bývají označovány jako sekundární mikroflóra. Tyto často úmyslně přidané bakterie produkují žádoucí sloučeniny aroma a oxid uhličitý [2].

1.1 Taxonomie a vlastnosti bakterií mléčného kvašení

Pojem mléčné bakterie zahrnuje skupinu rodů s podobnými fyziologickými a ekologickými znaky. Jedná se o grampozitivní nesporogenní, mikroaerofilní bakterie. Morfologicky se BMK řadí jak mezi koky, tak mezi tyčinky a obecně neprodukuje katalázu. Název této skupiny bakterií je odvozen od jejich schopnosti fermentovat sacharidy na kyselinu mléčnou (homofermentace) jako hlavní výsledný produkt. Při heterofermentativním kvašení vznikají kromě kyseliny mléčné rovněž kyseliny jablečná, jantarová, mravenčí, octová, etanol a oxid uhličitý [3].

Taxonomie bakterií mléčného kvašení je provázána velkými změnami. Jedná se o velmi heterogenní skupinu, do které patří rody *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Sporolactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* a *Weissella* [4].

Mléčné bakterie jsou v přírodě ubikvitárně rozšířené, zejména v místech s vysokými koncentracemi sacharidů, aminokyselin, vitaminů a vyšší tenzí oxidu uhličitého. Tvoří součást bakteriálního osídlení respiračního systému a dominantní část mikroflóry trávicího a urogenitálního traktu člověka i zvířat. Jsou také nalézány v klinickém materiálu humánního a animálního původu. BMK jsou významnou složkou mikroflóry potravin (fermentované mléčné výrobky, fermentované maso a zelenina, těsto, nápoje). Výběrem vhodných tzv. startérových kultur při výrobě fermentovaných produktů lze zajistit jejich požadované příznivé organoleptické vlastnosti (chuť, vůni apod.). Bakterie mléčného kvašení vykazují silný inhibiční efekt proti růstu a produkci toxinů ostatních přítomných bakterií. Těchto vlastností se využívá ke zvýšení trvanlivosti a zdravotní nezávadnosti potravin. Při balení některých druhů potravin včetně masa a masných výrobků jsou BMK faktorem, který významně ovlivňuje údržnost a senzorické vlastnosti potravin [5], [8].

Některé rody bakterií mléčného kvašení jsou producenty bakteriocinů. Jedná se o sloučeniny bílkovinné povahy, které vykazují antibakteriální aktivitu proti omezenému spektru mikroorganismů, většinou úzce příbuzných s daným producentem. Rody *Lactobacillus*, *Enterococcus* a *Bifidobacterium* jsou užívány rovněž jako probiotika s cílem kompenzovat účinky škodlivých faktorů, působících na lidský organismus [5].

1.2 Metabolismus bakterií mléčného kvašení

Základním rysem metabolismu bakterií mléčného kvašení je účinná fermentace sacharidů spojená s fosforylací substrátu. Vzniklý adenosintrifosfát (ATP) je následně využíván pro biosyntetické účely [6].

Homofermentativní bakterie mléčného kvašení (*Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*) produkují kyselinu mléčnou jako hlavní nebo jediný konečný produkt fermentace glukózy. Glykolýzou (Embden – Mayerhof – Parnasovou dráhou) vznikají z jednoho molu glukózy 2 moly kyseliny mléčné a 2 moly ATP.

V některých případech, pokud se změni růstové podmínky a substrátem pro fermentaci je pentóza, může dojít ke změně. Homofermentativní BMK pak využívají pentózu stejně jako heterofermentativní druhy [6].

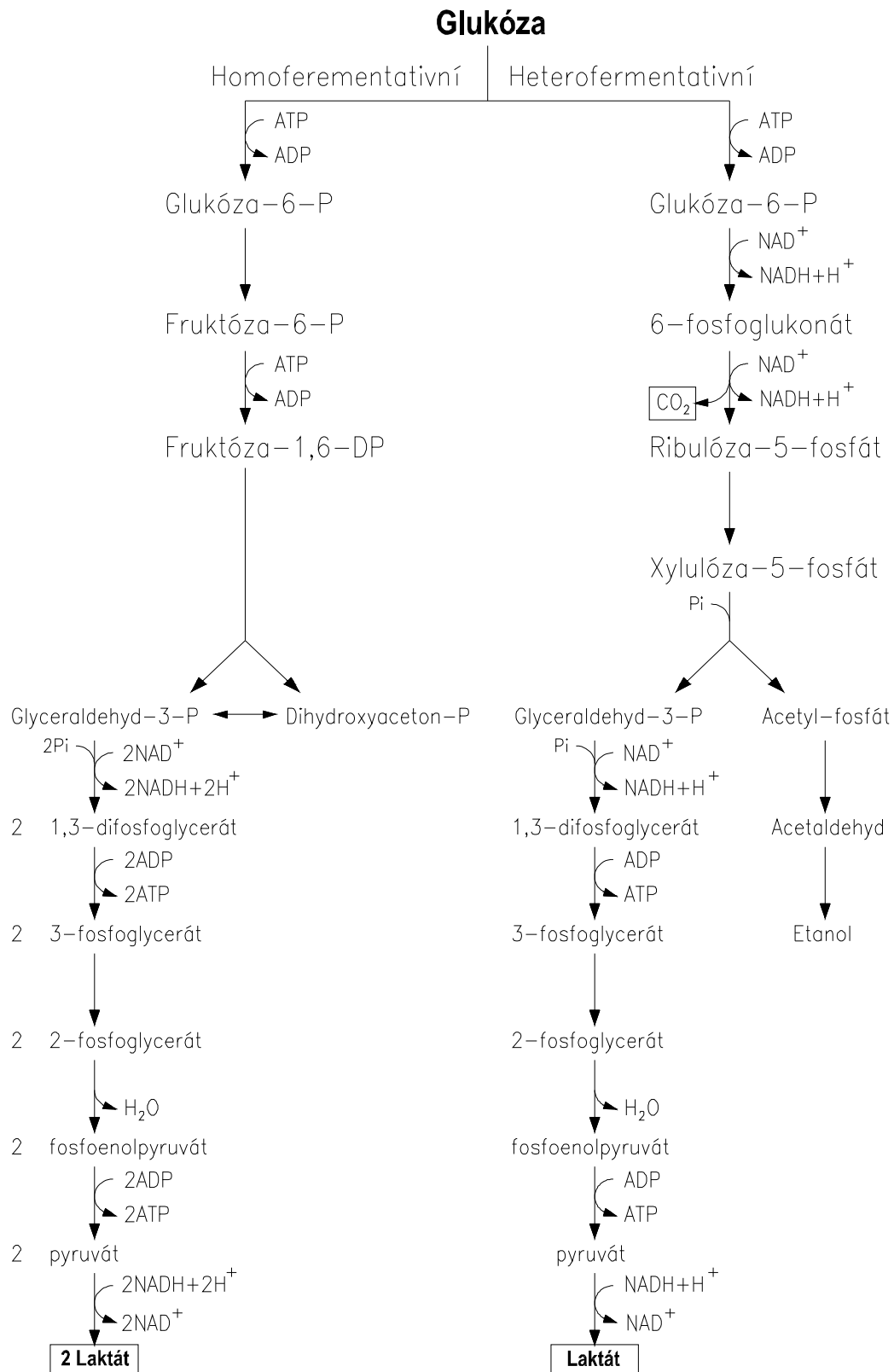
Heterofermentativní BMK (*Leuconostoc*, *Weissella* a některé laktobacily) produkují z jednoho molu glukózy 1 mol kyseliny mléčné, CO₂ a etanolu a 1 ATP pomocí hexóza – monofosfátové nebo pentózové dráhy (obrázek 1). Jiné hexózy než glukóza, jako jsou manóza, galaktóza a fruktóza, jsou rovněž fermentovány mnohými mléčnými bakteriemi. Metabolismus disacharidu laktózy se nejvíce uplatňuje v mlékárenském průmyslu při výrobě fermentovaných mléčných výrobků. Laktóza vstupuje do buňky dvěma možnými způsoby, a to buď s využitím nosiče laktóza – permeázy nebo pomocí fosfoenolpyruvát dependentní fosfotransferázy [6].

Stejně jako všechny ostatní bakterie mléčného kvašení jsou laktokoky velmi náročné na prostředí, ve kterém rostou. Jejich růst vyžaduje přítomnost proteinů, peptidů, specifických aminokyselin, derivátů nukleových kyselin a vitaminů, z nichž všechny slouží jako stavební jednotky v syntéze jejich vlastní buňky. V mléce je koncentrace aminokyselin leucinu, izoleucinu, valinu, histidinu a methioninu, které jsou základem pro většinu laktokoků, méně než 1 mg/l. Obsah volných aminokyselin původně obsažených v mléce poskytuje dostatečné množství dusíku, a to asi 2 %. Kasein, který tvoří až 80 % všech bílkovin mléka se po vyčerpání neproteinového dusíku stává jeho primárním zdrojem [7].

Lactococcus lactis subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* je schopen v mléce metabolizovat citrát. Konečnými produkty metabolismu citrátu jsou diacetyl, aceton, 2,3-butandiol, kyselina octová a oxid uhličitý, které přispívají k tvorbě chuti a vůně fermentovaných mléčných výrobků. Citrát je bez modifikace transportován do buňky. Tato reakce je katalyzována enzymem citrát permeázou [7].

Zvláštností některých bakterií mléčného kvašení je způsob umístění genů zodpovědných za některé metabolické aktivity (fermentace laktózy, proteinázová aktivita). Informace pro určitý metabolický krok u nich nejsou lokalizované pouze na chromozomech, ale i na plazmidech. Jejich obsah DNA v buňkách se pohybuje okolo 1 – 3 %, výjimečně až 20 % celkové DNA hostitelské buňky [8].

Obrázek 1: Homofermentativní a heterofermentativní mléčné kvašení [6].



P.....fosfát
DP.....difosfát

NAD⁺.....nikotidadeninindinukleotid
NADH.....redukována forma NAD⁺

ATP.....adenosintrifosfát
ADP.....adenosindifosfát

1.2.1 Elektronové akceptory BMK

Pro homofermentativní bakterie mléčného kvašení mohou hrát v anaerobním metabolismu určitých substrátů podstatnou roli organické elektronové akceptory. Příkladem takovýchto vnějších organických elektronových akceptorů jsou acetaldehyd, α -ketokyseliny, citrát, fruktóza, fumarát a glycerol [6].

V reakcích s NADH oxidázami vystupuje jako vnější elektronový akceptor kyslík, což může být pro bakterie mléčného kvašení v mnoha případech výhodné. Produkty reakce mohou být buď NAD^+ a H_2O_2 nebo NAD^+ a H_2O , a to v závislosti na tom, zda enzym zprostředkovává dva nebo čtyři přenosy elektronů. Mnoho mléčných bakterií také vlastní NADH peroxidázu, která jako elektronový akceptor využívá H_2O_2 . BMK pak mohou využívat kromě pyruvátu jako elektronový akceptor i acetylfosfát (přesněji jeho koenzym – CoA) [6].

Bakterie mléčného kvašení však nevyžadují jako vnější elektronový akceptor pouze kyslík. Ke stejnému účelu mohou sloužit i některé anaerobní organické sloučeniny. Toto platí zejména pro heterofermentativní mléčné bakterie. Přítomnost nebo absence vnějšího elektronového akceptoru rozhoduje, zda se vytvoří etanol (bez ATP) nebo acetát (1 ATP). Některé heterofermentativní bakterie mléčného kvašení tvoří nedostatek etanolu a jsou proto na vnějším elektronovém akceptoru závislé [6].

1.3 Význam a využití bakterií mléčného kvašení

Průmyslové využití bakterií mléčného kvašení souvisí s jejich dlouholetou tradicí, která spočívá ve využívání různých forem kvašení. Ekonomický význam bakterií mléčného kvašení spočívá v jejich přítomnosti v různých druzích zákvasů a těst užívaných pro výrobu základních druhů potravin. Startérové kultury mezofilních laktokoků jsou využívány při výrobě široké škály různých druhů sýrů, másla a fermentovaných mlék [9].

Například *Lactococcus lactis* je součástí máslařské kultury používané k zakysání smetany a některé kmeny *L. lactis* produkují antibiotikum nisin, které se používá jako pomocná látka při konzervaci potravin.

Streptococcus thermophilus je součástí zácvasů pro výrobu ementálského sýra a společně s mikroorganismem *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus* zpravidla tvoří základ tzv. jogurtové kultury. *Lactobacillus helveticus* je využíván jako startérová kultura pro výrobu sýrů [10].

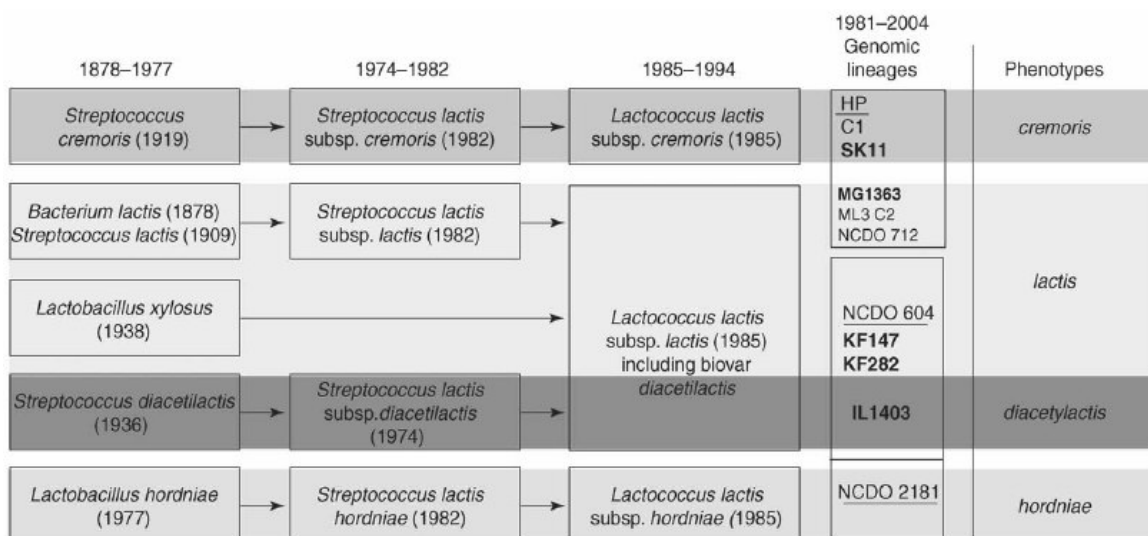
1.4 Rod *Lactococcus*

Lactococcus lactis je primárním modelovým mikroorganismem patřící do skupiny mléčných bakterií, jenž má široké využití ve výrobě fermentovaných mléčných výrobků zahrnujících kyselé smetany, čerstvé a měkké sýry a různé tvrdé a polotvrdé sýry. Laktokoky jako startérové kultury hrají klíčovou roli v určování kvality fermentovaných mléčných výrobků, a to s ohledem na skladovatelnost, uchování a především senzoryckou jakost [11].

1.4.1 Historický vývoj taxonomie *Lactococcus lactis*

První popis bakterií mléčného kvašení se datuje až k roku 1878, ve kterém byl popsán organismus *Bacterium lactis*. V roce 1970 byly laktokoky popsány jako tři různé druhy streptokoků (*Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetylactis*, *Streptococcus lactis*). V roce 1985 Schleifer navrhnul, aby byl rod *Lactococcus* přiřazen k některým druhům rodu *Streptococcus* a *Lactobacillus* (obrázek 2). K tomuto definování došlo na základě chemotaxonomických studií, které byly potvrzeny sekvencováním 16S rRNA. Na základě několika charakteristických fenotypových vlastností byly v rámci *Lactococcus lactis* klasifikovány poddruhy *lactis*, *cremoris* a *lactis* biovar *diacetylactis*. Pro následné analýzy těchto mikroorganismů byly použity různé metodiky vycházející z molekulárních přístupů zahrnující DNA hybridizaci, sekvencování genů a polymerázou řetězovou reakci (PCR – Polymerase Chain Reaction) [11].

V současnosti rod *Lactococcus* zahrnuje pět druhů; *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus plantarum*, *Lactococcus raffinolactis* a *Lactococcus lactis*, který je rozlišovaný do poddruhů *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *hordniae* (dříve *Lactobacillus hordniae*) a *L. lactis* subsp. *lactis* (dříve *Lactobacillus xylosus*, *Streptococcus lactis*) [12].

Obrázek 2: Historický přehled taxonomie mikroorganismu *Lactococcus lactis* [11].

1.4.2 Vlastnosti *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*

Laktokoky jsou grampozitivní koky patřící do skupiny bakterií mléčného kvašení. Jsou homofermentativní a produkují výhradně L(+) izomer kyseliny mléčné. Nevykazují β -hemolýzu, jsou pouze slabě α -hemolytické [12].

Ve vztahu ke kyslíku jsou fakultativně anaerobní, chemorganotrofní a k růstu vyžadují nutričně kompletní média. Laktokoky také netvoří spóry, jsou nepohyblivé, bez pouzder a obvykle jsou řazeny do sérologické skupiny N [13].

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* vykazuje některé charakteristické vlastnosti, kterými se odlišuje od *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: má nižší optimální teplotu růstu, tvoří měřitelné množství CO_2 , morfologicky se zpravidla vyznačuje většími buňkami a tvorbou delších řetězků (tabulka 1, obrázek 3). *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* je v mlékárenství nejrozšířenějším mikroorganismem. V čerstvém, za hygienických podmínek nadojeném mléce se velmi dobře rozmnožuje a způsobuje kvašení. Je tedy neodmyslitelnou součástí čistých mlékařských kultur využívaných pro výrobu některých druhů kysaných mlék, kysaných smetan a většiny druhů sýrů. Jeho buňky mají vejcovitý tvar o průměru 0,5 - 1,0 μm a většinou se vyskytují v párech nebo krátkých řetězcích. Charakteristické pro něj je, že nefermentuje sacharózu nebo pouze v nepatrné míře.

V mléku tvoří 0,8 – 0,9 % kyseliny mléčné a méně než 10 % metabolitů jsou těkavé kyseliny, zejména kyselina octová. Neštěpí kyselinu citronovou, netvoří acetoin, diacetyl ani CO₂. V médiu nesnáší koncentraci NaCl 6,5 %, ale při koncentraci 4 % roste dobře. Některé kmeny produkují bakteriocin nisin, v potravinářství využívaný k inhibici grampozitivních bakterií, zejména anaerobních sporotvorných bakterií, jako jsou např. klostridia [8].

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* je mikroorganismus, který tvoří buňky o průměru 0,6 – 1,0 μm (často jsou větší než u *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*), které zůstávají u sebe ve směru jejich dělení, proto vznikají dlouhé řetízky, často složené i z více než 20 buněk. V mléku tvoří asi 0,7 % kyseliny mléčné. Tento mikroorganismus tvoří menší množství vedlejších produktů, přičemž tvorba CO₂ je proměnlivá. Rovněž vytváří malé množství acetoinu a diacetylu. Roste ještě v médiu s obsahem 2 % NaCl, koncentrace 4 % NaCl je však pro něj inhibiční [8].

Lactococcus lactis subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* má podobné charakteristiky jako *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* s výjimkou tvorby většího množství těkavých látek. Od *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* se liší dvěma znaky, jednak za přítomnosti fruktózy vytváří především CO₂ a kyselinu octovou, jednak štěpí kyselinu citronovou, při čemž se ve značné míře tvoří acetoin. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* bývá využíván v čistých mlékařských kulturách, u kterých se vyžaduje tvorba aromatu (diacetyl) a tvorba CO₂ není na závadu [8].

1.4.3 Izolace a výskyt laktokoků

Bakterie rodu *Lactococcus* jsou obecně považovány pro člověka za nepatogenní, i když byly izolovány z klinického materiálu, např. z hemokultur [13].

Zpravidla se nacházejí na rostlinách a kůži zvířat. *Lactococcus plantarum* bývá izolovaný převážně z rostlin, *Lactococcus garvieae* z ryb, zvířat a mléka a *Lactococcus piscium* z lososa. Přítomnost laktokoků v syrovém mléce vděčí znečištění z píce během dojení. Laktokoky, které se nejčastěji nacházejí v čerstvém mléce, sýrech a dalších mléčných produktech, jsou *L. lactis* subsp. *lactis* a *L. lactis* subsp. *cremoris* [12].

