



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Certifikovaná metodika určená pro komplexní identifikaci složení probiotik v doplňcích stravy pomocí metody MOL-PCR a sekvenování

Autoři:

Mgr. Petr Králík, Ph.D.¹, Mgr. Martin Klanica¹, Mgr. Radka Dziedzinská, Ph.D.¹, Doc. MVDr. Renáta Karpíšková, Ph.D.¹, Mgr. Marta Dušková, Ph.D.¹, Doc. Mgr. Jan Lochman, Ph.D.², Mgr. Kristýna Brodík³

¹Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, Veterinární univerzita, Brno

²Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno

³Ústav veřejného zdraví, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu č. QK22020101 „Multiplexní detekce DNA probiotických bakterií a kvasinek v doplňcích stravy pomocí technologií xMAP a qPCR“.

Osvědčení o uplatnění certifikované metodiky č. 22/2024

ISBN 978-80-7305-968-2

2024

Oponenti certifikované metodiky:

prof. RNDr. Jiří Doškař, CSc.

Mgr. Lenka Bartošová, Ph.D.

Oddělení genetiky a molekulární biologie

Státní zemědělská a potravinářská inspekce

Přírodovědecká fakulta, MUNI, Brno

1	Předmluva	3
2	Cíl metodiky.....	4
3	Vlastní popis metodiky	4
3.1	Úvod.....	4
3.2	Izolace DNA	6
3.3	Provedení MOL-PCR.....	7
3.3.1	Preamplikační PCR.....	8
3.3.2	Ligace	9
3.3.3	PCR s univerzálním primery	10
3.3.4	Hybridizace	12
3.3.5	Příprava přístroje MagPix na analýzu	13
3.3.6	MagPix analýza	13
3.3.7	Analýza a interpretace výsledků	13
3.4	Provedení 16S sekvenování	14
3.4.1	Příprava knihovny	14
3.4.1.1	Příprava PCR směsi pro amplifikaci 16S rRNA knihovny	14
3.4.1.2	Exo-SAP přečištění	14
3.4.1.3	Příprava indexační PCR	15
3.4.1.4	Purifikace DNA amplifikátu 16S rRNA knihovny	16
3.4.1.5	Měření koncentrace 16S rRNA knihovny	16
3.4.1.6	Smíchání výsledné sekvenační 16S rRNA knihovny	18
3.4.2	Odeslání vzorků k sekvenování.....	18
4	Srovnání „novosti postupů“	18
5	Popis uplatnění metodiky.....	19
6	Ekonomické aspekty.....	19
7	Seznam použité související literatury	20
8	Seznam publikací, které předcházely metodice	21

1 Předmluva

Probiotika jsou dynamicky se vyvíjející a stále více se rozrůstající skupinou doplňků stravy, které jsou vyhledávány spotřebiteli k podpoření správné činnosti střev, zlepšení zdravotního stavu nebo třeba jako pomůcka pro obohacení střevního mikrobiomu po antimikrobiální terapii. Samotný termín probiotika je ve svém užším slova smyslu používán k označení živých nepatogenních mikroorganismů, které mají příznivé účinky na zdraví uživatele. V širším slova smyslu se pak jedná o jakékoli nepatogenní bakterie, které se vedle probiotických doplňků stravy, mohou konzumovat i jako součást přirozené stravy, např. v kysaných mléčných výrobcích, fermentované zelenině nebo v masných produktech. Probiotické doplňky stravy mohou obsahovat buď jeden anebo více druhů různých probiotických kmenů, jejichž účinky jsou specifické pro konkrétní druhy probiotických bakterií a kvasinek. Mimo to však určitý kmen může vykazovat specifické účinky i v případě, že je v daném doplňku stravy použit jednotlivě anebo naopak v kombinaci s jinými probiotickými kmeny nebo prebiotiky, čímž je dosahováno vyšší účinnosti. Na trhu jsou probiotické doplňky stravy dostupné nejčastěji ve formě kapslí, kapek, pastilek, tablet a sáčků, ve kterých výrobce deklaruje přítomnost různých druhů probiotických kmenů a jejich množství. Nedávno provedené studie ukazují, že tyto výrobky bývají chybně označeny – některé deklarované druhy ve výrobcích nejsou obsaženy vůbec, případně v zanedbatelném množství, anebo naopak výrobky obsahují nedeklarované druhy.