Tabulka 1: Vybrané vlastnosti mikroorganismů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a subsp. *cremoris* [8], [13].

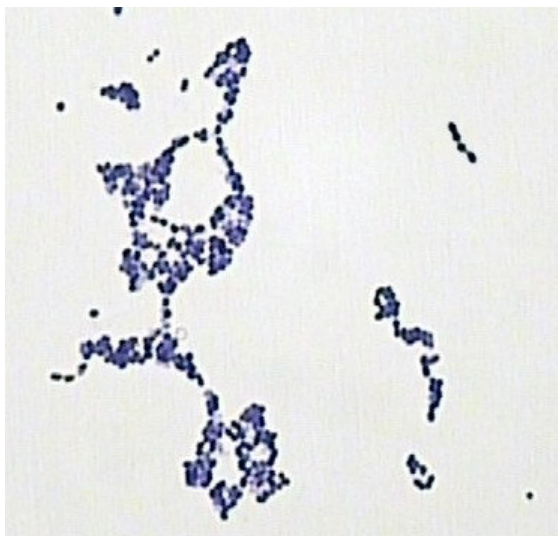
	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
Reakce na Gramovo barvení	pozitivní	pozitivní
Tvar a uspořádání buněk	nesporulující kokovité nebo oválné buňky v párech nebo různě dlouhých řetězcích	nesporulující kokovité nebo oválné buňky v párech nebo kratších řetězcích
Vztah ke kyslíku	fakultativně anaerobní	fakultativně anaerobní
Optimální kultivační teplota	30°C	30°C
Hlavní diagnostické znaky	kataláza negativní, oxidáza negativní, z argininu tvoří amoniak	kataláza negativní, oxidáza negativní, z argininu netvoří amoniak
Vzhled kolonií	1-2 mm nepigmentované až béžové okrouhlé kolonie s hladkými okraji, lesklé, vypouklé kolonie.	1-2 mm nepigmentované až béžové okrouhlé kolonie s hladkými okraji, lesklé, vypouklé kolonie
Výskyt	rostlinný materiál, mléko	rostlinný materiál
Použití	fermentované mléčné výrobky, výroba nisinu	fermentované mléčné výrobky s táhlovitou strukturou

Obrázek 3: Mikroorganismus *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* [14].

- a) Vzhled povrchových kolonií po aerobní kultivaci na M17 agaru s glukózou (48 h při 30 °C)



- b) Barveno podle Grama po aerobní kultivaci v M17 agaru s glukózou (18 h při 30 °C), zvětšení 10 x 100



1.4.4 Proteolytický systém *Lactococcus lactis*

Proteolytický systém organismu *Lactococcus lactis* zahrnuje membránu s lokalizovanou proteinázou, rozmanité peptidové transportní systémy a několik intracelulárních peptidáz. Proteolytické produkty uvolněné do prostředí se pro další degradaci musí upravovat. Počáteční růst laktokoků v mléce závisí na obsahu nebílkovinného dusíku. Jakmile je obsah nebílkovinného dusíku vyčerpán, jedna z proteináz (Pr^-) pozastaví růst buněk v množství přibližně 10^8 CFU/ml, zatímco degradace kaseinu druhou proteinázou (Pr^+) umožňuje další růst buněk přesahující množství 10^9 CFU/ml. Tyto bakteriální typy se mohou různými způsoby ovlivňovat. Mohou soutěžit o přístupnost živin, jeden z nich může upravovat prostředí způsobem, který potlačuje další růst nebo může produkovat či uvolňovat sloučeniny, které další růst podporují (komezalismus) [15].

1.4.5 Produkce exopolysacharidů

Exopolysacharidové molekuly produkované různými bakteriemi mléčného kvašení představují širokou škálu chemických sloučenin, zahrnující změny ve složení a vazbě polysacharidu, větvení polymeru a jeho délky. Tyto polymery hrají významnou roli v reologických a texturních vlastnostech fermentovaných produktů.

Mohou být také použity jako přírodní potravinové přísady, v současnosti však nahrazují použití stabilizátorů a zahušťovadel, které jsou produkovány nepotravinářskými bakteriemi. Produkce exopolysacharidů mikroorganismem *Lactococcus lactis* je spojená s kmeny izolovanými z vysoce viskózních fermentovaných mléčných výrobků. Specifické exopolysacharidové geny jsou kódovány na velkých plazmidech, které mohou být konjugovaně přenesené z jednoho kmene laktokoků na další. Tímto představují kapacitu vyprodukovaných exopolysacharidů v příjmovém kmenu [16].

1.4.6 Požadavky na živiny BMK

Laktokoky se zpravidla vyskytují v omezených lokalitách bohatých na živiny. Postrádají však různé biosyntetické dráhy, takže pro svůj růst potřebují živiny, zejména aminokyseliny, vitaminy skupiny B a kromě toho také sacharidy, fosfáty, draslík a hořčík. Mnoho genů kódujících anabolické enzymy bývá lokalizováno na plazmidech, které mohou během růstu vymizet. Proto množství živin, které kmeny laktokoků potřebují, závisí na zdroji, ze kterého byly izolovány, na době uchování ve sbírce mikroorganismů a na tom, jaké médium bylo použito k jejich udržování [17].

Aminokyseliny mohou být dodávány buď ve formě volné nebo po hydrolyze kaseinu. Dobrý růst laktokoků byl potvrzen v médiu, které obsahovalo 18 – 19 aminokyselin. U vyšetřovaných kmenů *Lactococcus lactis*, byla v přítomnosti 6 esenciálních aminokyselin potvrzena stimulace jejich růstu. Mezi tyto esenciální aminokyseliny, které stimulují poddruh *L. lactis* subsp. *lactis* patří: kyselina glutamová, valin, methionin, histidin, leucin a isoleucin. Poddruh *L. lactis* subsp. *cremoris* je navíc kromě těchto aminokyselin stimulován i prolinem a fenylalaninem. Některé kmeny *L. lactis* subsp. *cremoris* také potřebují serin, tyrosin, lysin a alanin. Za koncentraci esenciálních aminokyselin pod jejíž hranicí není růst poddruhů *L. lactis* subsp. *lactis* a *L. lactis* subsp. *cremoris* optimální je považována hodnota 10 – 80 mg.l⁻¹[17].

Kromě aminokyselin jsou pro růst bakterií mléčného kvašení esenciální i některé vitaminy skupiny B. Mnoho studií se shodlo na tom, že kyselina nikotinová (vitamin B₃), kyselina pantotenová (vitamin B₅) a biotin jsou pro jejich růst esenciální.

Kyselina nikotinová je nezbytná pro syntézu NADP a kyselina pantotenová je kofaktorem koenzymu A. Bylo také zjištěno, že pro některé kmeny *L. lactis* subsp. *lactis* a *L. lactis* subsp. *cremoris* jsou vitaminy thiamin (B₁) a riboflavin (B₂) esenciální nebo stimulační [17].

Minerální látky, a zejména stopové prvky, vstupují do médií v podobě nečistot, které jsou součástí jejich složek. Média bohatá na minerální látky obsahují zejména (v $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ hmotnosti sušiny) Fe (150), Cu (71), Mg (1270), Zn (74) a V (44). Určité množství některých minerálních látek stimuluje růst *L. lactis* subsp. *lactis* a *L. lactis* subsp. *cremoris* [17].

2 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE – PCR

Polymerázová řetězová reakce – PCR (Polymerase Chain Reaction) je enzymová metoda, která slouží k syntéze definovaného úseku DNA *in vitro*. Tato metoda, která znamenala revoluci v metodice molekulární biologie, poskytuje až 10^6 násobné pomnožení DNA během 2 – 3 hodin. Základem je použití neporušeného řetězce DNA, který má být pomnožen. Dalším důležitým předpokladem pro úspěšnou reakci je navržení vhodných primerů tak, aby byla zajištěna specifita reakce. Pro daný úsek DNA jsou k dispozici oligonukleotidové primery komplementární k 3' a 5' – koncovým sekvencím úseku, jenž má být amplifikován. Jednotlivé kroky amplifikace zahrnují denaturaci templátu, připojení primerů a extenzi připojených primerů DNA polymerázou. Opakování těchto kroků vede k syntéze segmentu s konci definovanými primery, které jsou inkorporovány do nově vznikajících molekul. Fragmenty této délky tvoří hlavní produkt reakce, ale kromě toho vznikají i delší fragmenty DNA. Podíl těchto fragmentů se však v průběhu reakce snižuje. Při prvním reakčním cyklu vznikají delší fragmenty než odpovídá vzdálenosti vymezené zvolenými primery. Ve druhém cyklu poskytují tyto nově vzniklé molekuly již fragmenty DNA požadované délky. Delší molekuly budou produkovány i nadále, ale jejich množství bude stoupat pouze lineární rychlostí [18].

Protože primery musí být chemicky syntetizovány, PCR může být použita pouze pro klonování DNA, u které známe alespoň začáteční a koncovou nukleotidovou sekvenci. Pomocí těchto primerů nasyntetizuje DNA polymeráza obvykle několik miliard kopií požadované sekvence. PCR je tedy velmi citlivá metoda, která umožňuje detekci jediné kopie DNA ve vzorku tím, že tuto sekvenci namnoží do té míry, že ji můžeme po separaci gelovou elektroforézou snadno detekovat [19].

2.1 Historie PCR

Polymerázová řetězová reakce je technika, která byla vynalezena v roce 1985 molekulárním genetikem Kary B. Mullisem, který byl pracovníkem biotechnologické firmy Cetus Corporation v Kalifornii. Kary Mullis se zasloužil o prvotní provedení mnohonásobné replikace *in vitro* ve zkumavce. Po dokončení manuálu, však byla PCR technika pomalá a velmi náročná na lidskou práci. Proto začali vědci společnosti Cetus hledat způsoby, kterými by celý proces mohli automatizovat.

První termocykler „Pan Cyklus“ zajišťoval potřebu přidavku čerstvého enzymu do každé zkumavky po ohřívacím a chladícím procesu. V roce 1985 se společnost Cetus spojila se společností Perkin – Elmer a uvedla DNA thermocykler. V roce 1989 společnost Cetus oznámila svou spolupráci s farmaceutickou firmou Hoffmann – La Roche na vývoji a komercializaci diagnostiky lidských onemocnění. Firma Roche po té zakoupila od společnosti Cetus patentovanou PCR a přidruženou technologii za 300 000 000 dolarů [20].

2.2 Izolace DNA

Prvním krokem při práci s nukleovými kyselinami je jejich izolace v nativním stavu z přirozeného materiálu, v dostatečném množství a čistotě. Nejrozšířenější metody používané k izolaci DNA z nejrůznějších organismů jsou klasické metody založené na fenolové extrakci. Výchozím materiálem mohou být jednotlivé buňky (např. u prokaryotických organismů), tkáně a orgány eukaryot, které jsou nejdříve homogenizovány nebo částice virů purifikované centrifugačními technikami. Obecný postup izolace DNA je možné rozdělit do několika kroků: [21].

- Rozrušení buněčných stěn. Z enzymů se v závislosti na chemickém složení buněčných stěn nejčastěji používá lysozym a celulózy, z detergentů je běžně používán dodecylsulfát sodný.
- Promíchání lyzátu s roztokem fenolu, případně se směsí fenolu a chloroformu. Chloroform denaturuje proteiny, rozpouští tuky a napomáhá oddělení jednotlivých fází.
- Centrifugace. Při centrifugaci dochází k oddělení spodní organické fáze tvořené fenolem (případně směsí fenolu a chloroformu), mezifáze tvořené denaturovanými proteiny a zbytky buněk a horní vodné fáze, v níž jsou rozpuštěny nukleové kyseliny.
- Vysrážení DNA etanolem, případně izopropanolem. Účinnému vysrážení DNA se napomáhá snížením teploty a přidávkem solí.
- Shromáždění precipitátu DNA centrifugací a rozpuštění získaného sedimentu ve vhodném roztoku [21].

Vedle metod založených na extrakci fenolem se používají rovněž metody založené na vysolování proteinů a přečištění roztoku nukleových kyselin srážením etanolem nebo průchodem přes chromatografické kolony [21].

2.3 Podmínky a průběh polymerázové řetězové reakce

2.3.1 Požadavky na primery

Ve většině reakcí je vhodná sekvence a koncentrace primerů parametrem rozhodujícím o úspěšném výsledku. Vhodné primery zpravidla obsahují 18 – 24 nukleotidů, neobsahují sekundární strukturu, mají vyvážený poměr G/C a A/T párů, nejsou vzájemně komplementární. Dále mají přijatelnou teplotu tání, která dovoluje jejich připojení k templátu (55 – 65 °C) a jejich optimální koncentrace v reakci je zpravidla 0,1 – 0,6 μM (vyšší koncentrace mohou vést ke vzniku nespecifických produktů) [18].

2.3.2 Termostabilní DNA polymerázy

Vzhledem k tomu, že se při PCR aplikují teploty, při kterých dochází k inaktivaci běžných enzymů, používají se termostabilní DNA polymerázy izolované z termofilních bakterií. První DNA polymeráza tohoto typu, Taq polymeráza, byla získána z bakterie *Thermus aquaticus* [22].

PCR tedy využívá pro opakovanou syntézu obou vláken termostabilní DNA polymerázu. 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. 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 při 95 °C přibližně 40 minut [18].

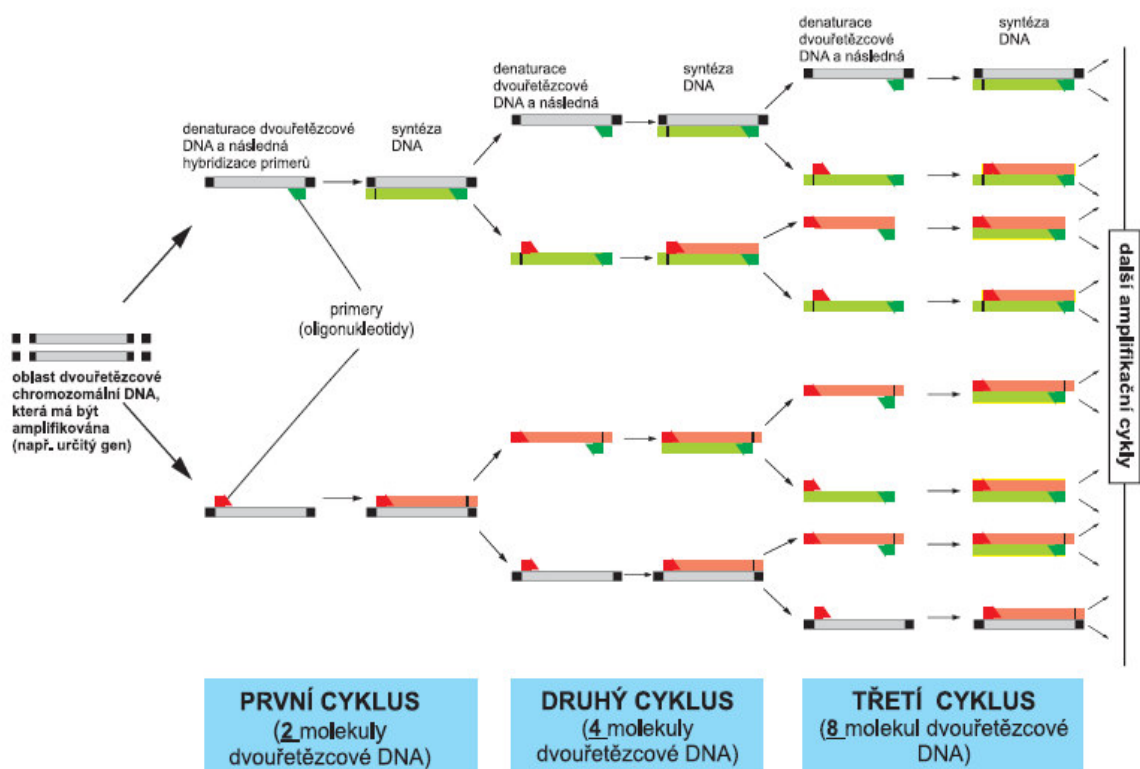
Komerčně dostupné termostabilní DNA polymerázy se liší ve specifických charakteristikách, ačkoliv všechny syntetizují DNA při zvýšených teplotách. Každý enzym je dodáván s optimalizovaným reakčním pufrem. Některé enzymy se vyznačují schopností kontroly, která opravuje špatně spojená místa v primer – templátových interakcích u konce 3'. Jiné DNA polymerázy vykazují aktivitu reverzní transkriptázy, čímž je možná kontaminace RNA v DNA preparacích, což může vést ke vzniku anomálních fingerprintů [23].

2.3.3 Průběh PCR

PCR se sestává z několika kroků. Prvním krokem je denaturace, kdy se DNA po dobu 20 – 30 sekund zahřívá na teplotu 94 – 98 °C. Při této teplotě se kvůli zrušení vodíkových můstků rozvolňuje dvoušroubovice a odděluje se od primerů. Vzniká tak jednovláknová DNA. Při následném kroku, kterým je nasednutí primerů (hybridizace), se sníží teplota na 50 – 60 °C, což umožňuje nasednutí primerů na specifická místa DNA. Na primery se váže polymeráza. Teplota použitá v závěrečném kroku, kterým je prodloužená denaturace závisí na DNA polymeráze [24].

Počet kopií úseku DNA mezi dvěma primery (každý je komplementární k jednomu vlákně dvouřetězcové DNA) roste při opakování cyklů geometrickou řadou [22].

Obrázek 4: Klonování definovaného úseku DNA pomocí PCR [22].



2.3.4 Termocykler

Termocykler je programovatelný termostat, který musí být schopen přechodu mezi jednotlivými teplotami. Hlavními požadavky jsou tedy přesnost teploty a rychlost přechodu mezi jednotlivými teplotami [18].

Přesné hodnoty teploty a dobu trvání jednotlivých kroků je třeba optimalizovat podle délky amplifikovaného úseku DNA a konkrétní sekvence primerů. Pro zahájení reakce postačuje velmi malé množství výchozích molekul DNA. V průběhu 20 – 30 cyklů dochází ke zdvojnásobení a exponenciálnímu nárůstu počtu úseků na DNA ohraničených místech, k nimž se připojily primery [21].

Reakční teplota, které se skutečně dosahuje během amplifikačních cyklů je různá, a to v závislosti na provedení a modelu stroje, režimu regulace teploty a použité nádobky (mikrozkumavka, mikrotitrační destička) [23].

V současné době existuje celá řada výrobců těchto přístrojů s různými typy temperance a chlazení včetně mechanického přenášení mezi jednotlivými lázněmi [18].

2.4 Modifikace PCR

Vedle standardního provedení existuje celá řada modifikací polymerázové řetězové reakce. Jedná se například o obrácenou neboli inverzní PCR (IPCR), pomocí níž lze amplifikovat úseky DNA o neznámé sekvenci ohraničující na obou koncích DNA, jejíž sekvence je známa. Další modifikací je asymetrická PCR, při které je použit pouze jeden primer. Využívá se např. při automatickém sekvencování. *In situ* – PCR je metoda umožňující amplifikovat specifické sekvence nukleových kyselin přímo v buňkách nebo cytologických preparátech tkání a chromozomů. Produkty reakce lze vizualizovat specifickou sondou metodou hybridizace *in situ* nebo imunochemicky [21].

PCR – RFLP je metoda založená na amplifikaci definovaného fragmentu DNA a následném štěpení amplifikovaného produktu s jedním nebo více restrikními enzymy (RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphisms). PCR – ribotypizace je technika, která je variantou standardní ribotypizace s DNA fingerprinty vytvořenými spíše amplifikací než enzymovým štěpením.

REP – PCR (Repetitive Extragenic Elements) je založena na amplifikaci repetitivních extragenových elementů. Krátké extragenové opakované sekvence jsou přítomny v mnoha místech bakteriálního genomu. Počet a místa těchto opakovaných sekvencí jsou pro různé kmeny variabilní [23].

Mnohonásobná (multiplex) PCR je taková varianta PCR, kdy je do reakční směsi přidáno několik párů primerů rozpoznávajících několik rozdílných cílových sekvencí, což umožňuje analýzu několika úseků DNA současně v jedné reakční směsi. Reakční podmínky pro současnou amplifikaci všech produktů je nutno empiricky optimalizovat. Hlavní výhodou této varianty jsou nižší cenové náklady než při samostatných amplifikacích, a proto se používá pro vyhledávání změn na dlouhých úsecích DNA, testování vzájemně nesouvisejících oblastí na DNA a zejména pro amplifikaci vnitřních kontrol PCR [25].

2.5 Inhibitory PCR

Inhibitory přítomné ve vzorcích představují pro PCR aplikace značné problémy, v jejichž důsledku dochází k nežádoucímu vzniku negativních výsledků. Mezi inhibitory, které mohou ovlivňovat PCR patří např. Ca^{2+} ionty, které jsou schopny vyvazovat MgCl_2 , dále potom enzymy nukleázy, které degradují cílové nukleové kyseliny, a nebo inhibitory, které mohou přímo inhibovat DNA polymerázu. Inhibitory PCR je možné dle jejich původu dělit na intracelulární, které jsou součástí buněk mikroorganismů a extracelulární, které se dále dělí na exogenní a endogenní. Příkladem endogenních inhibitorů může být fenol používaný při izolaci DNA, enzymy, sodiumdodecylsulfát, těžké kovy či žlučové soli. Důvodem přítomnosti exogenních inhibitorů je zpravidla nedostatečně sterilní práce v laboratoři [26].

2.6 Využití PCR

Polymerázová řetězová reakce je speciálně využívána ve třech aplikacích. Jednak může být použita pro klonování úseku DNA (například genu), přičemž templátem může být jak DNA, tak RNA. Pomocí PCR je tedy možné získat jak kopii genomové DNA, tak cDNA (komplementární, complementary DNA). Dalším využitím PCR, zvláště díky vysoké citlivosti této metody, je detekce virové infekce již v počátečních stádiích.

Jako primery se při této reakci používají krátké úseky DNA odvozené z virové sekvence a po několikanásobné amplifikaci lze dokázat přítomnost či absenci teoreticky i jediné kopie v malém vzorku krve. Velké použití našla PCR také v soudním lékařství. Díky vysoké citlivosti stačí pouze malé množství vzorku – minimální stopy krve nebo tkáně, které obsahují třeba jen zbytky jediné buňky – ke spolehlivé identifikaci osoby, ze které vzorek pochází [19].

2.7 Identifikace a separace DNA

2.7.1 Gelová elektroforéza

Pro účel rozdělení DNA fragmentů se obvykle používá gelová elektroforéza, která dokáže fragmenty rozdělit podle velikosti. DNA se díky svému negativnímu náboji pohybuje směrem ke kladné elektrodě, přičemž dlouhé úseky DNA se pohybují pomaleji, protože jsou v hustém gelu více zpomalovány. Po určité době se fragmenty v gelu rozdělí podle velikosti za vzniku "žebříku". DNA však není v agarózovém gelu možno vidět. Je proto nutné ji nějakým způsobem obarvit nebo označit. Jednou z citlivých metod detekce je smíchání DNA s látkou, která po navázání na DNA fluoreskuje v ultrafialovém světle [19].

Rozdělené fragmenty DNA lze izolovat přímo z gelu a použít pro další práce. Volbou velikosti a koncentrace gelu lze zajistit vhodné podmínky pro dělení fragmentů v různých rozmezích molekulových hmotností. Standardními agarózovými gely lze snadno separovat DNA velikostí 0,5 – 25 kb [18].

Tabulka 2: Rozmezí molekulových hmotností DNA separovaných v gelu o různých koncentracích agarózy [18].

Koncentrace agarózy (% w/v)	Rozmezí molekulových hmotností separace lineárních molekul DNA (kb)
0,3	5,0 – 20
0,6	1,0 – 20
0,7	0,8 – 10
0,9	0,5 – 7
1,2	0,4 – 6
1,5	0,2 – 3
2,0	0,1 – 2

3 POLYMORFISMUS NÁHODNĚ AMPLIFIKOVANÉ DNA - RAPD

K rozlišování izolátů daných bakteriálních druhů může být použito velké množství biochemických a molekulárních technik. Uvedení polymerázové řetězové reakce vedlo k typizaci technik založených na amplifikaci DNA. Náhodná amplifikace polymorfní DNA (Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD), také známá jako APPCR (Arbitrarily Primed – Polymerase Chain Reaction), je technikou, která se stále častěji používá k typizaci mikroorganismů, zvláště klinických izolátů. Aplikace, potenciální problémy a řešení typizace RAPD jsou stále diskutovány [23].

3.1 Princip RAPD

Tato metoda, která patří mezi PCR techniky, byla poprvé publikována v roce 1990. Vytváří fylogeneticky konzervované produkty, specifické pro jedince, náhodně rozdělené v genomu templátové DNA. RAPD umožňuje detekci rozdílů v DNA polymorfismu mezi organismy. Při RAPD jsou používány náhodně generované krátké primery o délce 6 – 10 nukleotidů. Během reakce dochází k amplifikaci řady produktů, které se liší délkou a interním nukleotidovým složením [27].

Po provedení agarózové gelové elektroforézy jsou RAPD produkty viditelné v podobě proužků o různé velikosti. Soubor těchto proužků se potom nazývá RAPD profil [28].

3.2 Parametry ovlivňující RAPD typizaci

3.2.1 Templátová DNA

U každé DNA amplifikace může ovlivňovat koncentrace templátové DNA počet produktů a množství rozdílných fingerprintů. Vysoká koncentrace templátové DNA může mít za následek utlumení průběhu amplifikace, které se projevuje tvorbou menších fragmentů. K urychlení celkového času RAPD analýzy se využívá templátová DNA vyprodukovaná z extraktu buněk. RAPD typizace by měla být striktně založena na samotné chromozomální DNA. Úplné vyloučení plazmidové DNA není vždy zaručeno, ale její obsah může být minimalizován pomocí různých technik. Například rozředěním DNA extraktu před amplifikací lze zaručit, že jsou RAPD profily pouze minimálně ovlivňovány plazmidovou DNA [23].

3.2.2 Výběr primeru

Výběr a použití vhodného primeru patří mezi hlavní aspekty správně provedené reakce. RAPD profil je ovlivňován sekvencí, koncentrací a délkou primeru. Primery mají obvykle délku 10 bazí. Krátká délka motivu a výrazně nižší teplota annealingu zvyšují pravděpodobnost nasednutí primeru na mnoha místech molekuly DNA (primery jsou tzv. nespecifické). Pro výběr primeru zpravidla není potřeba žádné znalosti konkrétních sekvencí, prakticky je možno použít jakýkoliv primer a rozhodující je to, který z nich vykazuje u studovaných vzorků polymorfní fingerprint [23].

3.2.3 Teplota a počet cyklů

Nejčastěji používanou teplotou annealingu pro RAPD amplifikaci je 37 °C. V případě optimalizace bývá volena teplota v rozmezí 32 – 40 °C. Vyšší teploty představují negativní důsledek annealingu a následné extenze. Počet cyklů, který se obvykle pohybuje v rozmezí 35 – 50 zřejmě zásadním způsobem neovlivňuje RAPD profil. Méně než 30 cyklů by však mohlo vést k vymizení některých DNA fragmentů, doporučuje se tedy používat program s 35 cykly [28].

3.2.4 Vizualizace

Důležitým, avšak častokrát zanedbávaným krokem RAPD typizace je vizualizace. Většina RAPD profilů je vizualizována pomocí etidumbromidu (EtBr), který je zviditelněn prohlížením pod ultrafialovým světlem. Proto, aby nedošlo k vymizení některých méně intenzivních fragmentů je nutné dodržovat standardní podmínky barvení [23].

3.3 Výhody a nevýhody RAPD

RAPD techniky se osvědčily jako rychlá a jednoduchá metoda identifikace genotypů, pro porovnávání různých populací rostlin a ke studiu *in vitro* – a mezipopulační variability. Výhody RAPD analýzy lze spatřovat zejména ve skutečnostech, že není požadována vysoká kvalita DNA templátu, mohou být použity rychlé metody izolací DNA; není potřeba předešlé znalosti sekvencí genomové DNA.

Naopak mezi nevýhody můžeme zařadit malou variabilitu a malou reprodukovatelnost mezi laboratoři. Výsledky se mohou lišit např. podle délky primeru, teploty hybridizace, použitého enzymu, reakční směsi či typu použitého termálního cyklu [27].

3.4 Použití RAPD

3.4.1 Využití RAPD pro typizaci BMK

Okolo tisíce bakterií mléčného kvašení izolovaných z běžných produktů, zejména sýrů, byly identifikovány a popsány druhově specifickou PCR, respektive RAPD. RAPD profily byly získány s použitím primeru M13. K jedenácti hlavním bakteriím mléčného kvašení, které byly identifikovány pomocí RAPD-PCR patří *Lactobacillus casei/paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus thermophilus* a *Lactococcus lactis* [29].

Bakterie použité v této studii byly izolovány ze syrového mléka a sýrů během různých fází jejich výroby a zrání. Kmeny byly kultivovány při teplotě 30 až 42 °C po dobu 16 – 18 hodin. Jejich čistota byla kontrolována provedením mikroskopického vyšetření. K izolaci DNA bylo použito 100 – 200 µl přes noc narostlé kultury ve vhodných médiích (přibližně 10⁷ CFU/ml). Genomová DNA vyizolovaná z různých kmenů byla použita jako templát pro PCR fingerprinty. Jako primer byl použit primer M13 se sekvencí 5'-GAGGGTGGCGGTCT-3'. Amplifikační reakce byly provedeny podle dříve optimalizovaného protokolu. RAPD produkty byly separovány pomocí agarózové gelové elektroforézy [29].

Celková reprodukovatelnost RAPD – PCR reakcí byla větší než 89 % a celková hodnota shlukové analýzy odpovídala koeficientu podobnosti 55 %. Numerická analýza normalizovala PCR identické fingerprinty více než 1 000 kmenů bakterií mléčného kvašení, které umožnily separaci profilů do jedenácti stejnorodých skupin. Podle typu kmenů byly jednotlivé skupiny přiřazeny k *L. casei/L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *S. thermophilus*, *E. faecium*, *E. faecalis* a *L. lactis*.

Přibližně 4 % studovaných kmenů nebyly systémem přesně rozpoznatelné, protože jejich RAPD profily nebyly přítomny v knihovně. Toto byl případ například dvou atypických kmenů *Lactobacillus casei* [29].

3.4.2 Aplikace RAPD k identifikaci *Lactococcus lactis*

Vzhledem k odlišným technologickým vlastnostem mikroorganismů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* je nezbytné od sebe oba poddruhy odlišit. Tradičně jsou pro odlišení *L. lactis* subsp. *lactis* a subsp. *cremoris* používány růstové a biochemické charakteristiky, jako je růst při odlišných teplotách, tolerance ke zvýšeným koncentracím chloridu sodného a schopnost hydrolyzovat arginin. Tento způsob identifikace je časově náročný a nemusí být zcela spolehlivý. Proto se používají rychlejší molekulární metody. Za tímto účelem lze použít metodu RAPD pro typizaci souboru kmenů *L. lactis*. Pro typizaci byla použita sada sedmi RAPD primerů. Kmeny byly analyzovány také pomocí PCR s druhově a poddruhově specifickými primery. Na základě hodnocení vzniklých RAPD profilů byly kmeny rozděleny do dvou skupin. První skupina byla tvořena kmeny zařazenými na základě amplifikace s druhově a poddruhově specifickými primery do poddruhu *L. lactis* subsp. *lactis*. Druhá skupina byla vytvořena kmeny zařazenými na základě PCR s druhově a poddruhově specifickými primery do poddruhu *L. lactis* subsp. *cremoris* [30].

Kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* jsou často využívány jako startérové kultury, jež se uplatňují při výrobě fermentovaných mléčných výrobků. Jejich metabolické produkty se přímo nebo nepřímo podílejí na ovlivnění textury, chuti a vůně finálních výrobků. Nicméně úspěšná fermentace u běžných výrobků závisí na použití těch nejefektivnějších kmenů [2].

Ze všech použitých kmenů byla genomová DNA vyizolována pomocí fenol – chloroform – izoamylalkoholové extrakce. Jako primery byly použity primery P2 (sekvence 5'-GATCGGACGG-3'), P15 (sekvence 5'-CTGGGCACGA-3'), P16 (sekvence 5'-TCGCCAGCCA-3'), P17 (sekvence 5'-CAGACAAGCC-3'). Primery P15, P16, P17 byly vybrány pro jejich schopnost odlišit *L. lactis* subsp. *lactis* od *L. lactis* subsp. *cremoris*, zatímco primer P2 byl zvolen náhodně [2].

Výsledkem použití jednotlivých primerů pro všechny izoláty byly specifické RAPD profily. V těchto profilech se počet DNA proužků o různých molekulových hmotnostech pohyboval v rozmezí 7 – 17. Získané polymorfní proužky DNA byly využity ke zjištění rozmanitosti mezi testovanými kmeny. Shluková analýza potvrdila dvě skupiny. Skupina I se sestávala z referenčního kmene *L. lactis* subsp. *cremoris* NIZO B64 a skupina II se sestávala ze šesti velmi podobných, ale neidentických izolátů C1, C6, C8, C9, C10 a C11. U izolátů byla shledána nejméně 76 % podobnost s referenčním kmenem, takže se pravděpodobně jedná o *L. lactis* subsp. *cremoris*. V rámci druhé skupiny bylo možné rozlišit izoláty C1 a C6 od jiných. Ačkoliv se značně lišily, izoláty C1 a C6 byly referenčnímu kmenu *L. lactis* subsp. *cremoris* NIZO B64 více podobné než izoláty C8, C9, C10 a C11. Výsledky provedeného experimentu signalizují, že některý z C8, C9, C10 a C11 izolátů získaných z běžně využívaných kultur může vykazovat určité nové charakteristické rysy, které mohou představovat potenciální hodnoty v mléčných fermentacích [2].

3.4.3 Sledování *L. lactis* subsp. *cremoris* pomocí primerů HdiR a No.125

Probiotika jsou živé mikrobiální kultury, které prospěšně působí na svého hostitele, a to zlepšováním jeho mikrobiální rovnováhy. Nejpoužívanějšími probiotickými bakteriemi jsou laktobacily a bifidobakterie, které byly izolovány z lidského intestinálního traktu. Existují studie prokazující prospěšný účinek těchto druhů na lidské zdraví. Na rozdíl od toho však existuje poměrně menší množství studií o probiotické aktivitě laktokoků, které nejsou považovány za přirozené obyvatele lidského gastroinstetinalního traktu. Nicméně se v poslední době hovoří o tom, že *Lactococcus lactis* byl izolovaný z lidského intestinálního traktu. Mimo to několik studií poukazuje i na to, že některé laktokoky vyžadují specifické podmínky gastroinstetinalního traktu jako jsou nízké pH a přítomnost žluči [31].

K reakcím byla použita genomová DNA (purifikovaná z čistých kultur). Pro RAPD reakci byly použity páry primerů HdiR a No.125. Specifika navrhovaného páru primerů HdiR byla testována s DNA extrahovanou z 23 kmenů *L. lactis* subsp. *cremoris* a dalších 5 kmenů laktokoků obsahujících *L. lactis* subsp. *lactis*. Pár primerů HdiR byl navržen podle HdiR sekvence genu *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 jako cílového genu.

Alikvoty amplifikovaných produktů byly podrobeny gelové elektroforéze. Pro návrh kmenově specifických primerů *L. lactis* subsp. *cremoris*, bylo vybráno několik genů, které představovaly nízkou podobnost mezi příbuznými nukleotidovými sekvencemi *L. lactis* subsp. *cremoris* a *L. lactis* subsp. *lactis* registrovanými v databázi. Od 16S rRNA sekvence vykazovaly tyto poddruhy významné podobnosti (asi 86 %) [31].

4 CÍL PRÁCE

Grampozitivní bakterie *Lactococcus lactis* patří do skupiny bakterií mléčného kvašení, které hrají klíčovou roli v potravinářském průmyslu při výrobě fermentovaných mléčných výrobků. Cílem této diplomové práce bylo vzhledem k technologickému významu poddruhů *L. lactis* subsp. *lactis* a *L. lactis* subsp. *cremoris* zjistit metody jejich identifikace a odlišení, a to ve spolupráci se Sbírkou kultur mlékařských mikroorganismů Laktoflora® Tábor.

Pro dosažení cílů bylo třeba:

- zpracovat literární rešerši týkající se charakteristiky bakterií mléčného kvašení s podrobnějším zaměřením na druh *Lactococcus lactis*.
- popsat metodu polymerázové řetězové reakce a její modifikace, zejména RAPD.

Pro zpracování praktické části diplomové práce bylo nutné naplnit tyto dílčí cíle:

- optimalizovat metodiku izolace DNA z bakterií rodu *Lactococcus* s využitím fenol – chloroformové extrakce.
- provést srovnání fingerprintu 16 studovaných kmenů *Lactococcus lactis* metodou RAPD s použitím různých primerů.
- na základě teoretické části a výsledků praktické části formulovat závěry týkající se RAPD profilu studovaných kmenů rodu *Lactococcus*.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 MATERIÁL A METODY

5.1 Bakteriální kultury

Pro studium byly použity kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, které byly získány ze Sbírký kultur mlékařských mikroorganismů Laktoflora® Tábor (CCDM – Cultures Collection of Dairy Microorganism Laktoflora®).

Tabulka 3: Seznam studovaných kmenů laktokoků

Kmen	Zdroj
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 48	horské porosty ČR
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 53	siláž, VÚC ČR
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 141	neuveden
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 354	neuveden
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 412	neuveden
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 414	neuveden
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 418	neuveden
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 421	neuveden
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824	neuveden
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 885	neuveden
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 890	neuveden
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 946	neuveden
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 1004	mléčná kultura
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 1005	mléčná kultura
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> CCDM 823	neuveden
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> CCDM 1006	mléčná kultura

5.2 Použité roztoky a média

5.2.1 Kultivační média a roztoky k izolaci bakteriální DNA

- MRS bujón s 0,5 % glukózy

MRS bujón (HiMedia, Bombai, Indie) byl připraven dle návodu výrobce za současného přidání glukózy (Lach – Ner, Neratovice, ČR) v takovém množství, které odpovídá požadované koncentraci 5 g/l.

- Fyziologický roztok (0,8 % NaCl)

Fyziologický roztok byl připraven rozpuštěním 8 g NaCl (Lach – Ner) v 1 l destilované H₂O a sterilizován v autoklávu.

- Lyzační roztok se sacharózou

Pro přípravu 30 ml lyzačního roztoku se sacharózou bylo smícháno 17,55 ml roztoku sacharózy (Lach – Ner), 0,99 ml roztoku NaCl, 0,6 ml EDTA (kyselina etylendiamintetraoctová) (Lach – Ner), 0,3 ml Tris pufru (SERVA, Heidelberg, Německo) a doplněno 10,56 ml H₂O.

- Roztok lysozymu

Roztok lysozymu o koncentraci 50 mg/ml byl připraven rozpuštěním 0,05 g lysozymu (SERVA) v 1 ml destilované H₂O. Roztok byl připravován vždy čerstvý.

- 20 % SDS

20 % roztok SDS (sodiumdodecylsulfát) byl připraven rozpuštěním 20 g SDS (SERVA) v 80 ml destilované H₂O.

- Proteináza K

Roztok proteinázy K o koncentraci 1 mg/ml byl připraven rozpuštěním 1 mg proteinázy K (SERVA) v 1 ml sterilní destilované H₂O. Takto připravenou proteinázu K je možné dlouhodobě uchovávat při teplotě – 20 °C.

- Fenol - chloroform

Směs fenolu (SERVA) a chloroformu (Lach - Ner), byla připravena v poměru 1:1.

- CIZ (chloroform – izoamylalkohol)

Směs chloroformu (Lach – Ner) a izoamylalkoholu (SERVA) byla připravena jejich smícháním v poměru 24:1.

➤ 3 M octan sodný

3 M octan sodný byl připraven rozpuštěním 40,81 g trihydrátu octanu sodného (Lach – Ner) v 80 ml destilované H₂O a následně byl sterilizován v autoklávu.

➤ TE pufr

TE pufr byl připraven smícháním 10 mM Tris – HCl (SERVA) a 1 mM EDTA (Lach – Ner).

5.2.2 Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu

➤ Nanášecí pufr

Nanášecí pufr byl připraven smícháním 6x LB pufru (BioLabs, New England, UK) a sterilní destilované H₂O v poměru 1:5.

➤ Marker 100 bp

Použitý 100 bp marker byl připraven smícháním 196 µl sterilní destilované H₂O, 24 µl 10x LB pufru (BioLabs) a 20 µl Ladder pufru (BioLabs).