Z tohoto důvodu je pro zajištění autenticity, která významně ovlivňuje kvalitu těchto výrobků, nezbytné, aby existovaly moderní a vysoce spolehlivé metody umožňující ověřit identitu a případně kvantifikovat množství probiotických kmenů. Tradiční metody využívající mikrobiologické kultivace jsou nedostačující. Některé probiotické kmeny jsou hůře kultivovatelné a pokud jsou v preparátu obsaženy ve směsích není možné jejich spolehlivé odlišení. Biochemická konfirmace vykultivovaných kultur je málo efektivní, proto se k identifikaci stále častěji využívá metoda hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. I tato metoda však má svá omezení, která spočívají zejména v limitovaném spektru komerčně dostupných knihoven, kdy je spolehlivě určen jen rod, nikoliv však druh mikroorganismu. Proto je žádoucí, aby vedle klasických kultivačních metod byla vyvinuta dostupná alternativa detekce a identifikace významných druhů probiotických bakterií a kvasinek přímo v potravinových doplňcích pomocí vysoce sofistikovaných a spolehlivých multiplexních metod založených na analýze DNA. Analýzu DNA lze cíleně zaměřit na určité specifické sekvence DNA charakteristické pro určité druhy anebo využít metody, které umožní komplexně identifikovat všechnu DNA ve vzorku a následně ji přiřadit k jednotlivým druhům bakterií. Mezi prvně popsané metody patří metody PCR, jejichž princip je založen na amplifikaci DNA. Tyto přístupy jsou nejčastěji používány pro detekci a identifikaci různých složek potravin a doplňků stravy z důvodů jejich jednoduchosti, rychlosti, specifity a citlivosti. Druhý

přístup komplexního popisu vzorku na základě identifikace sekvencí DNA je reprezentován sekvenováním DNA.

2 Cíl metodiky

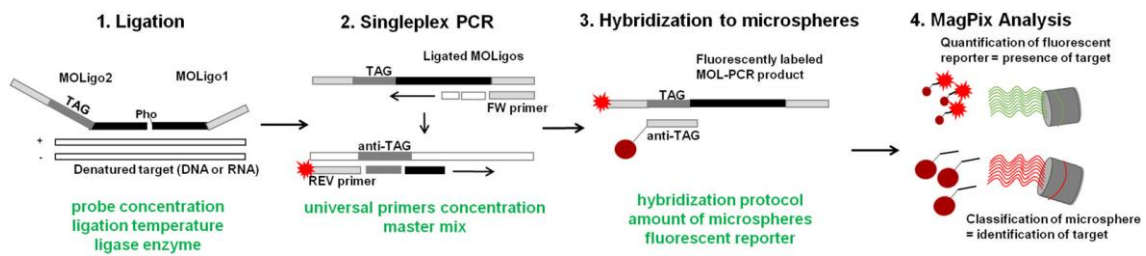
Cílem metodiky bylo vytvoření komplexního postupu pro identifikaci probiotických bakterií, které jsou součástí doplňků stravy. První přístup spočíval ve standardizaci multiplexní metody založené na MOL-PCR, která byla zaměřena na průkaz následujících nejčastěji používaných druhů: *Ligilactobacillus salivarius*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum subsp. infantis*, *Bifidobacterium longum subsp. longum*, *Lactobacillus casei*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus thermophilus*, *Heyndrickxia coagulans*, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus gasseri*, *Limosilactobacillus reuteri*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus jensenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes*. Metodika zahrnuje postup izolace DNA z probiotických preparátů, samotnou analýzu pomocí MOL-PCR a následnou interpretaci dat. Druhým postupem komplexní analýzy probiotických doplňků stravy bylo navrzení vhodného postupu hodnocení diverzity mikrobiálních společenstev v komerčně dostupných probiotických preparátech založené na principu sekvenace variabilních oblastí genu 16S rRNA.