➤ Etidiumbromid

Pro barvení agarózového gelu byl použit etidiumbromid (SERVA) o celkové koncentraci 1 µl/ml gelu. Etidiumbromid je mutagen (ochranné rukavice).

➤ 0,5 x TBE pufr

0,5 x TBE pufr byl připraven smícháním 50 ml 10x koncentrovaného TBE pufru (SERVA) a 950 ml destilované vody.

5.3 Příprava kultivačního média a kultivace bakteriálních buněk

5.3.1 Příprava MRS bujónu s glukózou

MRS médium bylo připraveno rozpuštěním 13,79 g MRS broth v 250 ml destilované vody a následným přidáním 1,25 g glukózy (množství, které odpovídá výsledné koncentraci 5 g/l). Po rozpipetování média do zkumavek po 10 ml byla provedena jeho sterilace v autoklávu. Sterilační režim odpovídal teplotě 121 °C po dobu 30 minut.

5.3.2 Kultivace bakterií

Bakteriální buňky byly naočkovány do 10 ml MRS bujónu s glukózou a kultivovány v termostatu při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin. Po proběhlé kultivaci vytvářely buňky v MRS bujónu u dna zkumavky hustý mléčně zbarvený zákal.

5.4 Izolace bakteriální DNA

5.4.1 Lyze buněk, izolace a purifikace bakteriální DNA

(modifikace metody dle Prodělalová [32])

1. Z kultury narostlé v MRS médiu bylo odpipetováno 1,5 ml do eppendorfkových zkumavek a centrifugováno 5 minut při 3500 ot./min.
2. Po odstranění supernatantu byl pelet dvakrát promyt fyziologickým roztokem a zcentrifugován 5 minut při 3500 ot./min.
3. Pelet byl resuspendován v 500 µl lyzačního roztoku se sacharózou.
4. Následně bylo přidáno 10 µl čerstvě připraveného lysozymu (koncentrace 50 mg/ml). Při teplotě 37 °C byla inkubace prodloužena přes noc.
5. Bylo přidáno 100 µl 20 % SDS, promícháno a inkubováno při teplotě 55 °C 30 minut.
6. Bylo přidáno 5 µl proteinázy K (koncentrace 1 mg/ml), promícháno a inkubováno při teplotě 55 °C 1 hodinu.
7. Byl přidán stejný objem fenolu a vše bylo promícháno 4 minuty plynulým kývavým pohybem a zcentrifugováno 5 minut při 3500 ot./min. Horní vodná fáze s DNA byla opatrně odebrána do čisté zkumavky. Nesmí být odebrána proteinová mezivrstva.
8. Byl přidán stejný objem směsi fenol – chloroform, promícháno 4 minuty plynulým kývavým pohybem a zcentrifugováno 5 minut při 3500 ot./min. Horní vodná fáze s DNA byla opatrně odebrána do čisté zkumavky. Nesmí být odebrána proteinová mezivrstva.
9. Byl přidán stejný objem CIZ a směs byla promíchána 4 minuty plynulým kývavým pohybem a zcentrifugována 5 minut při 3500 ot./min. Horní vodná fáze s DNA byla opatrně odebrána do čisté zkumavky. Nesmí být odebrána proteinová mezivrstva.

10. Horní fáze s DNA byla odebrána do mikrozkušavky o objemu 1,5 ml. Byla přidána 1/10 objemu 3 M octanu sodného a 2,5 objemu na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ vychlazeného 96 % etanolu. Následně byla provedena inkubace přes noc při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
11. Byla provedena centrifugace při 10 000 ot./min po dobu 30 minut při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
12. Byl odstraněn supernatant. DNA byla vysušena a rozpuštěna v 50 – 100 μl TE pufru. DNA je možné krátkodobě uchovávat při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dlouhodobě je vhodné uchování v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.5 Amplifikace DNA

DNA amplifikační reakce byly provedeny v termocykleru DNA Engine PTC – 225 Bio – Rad Thermal Cycler v celkovém objemu amplifikační směsi 15 μl . Jednotlivé komponenty PCR amplifikační reakce (MgCl_2 a Fast start Master Mix) byly poskytnuty firmou Roche Diagnostics, Praha, ČR a použité primery (PALA 4 a PALA 14) byly syntetizovány firmou KRD molecular technologies, Praha, ČR. Pro provádění reakce byly amplifikační směsi připravovány ve formě master mixů.

5.5.1 Polymerázová řetězová reakce s primery PALA 4 a PALA 14

Použité primery – PALA 4 (5'-CTTCAACAGACAAGTCC-3') a PALA 14 (5'-GATAAATGATTCCAAGC-3') byly odvozeny od sekvence *acmA* genu, který kóduje enzym N-acetylmuramidázu. Tento enzym je specifický pro druh *Lactococcus lactis*. Po provedení PCR s primery PALA 4 a PALA 14 byl u tohoto druhu s pomocí agarózové gelové elektroforézy detekován fragment, jehož délka byla 1 131 bp [33].

Amplifikační reakce byla provedena za těchto podmínek: Počáteční denaturace při teplotě $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 minut následovaná 30 cykly denaturace při teplotě $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 minuty, annealingu při teplotě $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 minuty a syntézy při teplotě $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 2 minut. V posledním cyklu programu byl krok syntézy prodloužen na 7 minut.

Tabulka 4: Složení amplifikační směsi pro PCR s použitím primerů PALA 4 a PALA 14

Složka PCR směsi	Objem
H ₂ O	5,6 µl
Fast start Master Mix	7,5 µl
Primer Pala 4 (0,01Nm)	0,3 µl
Primer Pala 14 (0,01Nm)	0,3 µl
MgCl ₂	0,3 µl
Templátová DNA	1,0 µl

5.5.2 Náhodně amplifikovaná polymorfní DNA (RAPD)

Pro RAPD typizaci bylo použito šest primerů (P16, P17, P2, Per1, CC1 a CORR1) o délce 10 nukleotidů, jejichž přesná charakteristika je uvedena v tabulce 5. MgCl₂ a dNTP pro RAPD typizaci byly dodány firmou Roche Diagnostics, Praha, ČR, Taq pufr a Taq DNA polymeráza byly získány od firmy BioLabs, New England, UK, použité primery byly poskytnuty firmou KRD molecular technologies, Praha, ČR.

Tabulka 5: Charakteristika použitých RAPD primerů [2], [34], [35], [36].

Název	Sekvence	Zdroj
P16	5'-TCGCCAGCCA-3'	Samaržija a kol., 2002
P17	5'-CAGACAAGCC-3'	Samaržija a kol., 2002
P2	5'-GATCGGACGG-3'	Samaržija a kol., 2002
Per1	5'-AAGAGCCCGT-3'	Peréz a kol., 2002
CC1	5'-AGCAGCGTGG-3'	Cocconcelli a kol., 1995
CORR1	5'-TGCTCTGCCC-3'	Corrorel a kol., 1999

Amplifikační reakce byla provedena za těchto podmínek: počáteční denaturace 94 °C/4 min, následovaná 35 cykly denaturace při teplotě 94 °C po dobu jedné minuty, annealingem při teplotě 37 °C po dobu jedné minuty a syntézou při teplotě 72 °C po dobu dvou minut. V posledním cyklu programu byl krok syntézy prodloužen na 7 minut. Konkrétní složení amplifikační směsi po optimalizaci zobrazuje následující tabulka.

Tabulka 6: Složení amplifikační směsi pro RAPD

Složka RAPD směsi	Objem
H ₂ O	10,0 µl
Taq pufr	1,5 µl
MgCl ₂	1,0 µl
dNTP	0,3 µl
RAPD primer (1 µg/µl)	1,0 µl
Taq DNA polymeráza	0,6 µl
Templátová DNA	0,6 µl

5.6 Agarózová gelová elektroforéza

Agarózová gelová elektroforéza byla využita jednak k ověření přítomnosti a kvality vyzolované DNA, jednak k detekci RAPD produktů.

5.6.1 Příprava agarózového gelu

Pro přípravu 1 % agarózového gelu bylo odvážené množství agarózy (Cambrex – Bio, Rockland, USA) do příslušného objemu (dle velikosti použité vany) 0,5x TBE pufru. Vzniklá směs byla za občasného míchání rozpuštěna v mikrovlnné troubě, proces promíchání je nutné opakovat alespoň třikrát. Doba zahřívání je různá, a to v závislosti na použitém objemu, výkonu mikrovlnné trouby a také dané koncentraci agarózy. Při správném rozpuštění se v roztoku ani na stěnách nádoby nesmí vyskytovat krystalky. Takto připravený roztok agarózy byl samovolně zchlazen na teplotu přibližně 50 – 55 °C. Poté bylo k roztoku přidáno dané množství etidiumbromidu a roztok byl nalit do připravené elektroforetické vaničky s připraveným hřebenem. Hotový polymerizovaný gel je možné při teplotě 4 °C krátkodobě přechovávat v polyethylenové fólii.

5.6.2 Nanášení vzorku a průběh agarózové gelové elektroforézy

Příprava vzorků k jejich nanesení na agarózový gel spočívala ve smíchání daného množství DNA nebo PCR či RAPD produktu s nanášecím pufrům. Ke zhodnocení přítomnosti DNA byly vzorky nanášeny na gel v celkovém objemu 15 µl (5 µl DNA, 5 µl sterilní destilované vody a 5 µl nanášecího pufru).

Ke zhodnocení RAPD produktu byly vzorky nanášeny v celkovém objemu 20 μ l (15 μ l RAPD produktu a 5 μ l nanášecího pufu), a to vždy ve směru zleva doprava, přičemž do první jamky bylo nanášeno 15 μ l 100 bp markeru. V elektroforetické vaně byl agarózový gel zalit 0,5x TBE pufrem.

Elektroforéza byla provedena v elektroforetické vaně Owl (Portsmouth, USA) s použitím zdroje elektrického proudu MP – 300 N (Major Science, USA) při konstantním napětí 100 V. Ostatní veličiny byly nastaveny tak, aby nebyly pro průběh elektroforézy limitující. Separace probíhala tak dlouho, dokud bromfenolová modř obsažená v nanášecím pufu nedoputovala do $\frac{2}{3}$ až $\frac{3}{4}$ gelu. Obarvený gel byl prohlížen na transiluminátoru ULTRA LUM (USA) a pro dokumentaci byl vyfotografován fotoaparátem Canon Power Shot G6 s UV filtrem.

5.6.3 Hodnocení gelů

Digitalizované fotografie byly zpracovány pomocí analytického softwaru ULTRA QUANT, verze 6.0 (Ultra Lum.Inc. Clavermount, USA). K výpočtu velikostí frakcí DNA byl použit 100 bp DNA marker s fragmenty DNA o velikosti (bp): 1 517, 1 200, 1 000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100. Při elektroforéze izolované DNA byl použit 1 kb marker s fragmenty o velikosti (kb): 10,0; 8,0; 6,0; 5,0; 4,0; 3,0; 2,0; 1,5; 1,0; 0,5.

Analyzované gely byly statisticky vyhodnoceny metodou shlukové analýzy (průměry mezi skupinami, Euklidovské vzdálenosti) v programu Unistat, v.5.5., pomocí které byly sestrojeny dendrogramy.

6 VÝSLEDKY

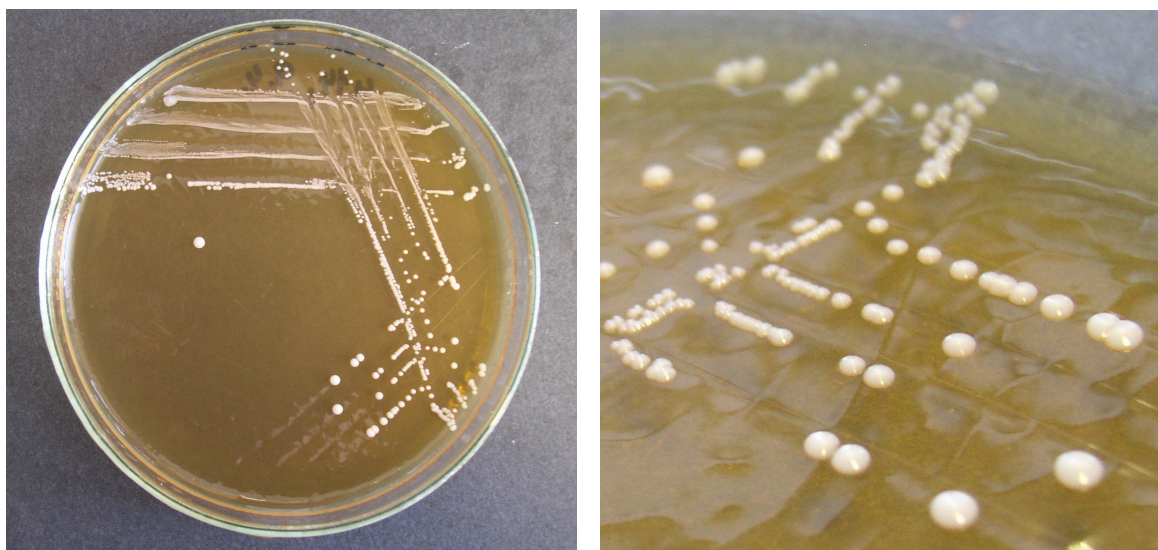
6.1 Kultivace, morfologická a mikroskopická charakteristika

Lactococcus lactis

Po proběhlé 48 hodinové kultivaci při teplotě 30 °C vytvářely buňky v MRS bujónu s 0,5 % glukózy u dna zkumavky hustý mléčně zbarvený zákal. Kultury, které narostly v MRS médiu s 0,5 % glukózy byly křížovým roztěrem naočkovány na MRS agar s 0,5 % glukózy a kultivovány při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin (obrázek 5).

Morfologie studovaných kmenů laktokoků byla provedena vizuálně a vzhled kolonií byl zaznamenán do tabulky. Pro mikroskopickou charakteristiku byl z narostlé kultury připraven preparát barvený podle Grama, který byl prohlížen pod mikroskopem s použitím imerzního objektivu při zvětšení 1000x (tabulka 7).

Obrázek 5: Kmen *L. lactis* subsp. *lactis* 414 po 48 h kultivaci na M17 při 30 °C



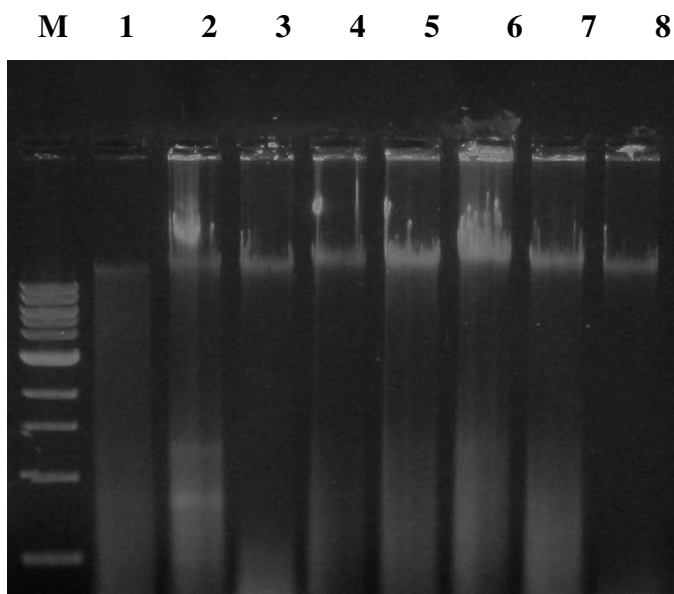
Tabulka 7: Morfologie kolonií a buněk studovaných kmenů laktokoků

Kmen	Morfologie kolonií	Morfologie buněk
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 48	hladké, vypouklé, lesklé, krémové, 1,5 mm	G+ koky, dvojice, řetízky
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 53	hladké, vypouklé, lesklé, bílé, 1,5 mm	G+ koky, krátké řetízky
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 141	hladké, vypouklé, lesklé, krémové, 1 mm	G+ ovoidní koky, dvojice, řetízky
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 354	hladké, vypouklé, lesklé, krémové, 1 mm	G+ ovoidní koky, dvojice, řetízky
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 412	hladké, vypouklé, lesklé, krémové, 1 mm	G+ ovoidní koky, krátké řetízky
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 414	hladké, vypouklé, lesklé, krémové, 1 mm	G+ ovoidní koky, dvojice, řetízky
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 418	hladké, vypouklé, lesklé, krémové, 1,5 mm	G+ ovoidní koky, dvojice, řetízky
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 421	hladké, vypouklé, lesklé, bílé, 1 mm	G+ koky, dvojice, řetízky
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824	hladké, vypouklé, lesklé, krémové, 1 mm	G+ ovoidní koky, dvojice, řetízky
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 885	hladké, vypouklé, lesklé, krémové, 1 mm	G+ koky, dvojice, řetízky
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 890	hladké, vypouklé, lesklé, krémové, 1 mm	G+ ovoidní koky, dvojice, řetízky
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 946	hladké, vypouklé, lesklé, bílé, 1 mm	G+ ovoidní koky, dvojice, řetízky
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 1004	hladké, vypouklé, lesklé, krémové, 1,5 mm	G+ koky, řetízky
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 1005	hladké, vypouklé, lesklé, krémové, 1 mm	G+ koky, dvojice, řetízky
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> CCDM 823	hladké, vypouklé, lesklé, bílé, 1,5 mm	G+ ovoidní koky, dvojice, řetízky
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> CCDM 1006	hladké, vypouklé, lesklé, krémové, 1 mm	G+ ovoidní koky, dvojice, řetízky

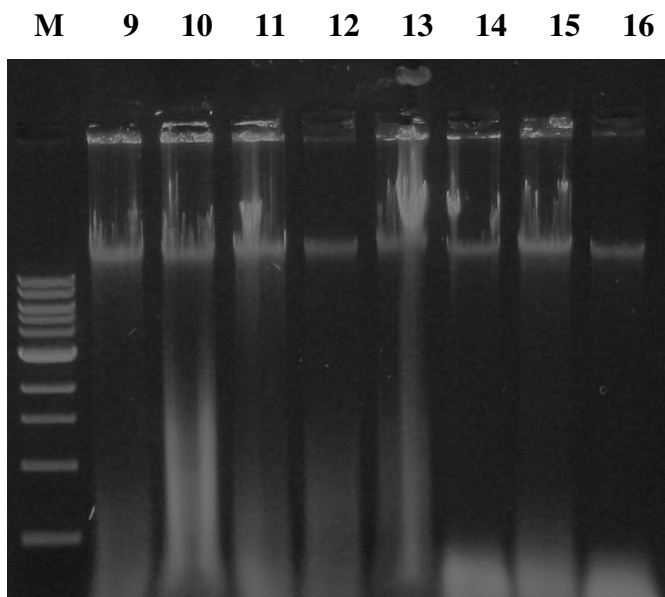
6.2 Izolace bakteriální DNA

K ověření přítomnosti a kvality bakteriální DNA získané fenol – chloroformovou extrakcí byly použity všechny studované kmeny laktokoků (*L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48, *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 53, *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 141, *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 354, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 823, *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 412, *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 414, *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 418, *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 421, *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 885, *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 890, *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1004, *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1005, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 1006). Intaktnost DNA byla ověřena gelovou elektroforézou na 0,8 % agarózovém gelu. DNA byla na gel nanášena v množství 5 μ l.

Obrázek 6: Agarózová gelová elektroforéza: Ověření přítomnosti a intaktnosti DNA



M 1 kb marker, **1.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48, **2.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 53, **3.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 141, **4.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 354, **5.** *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 823, **6.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 412, **7.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 414, **8.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 418.

Obrázek 7: Agarózová gelová elektroforéza: Ověření přítomnosti a intaktnosti DNA

M 1 kb marker, **9.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 421, **10.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, **11.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 885, **12.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 890, **13.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, **14.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1004, **15.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1005, **16.** *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 1006.

Z obrázků 6 a 7 je patrné, že DNA je neporušená a vyzolovaná v dostatečné koncentraci. Lze ji tudíž použít k PCR a RAPD – typizaci testovaných kmenů.

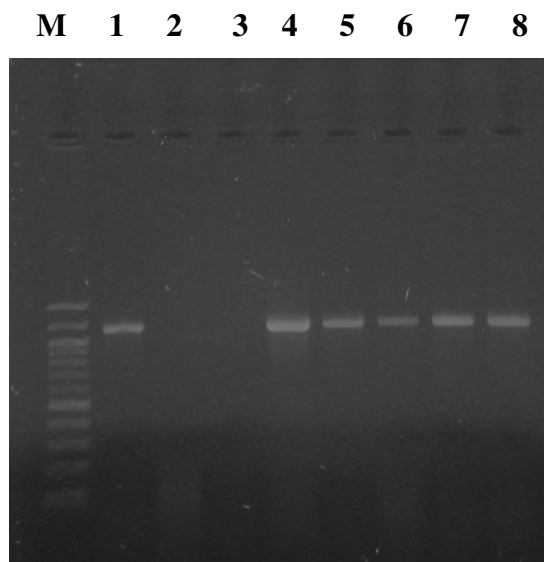
6.3 PCR s primery PALA 4 a PALA 14

Izolovaná DNA byla podrobena PCR s párem primerů PALA 4 a PALA 14. Nejprve byla provedena optimalizace složení PCR směsi, jak uvádí tabulka 8. Po provedení agarózové gelové elektroforézy byl detekován amplifikovaný fragment o velikosti přibližně 1 131 bp (obrázek 8), čímž byla ověřena vhodnost získané DNA pro použití v PCR.

Tabulka 8: Složení PCR směsí a přítomnost PCR produktů

Reagencie	Experiment							
	1. [μ l]	2. [μ l]	3. [μ l]	4. [μ l]	5. [μ l]	6. [μ l]	7. [μ l]	8. [μ l]
H ₂ O	11,5	11,1	11,2	10,8	6,3	5,9	6,0	5,6
Pufr pro Taq polymerázu	1,5	1,5	1,5	1,5	-	-	-	-
dNTP	0,6	0,6	0,6	0,6	-	-	-	-
Primery (PALA 4 a PALA14)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Taq polymeráza	0,2	0,2	0,2	0,2	-	-	-	-
Fast start Master Mix	-	-	-	-	7,5	7,5	7,5	7,5
MgCl ₂	-	-	0,3	0,3	-	-	0,3	0,3
DNA	0,6	1,0	0,6	1,0	0,6	1,0	0,6	1,0
Přítomnost PCR produktu	+	-	-	+	+	+	+	+

Obrázek 8: Agarózová gelová elektroforéza: Optimalizace složení PCR směsi

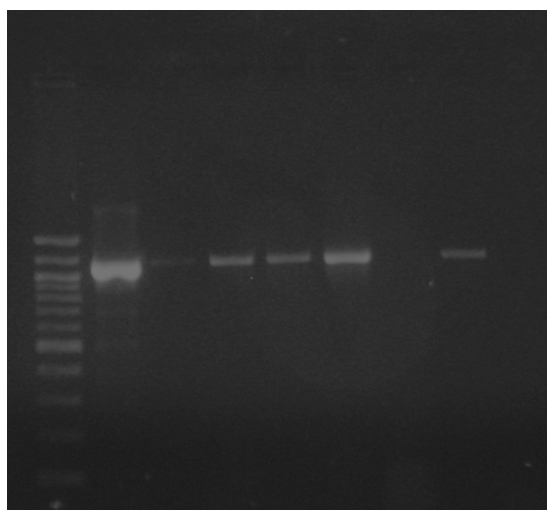


M 1 kb marker, Optimalizace Master Mixu byla provedena s kmenem *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946. **1.** PCR směs č.1, **2.** PCR směs č.2, **3.** PCR směs č.3, **4.** PCR směs č.4, **5.** PCR směs č.5, **6.** PCR směs č.6, **7.** PCR směs č.7, **8.** PCR směs č.8.

Pro další PCR reakce byla vybrána amplifikační směs č.8, která se jevila jako optimální. S touto amplifikační směsí byla za použití primerů PALA 4 a PALA 14 provedena PCR s kmeny laktokoků, kterou zobrazuje obrázek 9. U všech testovaných kmenů byl detekován produkt charakteristický pro *L. lactis*.

Obrázek 9: Agarózová gelová elektroforéza: PCR s primery PALA 4 a PALA 14

M 1 2 3 4 5 6 7 K



M 1 kb marker **1.** *L. lactis* subsp. *lactis* 48, **2.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 53, **3.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 141, **4.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 418, **5.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, **6.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1004, **7.** *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 1006. **K** kontrola bez DNA.

6.4 Charakteristika kmenů pomocí RAPD typizace

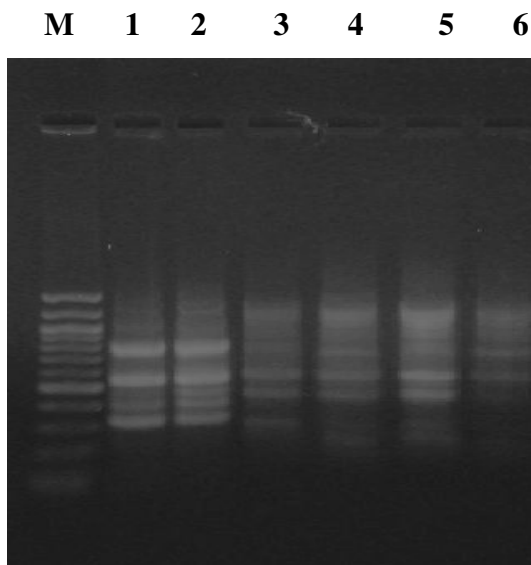
Se všemi studovanými kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* byla provedena RAPD typizace za použití šesti různých RAPD primerů (CC1, P16, P17, P2, CORR1 a Per1). Získané RAPD profily byly použity k sestrojení dendogramu pomocí metody shlukové analýzy v programu Unistat 5.5.

Po ověření přítomnosti vyizolované DNA byla nejprve provedena optimalizace složení RAPD směsi, zejména koncentrací $MgCl_2$ a primerů. Optimalizaci provedenou s kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 53 znázorňuje obrázek 10. Složení jednotlivých amplifikačních směsí je uvedeno v tabulce 9.

Tabulka 9: Optimalizace složení reakční směsi pro RAPD.

Reagencie	Experiment					
	1. [μ l]	2. [μ l]	3. [μ l]	4. [μ l]	5. [μ l]	6. [μ l]
H ₂ O	9,0	10,0	10,4	10,1	9,8	9,5
Pufr pro Taq polymerázu	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
dNTP	0,3	0,3	0,6	0,6	0,6	0,6
Primery	1,5	1,0	0,6	0,6	0,6	0,6
Taq polymeráza	0,6	0,6	0,1	0,1	0,1	0,1
MgCl ₂	1,5	1,0	1,2	1,5	1,8	2,1
DNA	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Přítomnost RAPD produktu	+	+	+	+	+	+

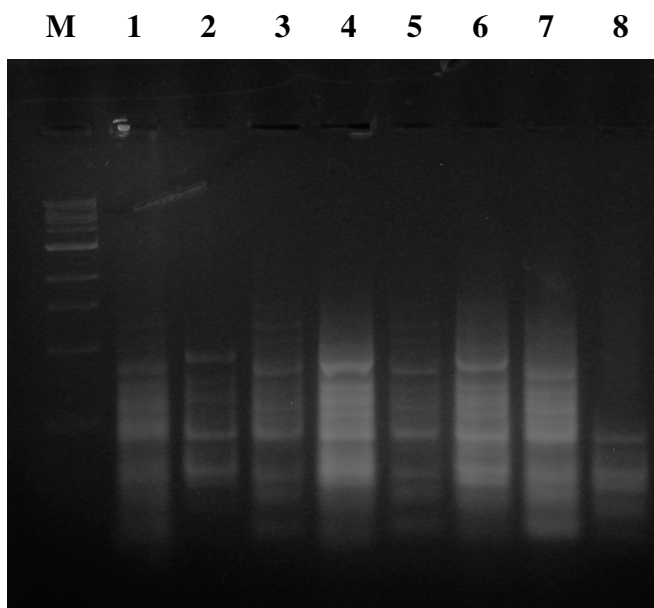
Obrázek 10: Agarózová gelová elektroforéza: Optimalizace složení reakční směsi pro RAPD



M 100 bp ladder, Optimalizace MgCl₂ byla provedena s kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 53. **1.** RAPD směs č.1, **2.** RAPD směs č.2, **3.** RAPD směs č.3, **4.** RAPD směs č.4, **5.** RAPD směs č.5, **6.** RAPD směs č.6.

Pro další RAPD reakce byly vybrány amplifikační směsi č. 1 a 2. K ověření jejich vhodnosti k RAPD typizaci byly náhodně vybrány primery CC1 a P16 a kmeny *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 418 a *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 1006 (obrázek 11).

Obrázek 11: Agarózová gelová elektroforéza: RAPD s primery CC1 a P16



M 100 bp marker, **1.** Amplifikační směs č.1 s primerem CC1 a kmenem *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 418, **2.** amplifikační směs č.1 s primerem CC1 a kmenem *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 1006, **3.** amplifikační směs č.2 s primerem CC1 a kmenem *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 418, **4.** amplifikační směs č.2 s primerem CC1 a kmenem *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 1006, **5.** amplifikační směs č.1 s primerem P16 a kmenem *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 418, **6.** amplifikační směs č.1 s primerem P16 a kmenem *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 1006, **7.** amplifikační směs č.2 s primerem P16 a kmenem *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 418, **8.** amplifikační směs č.2 s primerem P16 a kmenem *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 1006.

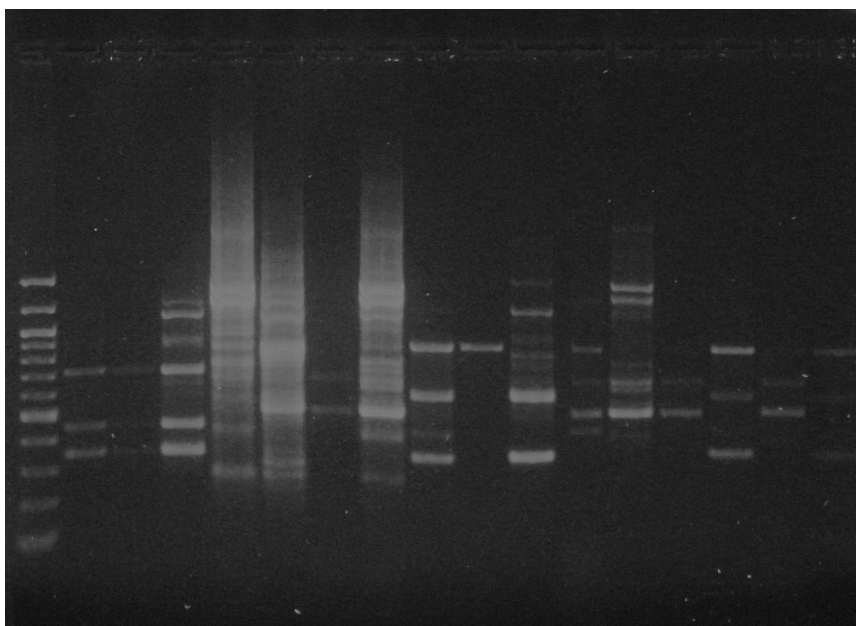
6.4.1 RAPD typizace s primerem CC1

Profil DNA produktů, které byly získány pomocí metody RAPD s použitím primeru CC1 5'-AGCAGCGTGG-3' znázorňuje obrázek 12. Pomocí počítačového programu ULTRA QUANT, verze 6.0 byly s využitím DNA markerů vypočteny velikosti amplifikovaných DNA proužků.

Velikosti získaných DNA produktů jsou shrnuty v tabulkách 10 a 11, ze kterých je patrné, že při použití primeru CC1 bylo syntetizováno nejméně 2 a nejvíce 12 DNA produktů, jejichž velikosti se pohybovaly v rozmezí 266 – 2 320 bp.

Obrázek 12: Agarózová gelová elektroforéza: RAPD s primerem CC1

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



M 100 bp marker, **1.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48, **2.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 53, **3.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 141, **4.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 354, **5.** *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 823, **6.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 412, **7.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 414, **8.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 418, **9.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 421, **10.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, **11.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 885, **12.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 890, **13.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, **14.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1004, **15.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1005, **16.** *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 1006.

U kmene *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 se vytvořily 3 DNA produkty o velikostech 355 bp, 455 bp a 721 bp. 3 DNA produkty se rovněž vytvořily u kmenů: *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 53 (366 – 728 bp), *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1004 (347 – 860 bp) a *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 1006 (337 – 822 bp).

Pouze 2 DNA produkty byly syntetizovány u následujících kmenů: *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 412 o velikostech 505 a 685 bp, *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 421 o velikostech 594 a 860 bp, *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 o velikostech 505 a 667 bp a *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1005 o velikostech 522 a 661 bp. U kmene *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 bylo detekováno 6 DNA produktů (370 – 1 254 bp), u kmenů *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 354 (296 – 2 210 bp) a *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 823 (283 – 2 210 bp) bylo souhlasně pozorováno 10 DNA produktů. U kmene *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 418 byly syntetizovány 4 DNA produkty o velikostech 347, 415, 627 a 868 bp, u kmene *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 9 DNA produktů o velikostech v rozmezí 337 – 2 146 bp, u kmene *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 885 5 DNA produktů o velikostech 419, 495, 661, 845 a 1 266 bp. U kmene *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 890 bylo vizualizováno 9 DNA produktů o velikostech 411, 505, 633, 667, 760, 1 108, 1 291, 1 438 a 2 320 bp. U posledně zmíněného kmene *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 890 byl získán největší DNA produkt o velikosti asi 2 320 bp. U kmene *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 414 bylo vytvořen největší počet DNA produktů, a to 12, jejichž velikost se pohybovala v rozmezí 266 – 2 231 bp. U kmenů *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 354 a *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 414 byly narozdíl od ostatních kmenů shodně vytvořeny fragmenty o velikosti 1 279 a 876 bp.

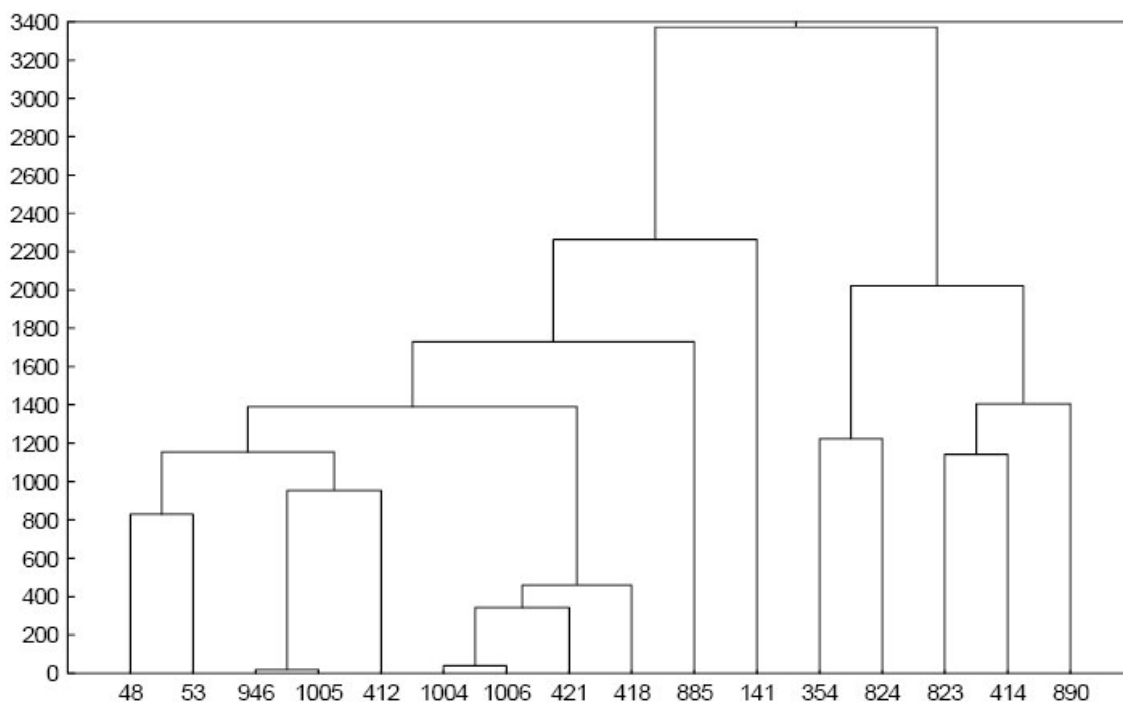
Tabulka 10: Velikosti fragmentů DNA *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* v bp získané RAPD s použitím primeru CC1

		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>					
Kmen		824	885	890	946	1004	1005
Velikosti fragmentů (bp)	2146		1266	2320	667	860	661
	1480		845	1438	505	594	522
	1183		661	1291		347	
	909		495	1108			
	822		419	760			
	728			667			
	667			633			
	587			505			
	337			411			

Tabulka 11: Velikosti fragmentů DNA *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* v bp získané metodou RAPD s použitím primeru CC1.

	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>								<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	
Kmen	48	53	141	354	412	414	418	421	823	1006
Velikosti fragmentů (bp)	721	728	1254	2210	685	2231	868	860	2210	822
	455	470	1151	1410	505	1396	627	594	1343	587
	355	366	926	1279		1279	415		1218	337
			721	972		1098	347		1068	
			465	876		876			807	
			370	786		793			740	
				709		728			661	
				581		691			516	
				455		655			323	
				296		522			283	
						419				
						266				

Obrázek 13: Dendrogram vytvořený z RAPD profilu studovaných kmenů laktokoků s primerem CC1



Na obrázku 13 je uveden dendrogram, který zobrazuje profil DNA fragmentů získaných metodou RAPD s použitím primeru CC1. Z dendrogramu je patrné, že se vytvořily 2 skupiny. První skupina je tvořena 11 kmeny laktokoků, druhá zbývajícími 5 kmeny. V první skupině je patrná tvorba dvou podskupin obsahujících 5, respektive 4 kmeny bakterií a rovněž to, že kmeny CCDM 885 (*L. lactis* subsp. *cremoris*) a CCDM 141 (*L. lactis* subsp. *lactis*) nebyly přiřazeny ani k jedné z podskupin. Z dendrogramu je rovněž patrné, že RAPD profil získaný s primerem CC1 je téměř shodný u 2 kmenů *L. lactis* subsp. *cremoris* (CCDM 946 a CCDM 1005) a rovněž u dalších dvou kmenů (CCDM 1004 a CCDM 1006), které však náleží do různých poddruhů *L. lactis*. Podobný RAPD profil jako kmeny CCDM 1004 a CCDM 1006 mají i kmeny CCDM 418 a CCDM 421 patřící k poddruhu *L. lactis* subsp. *lactis*. Do první podskupiny byly kromě kmenů CCDM 946 a CCDM 1005 přiřazeny ještě 3 kmeny *L. lactis* subsp. *lactis* (CCDM 48, CCDM 53 a CCDM 412). Ve druhé skupině jsou patrné větší rozdíly mezi RAPD profily získanými s primerem CC1. Do této skupiny byly přiřazeny jak kmeny *L. lactis* subsp. *lactis* (CCDM 354, CCDM 414 a CCDM 823), tak i kmeny *L. lactis* subsp. *cremoris* (CCDM 824 a CCDM 890).

6.4.2 RAPD typizace s primerem P16

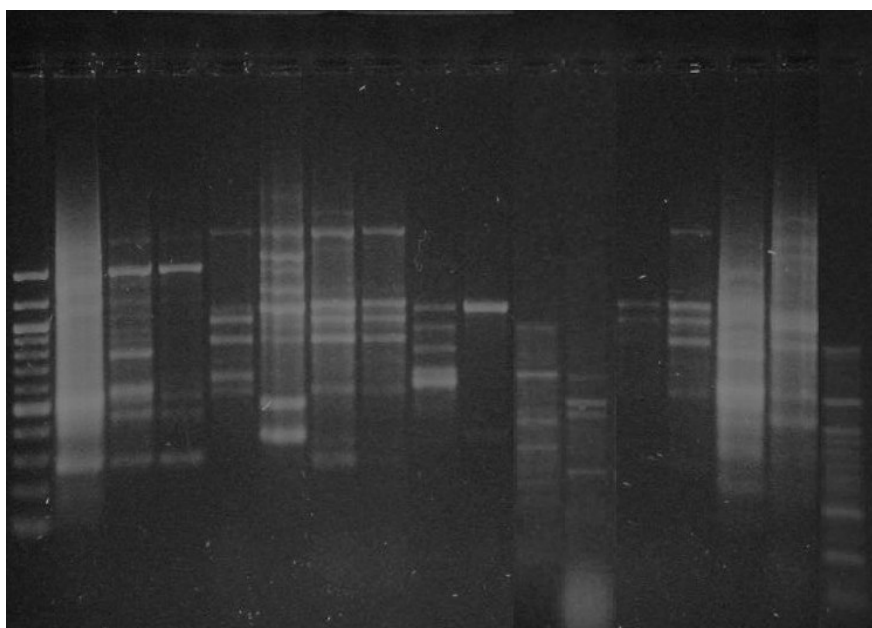
Profil DNA produktů, které byly získány pomocí metody RAPD s použitím primeru P16 5'-TCGCCAGCCA-3' znázorňuje obrázek 14. Pomocí počítačového programu ULTRA QUANT, verze 6.0 byly s využitím DNA markerů vypočteny velikosti amplifikovaných DNA produktů, jejichž velikosti jsou uvedeny v tabulkách 12 a 13. Z tabulek vyplývá, že při použití primeru P16 bylo syntetizováno nejméně 2 a nejvíce 11 DNA produktů, jejichž velikosti se pohybovaly v rozmezí 155 – 3 328 bp.

U kmene *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 se vytvořilo 8 DNA produktů o velikostech 270, 460, 530, 1 129, 1 354, 1 479, 1 722 a 1 930 bp. 10 DNA produktů se vytvořilo u kmenů: *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 53, jejichž velikosti byly 290, 454, 560, 757, 862, 929, 1 117, 1 208, 1 556 a 2 219 bp a *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 823 o následujících velikostech 383, 519, 862, 959, 1 092, 1 320, 1 556, 1 789, 2 364 a 3 328 bp.

5 DNA fragmentů bylo detekováno u kmenů *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 (300 – 2 247 bp), *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 414 (584 – 2 364 bp), *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 418 (629 – 1 129 bp), *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 885 (298 – 963 bp) a *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 (578 – 2 455 bp).

Obrázek 14: Agarózová gelová elektroforéza: RAPD s primerem P16

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



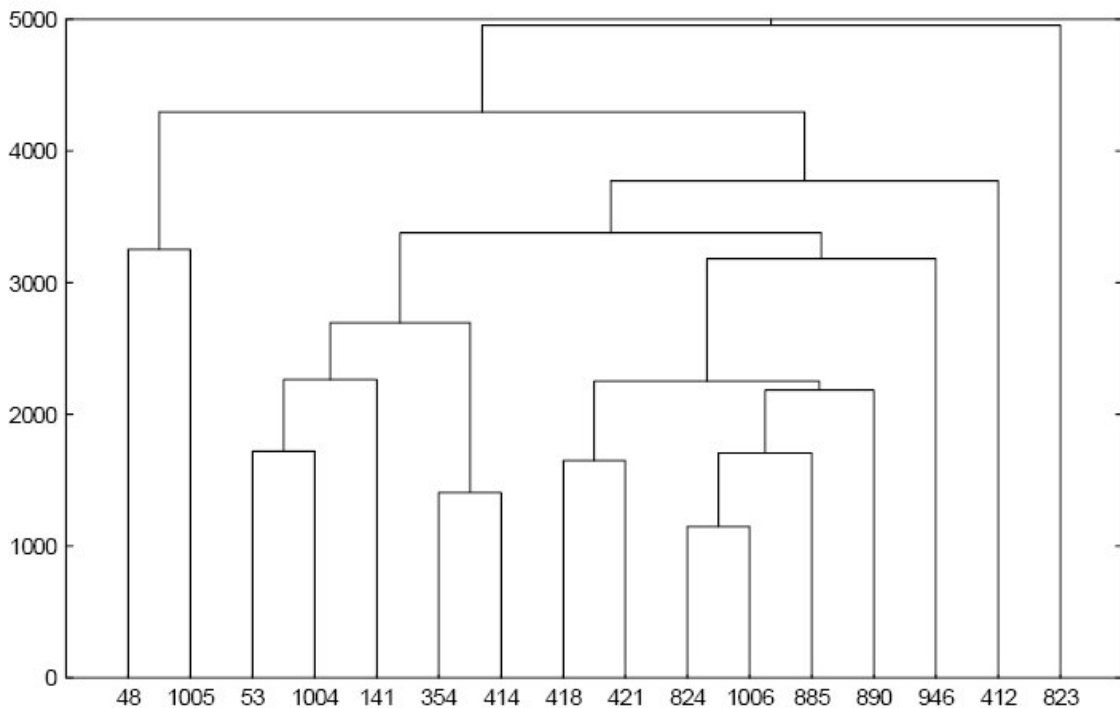
M 100 bp marker, **1.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48, **2.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 53, **3.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 141, **4.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 354, **5.** *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 823, **6.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 412, **7.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 414, **8.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 418, **9.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 421, **10.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, **11.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 885, **12.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 890, **13.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, **14.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1004, **15.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1005, **16.** *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 1006.

Shodně, po 6 DNA produktech, bylo vizualizováno u kmenů *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 354 (584 – 2 334 bp) a *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 (334 – 1 394 bp). U kmene *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 412 vzniklo 7 DNA produktů, jejichž velikost se pohybovala v rozmezí 304 – 2 752 bp. U tohoto kmene a kmene *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 414 byly, narozdíl od ostatních studovaných kmenů, pozorovány DNA fragmenty o shodných velikostech 900 a 1 045 bp.

Tabulka 13: Velikosti fragmentů DNA *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* v bp získané metodou RAPD s použitím primeru P16

	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>					
Kmen	824	885	890	946	1004	1005
Velikosti fragmentů (bp)	1394	963	1180	2455	2191	2616
	963	766	1011	1180	1576	2082
	674	715	881	1057	1193	1858
	537	433	597	872	1057	1596
	414	298		578	910	1069
	334				862	1000
					791	881
					584	560
					536	472
					327	
					212	

Obrázek 15: Dendrogram vytvořený z RAPD profilu studovaných kmenů laktokoků s primerem P16



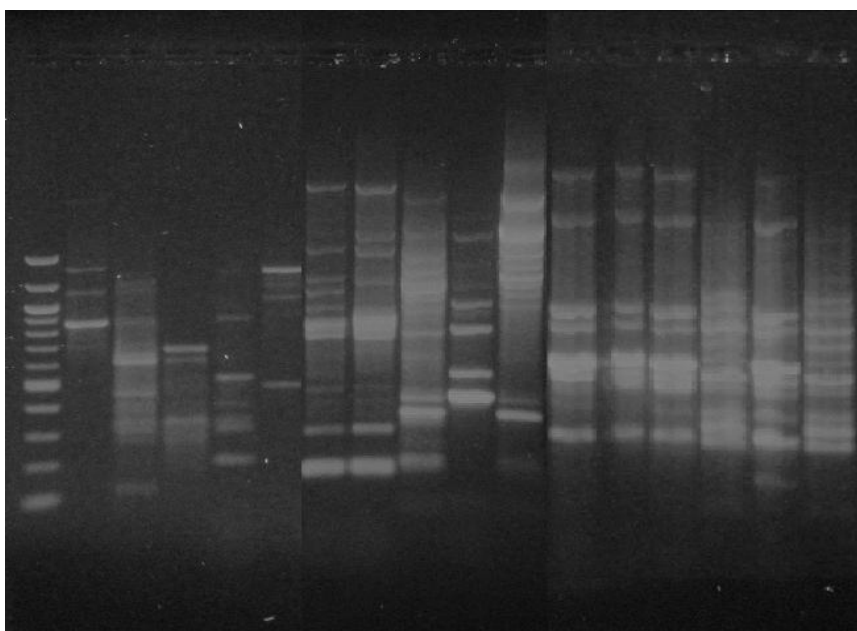
Na obrázku 15 je uveden dendrogram, který zobrazuje profil DNA fragmentů získaných metodou RAPD s použitím primeru P16. Z dendrogramu vyplývá, že se vytvořily 2 skupiny, při čemž ani do jedné nebyl zařazen kmen CCDM 823 (*L. lactis* subsp. *lactis*). První skupina je tvořena pouze 2 kmeny laktokoků, a to CCDM 48 (*L. lactis* subsp. *lactis*) a CCDM 1005 (*L. lactis* subsp. *cremoris*). K druhé skupině je přiřazeno zbývajících 13 kmenů. V rámci druhé skupiny je dále patrná tvorba dvou podskupin obsahujících 5, respektive 7, kmenů bakterií a také to, že kmen CCDM 412 (*L. lactis* subsp. *lactis*) nebyl přiřazen ani k jedné z podskupin. Z dendrogramu rovněž vyplývá, že RAPD profil získaný s primerem P16 je podobný u dvojice kmenů CCDM 354 a CCDM 414 (*L. lactis* subsp. *lactis*) a také u kmenů CCDM 418 a CCDM 421 rovněž patřících k poddruhu *L. lactis* subsp. *lactis*. Určitou podobnost vykazují i dvě dvojice kmenů. CCDM 53 (*L. lactis* subsp. *lactis*) a CCDM 1004 (*L. lactis* subsp. *cremoris*) patří do první podskupiny a CCDM 824 (*L. lactis* subsp. *lactis*) společně s kmenem CCDM 1006 (*L. lactis* subsp. *lactis*), které jsou přiřazeny k podskupině druhé. Tyto kmeny však nepatří do stejných poddruhů. K první podskupině byl také přiřazen kmen CCDM 141 (*L. lactis* subsp. *lactis*). K druhé podskupině byly dále přiřazeny kmeny *L. lactis* subsp. *cremoris* (CCDM 885, CCDM 890 a CCDM 946).

6.4.3 RAPD typizace s primerem P2

Profil DNA produktů, které byly získány pomocí metody RAPD s použitím primeru P2 5'-GATCGGACGG-3' zobrazuje obrázek 16. S využitím DNA markerů byly vypočteny velikosti amplifikovaných DNA produktů, jejichž velikosti jsou uvedeny v tabulkách 14 a 15. Z tabulek je zřejmé, že při použití primeru P2 byly detekovány nejméně 4 a nejvíce 12 DNA produktů, jejichž velikosti se pohybovaly v rozmezí 113 – 3 874 bp.

Obrázek 16: Agarózová gelová elektroforéza: RAPD s primerem P2

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



M 100 bp marker, **1.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48, **2.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 53, **3.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 141, **4.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 354, **5.** *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 823, **6.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 412, **7.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 414, **8.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 418, **9.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 421, **10.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, **11.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 885, **12.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 890, **13.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, **14.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1004, **15.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1005, **16.** *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 1006.

Ze všech provedených RAPD reakcí bylo u RAPD s primerem P2 detekováno největší množství DNA fragmentů. U kmene *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 bylo vizualizováno 5 DNA produktů o velikostech 704, 761, 864, 1 160 a 1 408 bp. Stejně množství fragmentů bylo pozorováno i u kmene *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 823, jejichž velikost byla 506, 967, 1 083, 1 256 a 1 408 bp. 9 DNA produktů se vytvořilo u kmenů *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 (404 – 2 722 bp), *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 (405 – 3 874 bp), *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1005 (372 – 3 463 bp), *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 421 (487 – 1 916 bp) a *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 53 (113 – 1 242 bp). U posledně zmíněného kmene byl, jako u jediného, vytvořen nejmenší fragment o velikosti 113 bp. U kmenů *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 418 (285 – 1 358 bp), *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1004 (372 – 1 324 bp) a *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 1006 (351 – 1245) bylo souhlasně amplifikováno 10 DNA produktů.

Pouze 4 DNA produkty byly detekovány u kmene *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 141. Jejich velikosti byly 295, 351, 614 a 680 bp.

Tabulka 14: Velikosti fragmentů DNA *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* v bp získané metodou RAPD s použitím primeru P2

	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>								<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	
Kmen	48	53	141	354	412	414	418	421	823	1006
Velikosti fragmentů (bp)	1408	1242	680	1330	3603	3540	1358	1916	1408	1245
	1160	1160	614	1071	1983	1916	1244	1506	1256	1125
	864	864	351	925	1670	1628	1096	1402	1083	957
	761	635	295	535	1326	1274	996	1264	967	858
	704	457		423	1061	1168	826	1070	506	756
		390		360	915	915	697	996		670
		333		320	869	847	483	862		593
		304		211	833	805	411	573		470
		113			517	526	374	487		405
					471	471	285			351
					362	371				
					264	247				

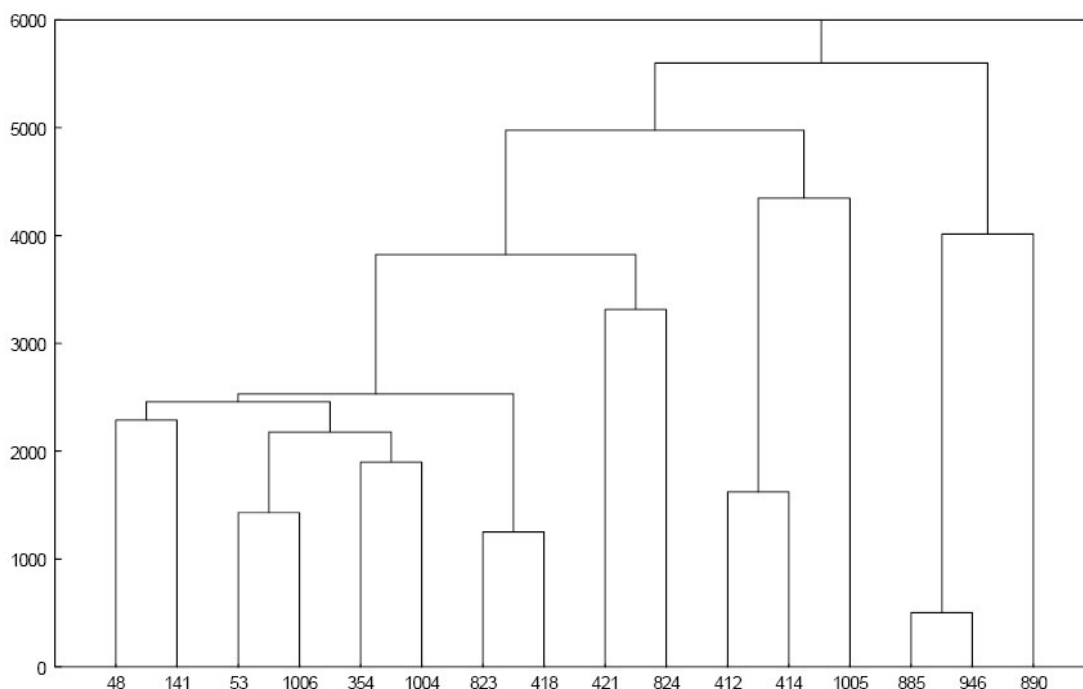
Shodně 8 DNA produktů bylo vizualizováno u následujících kmenů: *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 354 (211 – 1 330 bp), *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 885 (400 – 3 827 bp) a *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 890 (405 – 3 874 bp). U kmenů *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 890 a *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 se, na rozdíl od všech ostatních studovaných kmenů, vytvořil největší fragment o velikosti 3 874 bp. Největší množství DNA produktů, a to 12, bylo pozorováno u kmenů *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 412 a *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 414. U kmene *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 412 byly získány fragmenty v rozmezí velikostí 264 – 3 603 bp a u kmene *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 414 v rozmezí velikostí 247 – 3 540 bp.

Tabulka 15: Velikosti fragmentů DNA *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* v bp získané metodou RAPD s použitím primeru P2

		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>					
Kmen		824	885	890	946	1004	1005
Velikosti fragmentů (bp)		2722	3827	3874	3874	1324	3463
		1983	2547	2611	2516	1187	2395
		1559	1137	1200	1150	1022	1090
		1413	1011	1000	967	895	967
		1295	756	772	748	796	726
		1158	670	718	704	696	670
		1061	607	646	623	623	607
		455	400	405	497	503	464
		404			405	434	372
						372	

Na obrázku 17 je uveden dendrogram, který zobrazuje profil DNA fragmentů získaných metodou RAPD s použitím primeru P2. Z dendrogramu je patrné, že se vytvořily 2 skupiny. První skupina je tvořena 13 kmeny laktokoků, druhá zbývajícími 3 kmeny. V první skupině je patrná tvorba dvou podskupin obsahujících 10, respektive 3 kmeny bakterií. V rámci první podskupiny byla shledána určitá podobnost u kmenů CCDM 53 (*L. lactis* subsp. *lactis*) a CCDM 1006 (*L. lactis* subsp. *lactis*) a u kmenů CCDM 823 (*L. lactis* subsp. *lactis*) a CCDM 418 (*L. lactis* subsp. *lactis*). K této podskupině byly dále přiřazeny jednak kmeny *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48, CCDM 141, CCDM 354, CCDM 824 a CCDM 421, jednak kmeny (*L. lactis* subsp. *cremoris*) CCDM 1004 a CCDM 824. Druhá podskupina se vyznačovala přítomností kmenů *L. lactis* subsp. *lactis* (CCDM 412 a CCDM 414) a jedním kmenem *L. lactis* subsp. *cremoris* (CCDM 1005). V rámci druhé skupiny je patrné přiřazení pouze kmenů *L. lactis* subsp. *cremoris* (CCDM 885, CCDM 946 a CCDM 890), přičemž z dendrogramu vyplývá podobnost RAPD profilu mezi kmeny CCDM 885 a CCDM 946.

Obrázek 17: Dendrogram vytvořený z RAPD profilu studovaných kmenů laktokoků s primerem P2



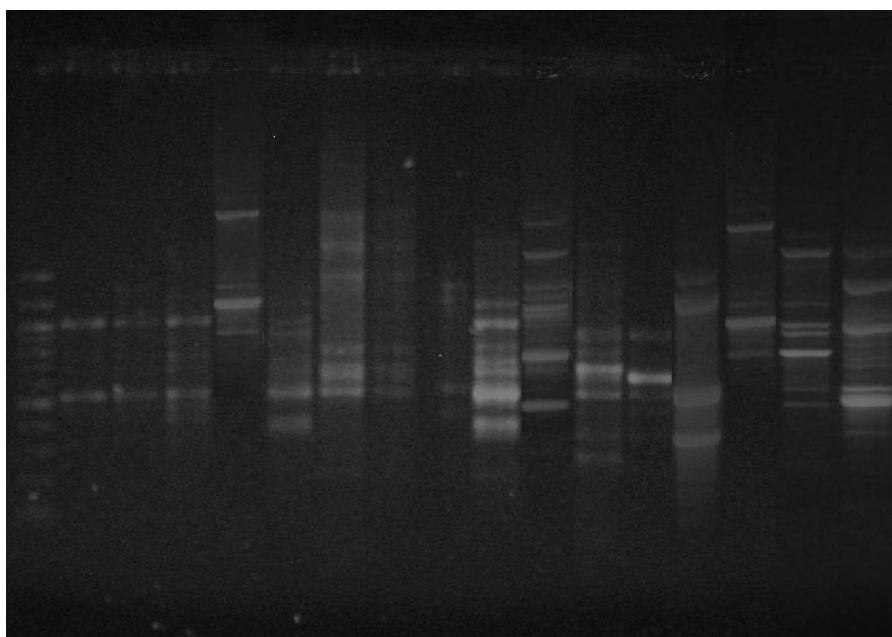
6.4.4 RAPD typizace s primerem P17

Profil DNA produktů, které byly získány pomocí metody RAPD s použitím primeru P17 zobrazuje obrázek 18. Pomocí počítačového programu byly s využitím DNA markerů vypočteny velikosti amplifikovaných DNA produktů, jejichž velikosti jsou uvedeny v tabulkách 16 a 17. Z tabulek je patrné, že při použití primeru P17 byly detekovány nejméně 4 a nejvíce 11 DNA produktů, jejichž velikosti se pohybovaly v rozmezí 239 – 2 728 bp.

Při použití primeru P17 byly u kmenů *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 a *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 53 vizualizovány 4 DNA produkty. U *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 jejich velikosti byly 525, 710, 792 a 1 000 bp a u kmene *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 53 – 541, 718, 784 a 1 031 bp. Stejné množství fragmentů, a to 5, bylo amplifikováno u kmenů *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 354, *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 418 a *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1004. Rozmezí velikostí vzniklých DNA produktů bylo u zmíněných kmenů obdobné a pohybovalo se mezi cca 2 000 – 494 bp.

Obrázek 18: Agarózová gelová elektroforéza: RAPD s primerem P17

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



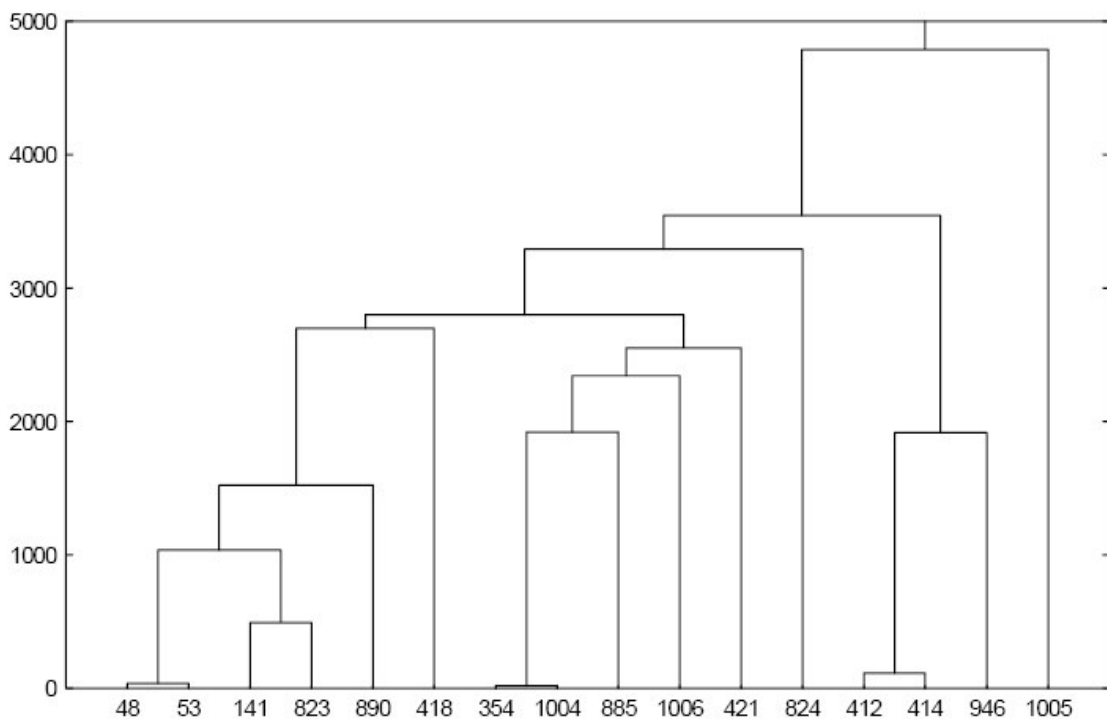
M 100 bp marker, **1.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48, **2.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 53, **3.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 141, **4.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 354, **5.** *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 823, **6.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 412, **7.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 414, **8.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 418, **9.** *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 421, **10.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, **11.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 885, **12.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 890, **13.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, **14.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1004, **15.** *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1005, **16.** *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 1006.

Šest DNA produktů o velikostech 563, 635, 808, 1 524, 1 990 a 2 458 bp bylo detekováno u kmene *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 412. Shodné množství fragmentů bylo pozorováno i u kmenů *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 414 (563, 641, 777, 1 510, 1 935, 2 550 bp), *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 823 (381, 541, 662, 784, 932, 1 020 bp) a *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 890 (239, 367, 470, 552, 648, 923bp). U kmenů *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 412, *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 414 a *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 421 byl, na rozdíl od ostatních studovaných kmenů, zaznamenán vznik fragmentu o velikosti 563 bp.

Tabulka 17: Velikosti fragmentů DNA *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* v bp získané metodou RAPD s použitím primeru P17

		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>					
Kmen		824	885	890	946	1004	1005
Velikosti fragmentů (bp)		2118	1918	923	2401	1993	2728
		1482	914	648	1983	1079	2180
		1104	800	552	1061	996	1888
		1012	689	470	819	807	1409
		854	546	367	662	594	1324
		651	358	239	554		1087
		554	272		359		1021
		350			311		861
							772
							698
							561

Obrázek 19: Dendrogram vytvořený z RAPD profilu studovaných kmenů laktokoků s primerem P17



Na obrázku 19 je uveden dendrogram, který zobrazuje profil DNA fragmentů získaných metodou RAPD s použitím primeru P17. Z dendrogramu je patrné, že se vytvořily 2 skupiny, přičemž kmen CCDM 1005 (*L. lactis* subsp. *cremoris*) nebyl přiřazen ani k jedné z nich. První skupina je tvořena 13 kmeny laktokoků, druhá zbývajícími 3 kmeny. V první skupině je zřejmá tvorba dvou podskupin obsahujících 6, respektive 5 kmenů bakterií, a rovněž to, že kmen CCDM 824 (*L. lactis* subsp. *cremoris*) nebyl přiřazen ani k jedné z podskupin. Z dendrogramu je rovněž patrné, že RAPD profil získaný s primerem P17 je v rámci první skupiny téměř shodný u 2 kmenů *L. lactis* subsp. *lactis* (CCDM 48 a CCDM 53). Shodnost byla také zaznamenána u dvojice kmenů CCDM 354 (*L. lactis* subsp. *lactis*) a CCDM 1004 (*L. lactis* subsp. *cremoris*), které však náleží do různých poddruhů *L. lactis*. Podobný RAPD profil jako kmeny CCDM 48 a CCDM 53 (*L. lactis* subsp. *lactis*) mají i kmeny *L. lactis* subsp. *lactis* (CCDM 141 a CCDM 823). Do první skupiny byly dále přiřazeny 3 kmeny *L. lactis* subsp. *lactis* (CCDM 418, CCDM 421 a CCDM 1006) a 2 kmeny *L. lactis* subsp. *cremoris* (CCDM 890 a CCDM 885). Z dendrogramu je dále zřejmé, že i v rámci druhé skupiny byly získány téměř shodné RAPD profily u dvojice kmenů CCDM 412 a CCDM 414. Oba tyto kmeny patří k poddruhu *L. lactis* subsp. *lactis*. K této skupině byl také přiřazen i kmen CCDM 946 (*L. lactis* subsp. *cremoris*).

6.4.5 RAPD typizace s primerem CORR1

S využitím DNA markerů byly vypočteny velikosti amplifikovaných DNA proužků získaných s primerem CORR1. Velikosti získaných DNA produktů jsou shrnuty v tabulkách 18 a 19, ze kterých je patrné, že při použití primeru CORR1 byly syntetizovány nejméně 2 a nejvíce 13 DNA produktů, jejichž velikosti se pohybovaly v rozmezí 115 – 2 377 bp.

Kmen *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 se vyznačoval jednak největším počtem DNA produktů, a to 13, a jednak vznikem nejmenšího DNA produktu o velikosti 115 bp. Velikosti jednotlivých fragmentů se pohybovaly v rozmezí 115 – 1 554 bp. 12 DNA produktů bylo vizualizováno u kmenů *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 (293 – 2 031 bp) a *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 823 (186 – 1 510 bp).

Shodně po 8 DNA produktech bylo detekováno u následujících kmenů: *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 418 (416 – 1 368 bp), *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 885 (421 – 1 138 bp), *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 (380 – 1 366 bp) a *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1005 (376 – 1 380 bp). U kmene *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 890 bylo zaznamenáno vytvoření 9 DNA produktů, jejichž velikosti se pohybovaly v rozezí 392 – 2 377 bp. U kmenů *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 885 a *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 890 byl na rozdíl od ostatních kmenů pozorován fragment o velikosti přibližně 705 bp. U kmenů *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 412, *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 414 a *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 byla zjištěna přítomnost 6 fragmentů. Jejich velikosti byly následující: *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 412 – 402, 608, 651, 730, 983 a 1 166; *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 414 – 595, 645, 720, 951, 1 110 a 1 439 bp; *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 – 362, 583, 636, 674, 923 a 1 071 bp. U kmene *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 53 bylo pozorováno 11 DNA produktů v rozmezí velikostí 337 – 1 554 bp. U kmene *L. lactis* subsp. *lactis* 421 byly detekovány 4 DNA produkty o velikostech 168, 217, 734 a 1 395 bp. Stejně množství fragmentů se vytvořilo i u kmene *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1004. Jejich velikosti byly 431, 721, 1 083 a 1 473 bp. Pouze 3 DNA produkty byly vizualizovány u kmene *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 354 – 642, 1 010 a 1 871 bp. Nejmenší množství fragmentů, a to 2, (430 a 750 bp) byly vytvořeny u kmene *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 1006.

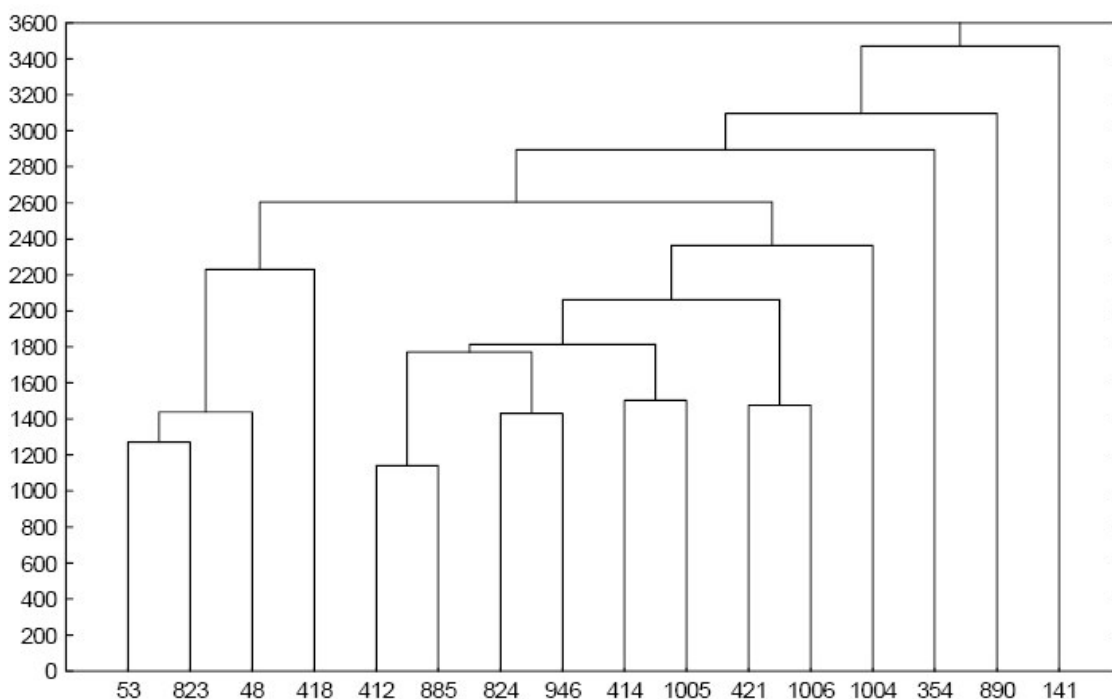
Tabulka 18: Velikosti fragmentů DNA *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* v bp získané metodou RAPD s použitím primeru CORR1

	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>								<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	
Kmen	48	53	141	354	412	414	418	421	823	1006
Velikosti fragmentů (bp)	1554	1554	2031	1871	1166	1439	1368	1395	1510	750
	1410	1396	1737	1010	983	1110	1240	734	1410	430
	1194	1218	1517	642	730	951	1031	217	1279	
	1071	1104	1311		651	720	697	168	1159	
	905	1010	1085		608	645	643		1030	
	700	951	817		402	595	517		951	
	560	667	707				472		693	
	528	533	632				416		600	
	474	488	582						502	
	452	418	529						439	
	330	337	388						326	
	209		293						186	
115										

Tabulka 19: Velikosti fragmentů DNA *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* v bp získané metodou RAPD s použitím primeru CORR1

	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>					
Kmen	824	885	890	946	1004	1005
Velikosti fragmentů (bp)	1071	1138	2377	1366	1473	1380
	923	1006	1338	1098	1083	1145
	674	864	1042	980	721	1021
	636	705	942	734	431	727
	583	636	705	658		671
	362	594	651	607		620
		523	601	416		404
		421	412	380		376
			392			

Obrázek 20: Dendrogram vytvořený z RAPD profilu studovaných kmenů laktokoků s primerem CORR1



Na obrázku 20 je uveden dendrogram, který zobrazuje profil DNA fragmentů získaných metodou RAPD s použitím primeru CORR1. Z dendrogramu je patrné, že se vytvořily 2 skupiny, přičemž kmeny CCDM 354 (*L. lactis* subsp. *lactis*), CCDM 141 (*L. lactis* subsp. *lactis*) a CCDM 890 (*L. lactis* subsp. *cremoris*) nebyly přiřazeny ani k jedné z nich. První skupina je tvořena 4 kmeny laktokoků, v druhé skupině je zastoupeno 9 kmenů. První skupina je tvořena pouze kmeny *L. lactis* subsp. *lactis* a to, CCDM 48, CCDM 53, CCDM 823 a CCDM 418. Ve druhé skupině je patrná tvorba dvou podskupin obsahujících 6, respektive 2, kmeny bakterií a také přítomnost kmene CCDM 1004 (*L. lactis* subsp. *cremoris*), který nebyl přiřazen ani k jedné z podskupin. Při použití primeru CORR1 nebyla u studovaných kmenů zjištěna vzájemná podobnost. U obou skupin jsou patrné větší rozdíly mezi získanými RAPD profily. V rámci druhé skupiny byly přiřazeny jak kmeny *L. lactis* subsp. *lactis* (CCDM 412, CCDM 414, CCDM 421 a CCDM 1006), tak i kmeny *L. lactis* subsp. *cremoris* (CCDM 885, CCDM 824, CCDM 946 a CCDM 1005).

6.4.6 RAPD typizace s primerem PER1

Pomocí počítačového programu byly s využitím DNA markerů vypočteny velikosti amplifikovaných DNA proužků získaných amplifikací s primerem PER1. Velikosti DNA produktů jsou shrnuty v tabulkách 20 a 21.

Tabulka 20: Velikosti fragmentů DNA *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* v bp získané metodou RAPD s použitím primeru PER1

	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>								<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	
Kmen	48	53	141	354	412	414	418	421	823	1006
Velikosti fragmentů (bp)	2170	1989	1306	2007	1834	2257	1748	1791	1177	2576
	1306	1790	1147	1200	1154	1832	1360	1345	1007	1790
	1074	1451	1047	1095	1049	1177	1215	1095	906	1382
	942	1077	849	462	947	1088	1049	546	871	1224
	827	923	700	269	856	883	547	429	718	547
	656	870	655		641	375	511		640	434
	405	760	395		456		452		500	378
	268	658	277		402		382		433	
		620			253				385	
		498			209				287	
		430							213	
		378							158	
	285									

Při použití primeru PER1 byly syntetizovány nejméně 4 a nejvíce 13 DNA produktů, jejichž velikosti se pohybovaly v rozmezí 158 – 2 576 bp. S primerem PER1 bylo u kmenů *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 (268 – 2 170 bp), *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 (277 – 1 306 bp) a *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 418 (382 – 1 748 bp) pozorováno 8 DNA produktů.

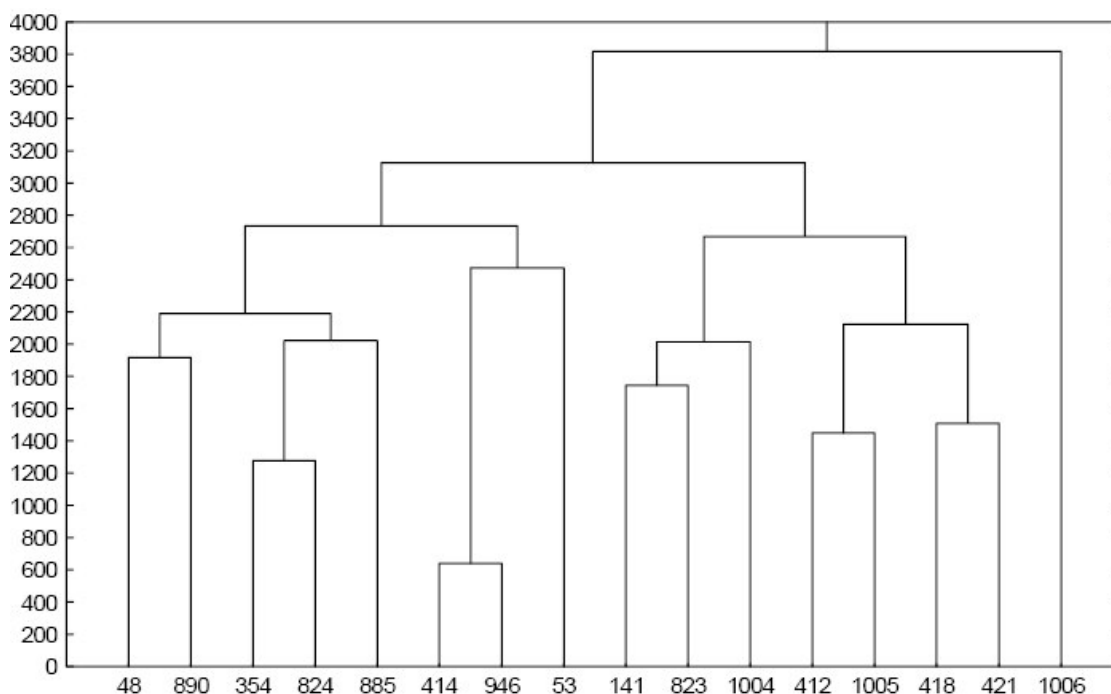
Tabulka 21: Velikosti fragmentů DNA *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* v bp získané metodou RAPD s použitím primeru PER1

	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>					
Kmen	824	885	890	946	1004	1005
Velikosti fragmentů (bp)	2007	2031	2175	2227	1468	1910
	1214	1508	1315	1864	1074	1205
	600	1210	477	1195	930	1095
	457	1110	243	1086	785	647
		755		863	727	447
		412		636	534	348
		249		410	507	305
					462	
					333	
					380	
					318	
					185	

Vytvořením 7 DNA produktů se vyznačovaly následující kmeny: *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 1006 (378 – 2 576 bp), *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 885 (249 – 2 031 bp), *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 (410 – 2 227 bp) a *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1005 (305 – 1 910 bp). U kmene *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 1006 byl detekován největší fragment o velikosti 2 576 bp. U kmene *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 412 bylo vizualizováno 10 DNA produktů v rozmezí velikostí 209 – 1 834 bp a u kmene *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1004 celkem 9 DNA produktů, jejichž velikosti se pohybovaly v rozmezí 462 – 1 468 bp. U kmene *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 414 se vytvořilo 6 fragmentů o velikostech 375, 883, 1 088, 1 177, 1 832 a 2 257 bp; u kmenů *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 354 a *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 421 bylo detekováno shodně 5 DNA produktů. Jejich velikosti byly následující: *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 354 – 269, 462, 1 095, 1 200 a 2 007 bp, *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 421 – 429, 546, 1 095, 1 345 a 1 791 bp. Nejmenší množství DNA produktů, a to 4, bylo zjištěno u kmenů *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 (457, 600, 1 214 a 2 007 bp) a *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 890 (243, 477, 1 315 a 2 175 bp).

U kmene *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 53 bylo zaznamenáno největší množství DNA produktů, a to 13. Jejich velikosti se pohybovaly v rozmezí 285 – 1 989 bp. Větší počet DNA produktů byl vizualizován i u kmene *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 823. U tohoto kmene bylo pozorováno 12 fragmentů s velikostmi v rozmezí 158 – 1 177 bp. Tento kmen se také vyznačoval vznikem nejmenšího fragmentu o velikosti 158 bp.

Obrázek 21: Dendrogram vytvořený z RAPD profilu studovaných kmenů laktokoků s primerem PER1



Na obrázku 21 je uveden dendrogram, který zobrazuje profil DNA fragmentů získaných metodou RAPD s použitím primeru PER1. Z dendrogramu získaného z RAPD profilu laktokoků s primerem PER1 vyplývá tvorba dvou skupin a také to, že kmen CCDM 1006 (*L. lactis* subsp. *lactis*) nebyl přiřazen ani k jedné z nich. První skupina je tvořena 8 kmeny laktokoků a druhá zbývajících 7. V rámci obou skupin byly vytvořeny vždy dvě podskupiny. U první skupiny je zřejmé, že podskupiny obsahují 5, respektive 3, kmeny bakterií, podskupiny druhé skupiny potom obsahují 3, respektive 4, kmeny bakterií.

Při použití primeru PER1 byla zjištěna u první skupiny pouze nepatrná podobnost u kmenů CCDM 414 (*L. lactis* subsp. *lactis*) a CCDM 946 (*L. lactis* subsp. *cremoris*), které však nepatří do stejného poddruhu *L. lactis*. K první skupině byly dále přiřazeny jednak kmeny *L. lactis* subsp. *lactis* (CCDM 48, CCDM 354, CCDM 53) jednak kmeny *L. lactis* subsp. *cremoris* (CCDM 885, CCDM 824 a CCDM 890). Dále je z dendrogramu zřejmé, že k druhé skupině jsou přiřazeny především kmeny *L. lactis* subsp. *lactis* a to: CCDM 141, CCDM 823, CCDM 412, CCDM 418 a CCDM 421. Přiřazeny jsou dva kmeny *L. lactis* subsp. *cremoris*, kterými jsou CCDM 1005 a CCDM 1004.

7 DISKUZE

7.1 Izolace bakteriální DNA *Lactococcus lactis*

K izolaci bakteriální DNA je možné použít řadu metod. Důležitou podmínkou izolace je, aby byla DNA získána v dostatečném množství a čistotě. Kvalitní a neporušenou DNA je možné použít pro PCR a RAPD – typizaci testovaných kmenů [23].

Jednou z možných metod je izolace bakteriální DNA s použitím magnetických železito – kobaltitých a křemičitých nosičů. V případě vysrážení DNA pomocí polyethylenglykolu může být mechanismus interakcí DNA s povrchem nosičů poměrně komplikovaný [37].

Nejrozšířenější metodou izolace bakteriální DNA je metoda založená na fenol – chloroformové extrakci, které spočívá v odstranění proteinů z bakteriálních buněk pomocí fenolu a chloroformu. V případě grampozitivních bakterií je nutné jejich buněčnou stěnu chemicky narušit. Za tímto účelem se používá lysozym. Tuto metodu lze díky její univerzálnosti použít k izolaci DNA grampozitivních i gramnegativních bakteriálních buněk. Tato metoda je časově náročná a velmi pracná, avšak vyizolovaná DNA je čistá, nedegradovaná a získána v potřebné koncentraci. Nevýhodou je i poměrně značná spotřeba chemických činidel [38].

Bakteriální DNA získaná fenol – chloroformovou extrakcí modifikací metody dle Prodělalová splňuje výše zmíněné podmínky a je tudíž vhodná pro použití v RAPD.

7.2 Charakteristika studovaných kmenů laktokoků pomocí RAPD – typizace

Se všemi 16 studovanými kmeny laktokoků byla provedena PCR s druhově specifickými primery pro *acmA* gen a RAPD typizace. Pro RAPD bylo celkem použito šest primerů – CC1, P16, P2, P17, CORR1 a PER1. V rámci ani jednoho primeru se však nepodařilo rozdělit všechny studované kmeny *Lactococcus lactis* na poddruhy *lactis* a *cremoris*. Nejlepší výsledky byly zaznamenány při použití primeru PER1. U tohoto primeru se vytvořily dvě skupiny. K první skupině byly přiřazeny 4 kmeny *L. lactis*. subsp. *cremoris* (CCDM 890, CCDM 824, CCDM 885 a CCDM 946) a 4 kmeny *L. lactis*. subsp. *lactis* (CCDM 48, CCDM 354, CCDM 414 a CCDM 53).

K druhé skupině byly přiřazeny pouze dva kmeny *L. lactis*. subsp. *cremoris* (CCDM 1004 a CCDM 1005) a 5 kmenů *L. lactis*. subsp. *lactis* (CCDM 141, CCDM 823, CCDM 412, CCDM 418 a CCDM 421). Kmen *L. lactis*. subsp. *lactis* CCDM 1006 nebyl přiřazen ani k jedné z těchto skupin.

Relativně dobré výsledky byly shledány i u primeru CORR1, u kterého rovněž došlo k vytvoření dvou skupin. K první skupině byly přiřazeny pouze 4 kmeny *L. lactis*. subsp. *lactis* (CCDM 53, CCDM 823, CCDM 48 a CCDM 418). K této skupině tudíž nebyl přiřazen žádný z kmenů *L. lactis*. subsp. *cremoris*. Naopak ke skupině druhé bylo přiřazeno nejvíce kmenů *L. lactis*. subsp. *cremoris*, a to 5 (CCDM 885, CCDM 824, CCDM 946, CCDM 1005 a CCDM 1004). Tato skupina, ale také zahrnovala i 4 kmeny *L. lactis*. subsp. *lactis* (CCDM 412, CCDM 414, CCDM 421 a CCDM 1006). Ani k jedné ze skupin nebyly přiřazeny kmeny *L. lactis*. subsp. *lactis* CCDM 354 a CCDM 141 a kmen *L. lactis*. subsp. *cremoris* CCDM 890.

Podle Randazza a kol. byla RAPD typizace úspěšně použita během fermentace k odlišení různých druhů bakterií mléčného kvašení. RAPD technikou byly rozděleny rody *Streptococcus* a *Lactobacillus*. U rodu *Streptococcus* byly RAPD typizací od sebe odlišeny druhy *Streptococcus thermophilus* a *Streptococcus macedonicus* a u rodu *Lactobacillus* se podařilo vzájemně oddělení druhů *Lactobacillus kefir* a *Lactobacillus paracasei*. Kladné výsledky popisují i v případě rodu *Lactococcus*, kdy se podařilo vzájemně oddělit poddruhy *lactis* a *cremoris* [39].

Úspěšnost při vzájemném rozlišení *Lactococcus lactis* a *Lactococcus cremoris* byla potvrzena i podle Samaržiji a kol., kdy byla metodou shlukové analýzy prokázána tvorba dvou skupin [2].

ZÁVĚR

Práce se zabývala izolací bakteriální DNA, která byla následně použita jednak pro PCR, jednak pro RAPD – typizaci ke srovnání fingerprintu 16 studovaných kmenů *Lactococcus lactis*. RAPD – typizace byla provedena s 6 primery.

Získané výsledky:

- Bylo testováno 16 kmenů *Lactococcus lactis* získaných ze Sbírkky kultur mlékařských mikroorganismů Laktoflora® Tábor. Byla provedena optimalizace metodiky izolace bakteriální DNA z kmenů *Lactococcus lactis* a agarózovou gelovou elektroforézou byla potvrzena neporušenost, čistota a dostatečná koncentrace vyizolované DNA.
- Po optimalizaci složení PCR směsi byla získaná DNA podrobena PCR s párem primerů PALA 4 a PALA 14, které byly odvozeny od sekvence *acmA* genu, který kóduje enzym N-acetylmuramidázu – enzym specifický pro druh *Lactococcus lactis*. S pomocí agarózové gelové elektroforézy byl detekován fragment o velikosti přibližně 1 131 bp.
- Se souborem 16 studovaných kmenů *L. lactis* byla provedena RAPD – typizace. K reakcím byly použity druhově specifické primery CC1, P16, P2, P17, CORR1 a PER1. Po vyhodnocení RAPD profilů byly sestrojeny dendrogramy prokazující určitou podobnost některých kmenů laktokoků.
- Pomocí RAPD – typizace s různými primery se nepodařilo vzájemně odlišit studované kmény laktokoků a přiřadit je k poddruhům *lactis* a *cremoris*. Jako nejvhodnější byly vyhodnoceny RAPD – typizace s primery PER1 a CORR1.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Neves, A. R., Pool W. A., Kok J., Kuipers O. P., Santos H. Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis* – The input from in vivo NMR, *FEMS Microbiology Reviews* 29, 531 – 554, 2005.
- [2] Samaržija D., Sikora S., Redžepovic S., Antunac N., Havranek J. L. Application of RAPD analysis for identification of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains isolated from artisanal cultures, *Microbiology Research* 157, 13 – 17, 2002.
- [3] Schleifer K. H., Ehrmann M., Beimfohr C., Brockmann E., Ludwig W., Amann R. Application of Molecular Methods for the Classification and Identification of Lactic Acid Bacteria, *International Dairy Journal* 5, 1081 – 1094, 1995.
- [4] Dalezios, I., Siebert, K. J. Comparison of pattern recognition techniques for the identification of lactic acid bacteria, *Journal of Applied Microbiology* 91, 225 – 236, 2001.
- [5] Štegenerová H., Nápravníková E., Steinhausetová, I., Švec P. Identifikace bakterií mléčného kvašení v mase baleném v podmínkách ochranné atmosféry, *Veterinářství*, 57(1), 39 – 42, 2007.
- [6] Axelsson, L. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen, S., von Wright, A., (Eds.), *Lactic acid bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, 2nd Edition, Marcel Dekker Inc, New York, 1998.
- [7] Samaržija D., Antunac N., Havranek J. L. Taxonomy, physiology and growth of *Lactococcus lactis*: a review, *Mljekarstvo* 51(1) 35 – 48, 2001.
- [8] Gorner, F., Valík, L'. *Aplikovaná mikrobiológia požívateľín*, prvé vydanie – Malé centrum, Bratislava, 129 – 139, 2004.
- [9] Ehrmann, M. A., Vogel, F. Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria, *Trends in Food Science & Technology* 16 , 31 – 42, 2005.
- [10] Šilhánková, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*, Academia Praha, 2002.

- [11] Vlieg, J. H., Rademaker, J. L., Bachmann, H., Molenaar, D., Kelly, W. J., Siezen, R. J. Natural diversity and adaptive responses of *Lactococcus lactis*, *Current Opinion in Biotechnology* 17, 183 – 190, 2006.
- [12] Casalta, E., Motel, M. Ch. Safety assessment of dairy microorganismus: The *Lactococcus* genus, *International Journal of Food Microbiology* 126, 271 – 273, 2008.
- [13] Sedláček, I. *Taxonomie prokaryot*, ISBN 83 – 210 – 4207 – 9, 252, 2007.
- [14] *Miniatlas mikroorganizmů*, VŠCHT Praha, Fakulta potravinářské a biochemické technologie [online]. [cit. 2009 – 03 – 02]. Dostupný z WWW:
<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/mikr.htm>
- [15] Picon, A., Nuñez, M. Growth stimulation of a proteinase positive *Lactococcus lactis* strain by a proteinase negative *Lactococcus lactis* strain, *International Journal of Food Microbiology* 119, 308 – 313, 2007.
- [16] Kleerebezem, M., Boels, I. C., Groot, M. N., Mierau, I., Sybesma, W., Hugenholtz, J. Metabolic engineering of *Lactococcus lactis*: the impact of genomics and metabolic modelling, *Journal of Biotechnology* 98, 199 – 213, 2002.
- [17] Niel, E. W. J., Hahn – Hagerdal, B. Nutrient requirements of lactococci in defined growth media, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 617 – 627, 1999.
- [18] Ruml, T., Rumlová, M., Pačes, V. *Genové inženýrství*, VŠCHT Praha 2002.
- [19] Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. *Základy buněčné biologie*, nakladatelství Espero Publishing s.r.o., 2001.
- [20] Smithsonian Videohistory Collection. The History of PCR [online]. [cit. 2009 – 15 – 01]. Dostupný z WWW:
http://siarchives.si.edu/research/videohistory_catalog9577.html.
- [21] Rosypal S. *Úvod do molekulární biologie III*, Brno 1997.
- [22] Kotrba, P., Knejzlík, Z., Chodora, Z. *Izolace, klonování a analýza DNA*, VŠCHT Praha.

- [23] Power, E. G. M. RAPD typing in microbiology – a technical review, *Journal of Hospital Infection* 34, 247 – 265, 2004.
- [24] Polymerázová řetězová reakce[online]. [cit. 2008 – 09 – 12]. Dostupný z WWW: http://cs.wikipedia.org/wiki/Polymer%C3%A1zov%C3%A1_%C5%99et%C4%Bzov%C3%A1_reakce.
- [25] Lysková L. Real – time PCR a jeho využití v klinické molekulární diagnostice, *Bakalářská práce, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita Brno*, 2008.
- [26] Wilson, I., G. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3741 – 3751, 1997.
- [27] Williams, J., G., K., Kubelik, A., R., Livak, K., J., Rafalski, J., A. Tingey, S., V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research*, 18, 6531 – 6535, 1990.
- [28] Saunders, G., S., Hopkins, D. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis, *Analytical Molecular Biology Quality and Validation*, 103 – 122, 1999.
- [29] Rossetti, L., Giraffa, G. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13 – generated, RAPD – PCR fingerprint databases, *Journal of Microbiological Methods* 63, 135 – 144, 2005.
- [30] Prodělalová, J., Rittich, B., Španová, A. Application of PCR, rep-PCR and RAPD Techniques for Typing of *Lactococcus lactis* strains, *Folia Microbiologica* 50, 150 – 154, 2005.
- [31] Maruo, T., Sakamoto, M., Toda, T., Benno, Y. Monitoring the cell number of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC in human feces by real – time PCR with strain – specific primers designed using the RAPD technique. *International Journal of Food Microbiology* 110, 69 – 76, 2006.
- [32] Prodělalová, J. Molekulární diagnostika potravinářsky významných mikroorganismů, *Disertační práce, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita Brno*, 2004.

- [33] Garde S., Babin M., Pilar G., Nuñez, Medina M. PCR amplification of the Gene *acmA* Differentiates *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris*. Applied and Environmental Microbiology 65, 5151 – 5152, 1999.
- [34] Pérez, G., Cardell, E., Zárate, V. Random amplified polymorphic DNA analysis for differentiation of *Leuconostoc mesenteroides* subspecies isolated from tenerife cheese. Letters In Applied Microbiology, 34, 82 – 85, 2002.
- [35] Cocconceli, P. S., Porro, D., Galandhini, S., Senini L. Development of RAPD protocol for typing of lactic acid bacteria and enterococci. Letters Applied Microbiology 21, 376 – 379, 1995.
- [36] Corroler, D., Desmasures, N., Gueguen, M. Correlation between polymerase chain reaction analysis of the histidine biosynthesis operon, randomly amplified polymorphic DNA analysis and phenotypic characterization of dairy *Lactococcus* isolates, Applied Microbiology and Biotechnology 51, 91 – 99, 1999.
- [37] Pročkalová, J., Rittich, B., Španová, A., Petrová, K., Beneš, M., J. Isolation of genomic DNA using magnetic cobalt ferrite and silica particles. Journal of Chromatography A, 1056, 43 – 48, 2004.
- [38] Graves, L., M., Swaminathan, B. Universal Bacterial DNA Isolation Procedure. In: Diagnostic molecular biology: Principles and applications. Ed: Smith, D., H., Tenover, F., C., White, T., J. American Society of Microbiology, Washington DC, 1993.
- [39] Randazzo, C., L., Caggia, C., Neviani, E. Application of molecular approaches study Lactic Acid Bacteria in artisanal cultures. Journal of Microbiological Methods, 227, 271– 277, 2009.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

APPCR	Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction, náhodně amplifikovaná DNA
ATP	Adenosintrifosfát
ADP	Adenosindifosfát
BMK	Bakterie mléčného kvašení
CCDM	Cultures Collection of Dairy Microorganism, Sbírká kultur mlékařských mikroorganismů
CIZ	Chloroform - izoamylalkohol
dNTP	Směs deoxynukleotidů
DP	Difosfát
EtBr	Ethidiumbromid
EDTA	Etylendiamintetraoctová kyselina
IPCR	Inverzní polymerázová řetězová reakce
NAD ⁺	Nikotidadenindinukleotid
NADH	Redukovaná forma nikotidadenindinukleotidu
P	Fosfát
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PCR - RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphisms PCR, štěpení PCR fragmentů
RAPD	Polymorfismus náhodně amplifikované DNA
REP - PCR	Repetitive Extragenic Elements PCR, PCR s rep – sekvencemi
SDS	Sodiumdodecylsulfát

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Homofermentativní a heterofermentativní mléčné kvašení.....	14
Obrázek 2 Historický přehled taxonomie mikroorganismu <i>Lactococcus lactis</i>	17
Obrázek 3 Mikroorganismus <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	19, 20
Obrázek 4 Klonování definovaného úseku DNA pomocí PCR.....	26
Obrázek 5 Kmen <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 414 po 48 h kultivaci na M17 při 30° C.....	46
Obrázek 6 Agarózová gelová elektroforéza: Ověření přítomnosti a intaktnosti DNA.....	48
Obrázek 7 Agarózová gelová elektroforéza: Ověření přítomnosti a intaktnosti DNA.....	49
Obrázek 8 Agarózová gelová elektroforéza: Optimalizace složení PCR směsi (Master Mixu).....	50
Obrázek 9 Agarózová gelová elektroforéza: PCR s primery PALA 4 a PALA 14.....	51
Obrázek 10 Agarózová gelová elektroforéza: Optimalizace složení reakční směsi pro RAPD	52
Obrázek 11 Agarózová gelová elektroforéza: RAPD s primery CC1 a P16.....	53
Obrázek 12 Agarózová gelová elektroforéza: RAPD s primerem CC1.....	54
Obrázek 13 Dendrogram vytvořený z RAPD profilu studovaných kmenů laktokoků s primerem CC1.....	56
Obrázek 14 Agarózová gelová elektroforéza: RAPD s primerem P16.....	58
Obrázek 15 Dendrogram vytvořený z RAPD profilu studovaných kmenů laktokoků s primerem P16.....	60
Obrázek 16 Agarózová gelová elektroforéza: RAPD s primerem P2.....	62
Obrázek 17 Dendrogram vytvořený z RAPD profilu studovaných kmenů laktokoků s primerem P2.....	65
Obrázek 18 Agarózová gelová elektroforéza: RAPD s primerem P17.....	66
Obrázek 19 Dendrogram vytvořený z RAPD profilu studovaných kmenů laktokoků s primerem P17.....	68
Obrázek 20 Dendrogram vytvořený z RAPD profilu studovaných kmenů laktokoků s primerem CORR1.....	72
Obrázek 21 Dendrogram vytvořený z RAPD profilu studovaných kmenů laktokoků s primerem PER1.....	75

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Vybrané vlastnosti mikroorganismů <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> a subsp. <i>cremoris</i>	19
Tabulka 2 Rozmezí molekulových hmotností DNA separovaných v gelu o různých koncentracích agarózy.....	29
Tabulka 3 Seznam studovaných kmenů laktokoků.....	38
Tabulka 4 Složení amplifikační směsi pro PCR s použitím primerů PALA 4 a PALA 14...	43
Tabulka 5 Charakteristika použitých RAPD primerů.....	43
Tabulka 6 Složení amplifikační směsi pro RAPD.....	44
Tabulka 7 Morfologie kolonií a buněk studovaných kmenů laktokoků.....	47
Tabulka 8 Složení PCR směsi a přítomnost PCR produktů.....	48
Tabulka 9 Optimalizace MgCl ₂ : Složení použitých amplifikačních směsí a přítomnost RAPD produktu.....	52
Tabulka 10 Velikosti fragmentů DNA <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> v bp získané metodou RAPD s použitím primeru CC1.....	55
Tabulka 11 Velikosti fragmentů DNA <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> a <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> v bp získané metodou RAPD s použitím primeru CC1.....	56
Tabulka 12 Velikosti fragmentů DNA <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> a <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> v bp získané metodou RAPD s použitím primeru P16.....	59
Tabulka 13 Velikosti fragmentů DNA <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> v bp získané metodou RAPD s použitím primeru P16.....	60
Tabulka 14 Velikosti fragmentů DNA <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> a <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> v bp získané metodou RAPD s použitím primeru P2.....	63
Tabulka 15 Velikosti fragmentů DNA <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> v bp získané metodou RAPD s použitím primeru P2.....	64
Tabulka 16 Velikosti fragmentů DNA <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> a <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> v bp získané metodou RAPD s použitím primeru P17.....	67
Tabulka 17 Velikosti fragmentů DNA <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> v bp získané metodou RAPD s použitím primeru P17.....	68

Tabulka 18 Velikosti fragmentů DNA <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> a <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> v bp získané metodou RAPD s použitím primeru CORR1.....	71
Tabulka 19 Velikosti fragmentů DNA <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> v bp získané metodou RAPD s použitím primeru CORR1.....	71
Tabulka 20 Velikosti fragmentů DNA <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> a <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> v bp získané metodou RAPD s použitím primeru PER1.....	73
Tabulka 21 Velikosti fragmentů DNA <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> v bp získané metodou RAPD s použitím primeru CORR1.....	74