3 Vlastní popis metodiky

3.1 Úvod

V roce 2010 byla v Los Alamos National Laboratory v USA vyvinuta a publikována metoda Multiple Oligonucleotide Ligation (MOL-PCR), která je založena na technologii multiplexní detekce pomocí technologie suspenzních arrayí, tzv. xMAP – Multiplex Analyte Profiling (Deshphande et al., 2010). xMAP technologie je komplikovaná metoda, která zjednodušeně řečeno umí zviditelnit označený specifický úsek DNA pomocí vazby na magnetické kuličky (mikrosféry). Analýzy suspenzních arrayí se provádějí na přístroji MagPix, který umí kuličky pomocí magnetu vyrovnat do jedné vrstvy na skleněné destičce a soustavou laserů určit jejich identitu a také přítomnost specificky navázaného fluorescenčně značeného detekčního cíle. Technologie umožňuje v základním nastavení identifikovat až 50 cílů v jedné reakci, pokročilé systémy mohou z jedné analýzy stanovit cílů až 250.

MOL-PCR je jednou z variant metod založených na využití xMAP technologie k průkazu více cílových molekul DNA v jednom vzorku. Provedení typické MOL-PCR zahrnuje tři klíčové kroky: i) multiplexní ligaci (spojení) specifických sond (tzv. molig) pro detekci specifických sekvencí DNA ve vzorku, ii) PCR, kde jako templát slouží právě spojená specifická moliga a iii) hybridizaci produktů této PCR na magnetické mikrosféry s následnou detekcí signálu na přístroji MagPix, což je magnetická verze suspenzní array popsaná níže.



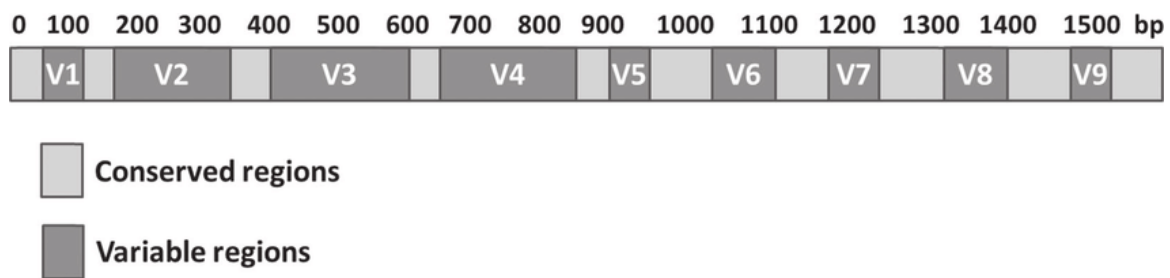
Obrázek č. 1: Multiplexní suspenzní arraye (Reslova et al., 2017).

Pro fungování MOL-PCR je základem správný design molig. Pro každou cílovou sekvenci jsou nezbytná dvě moliga, jejichž spojením vznikne templát pro následnou amplifikační PCR. Moligo 1 se skládá ze sekvence jednoho univerzálního primeru a sekvence specifické pro určitou cílovou DNA. Moligo 2 je pokračování specifické sekvence v cílové DNA, následuje tzv. TAG sekvence pro navázání na magnetickou mikrosféru a druhý univerzální primer. Enzym ligáza spojí obě moliga dohromady pouze za předpokladu, že jsou specificky navázány za sebou na specifické cílové sekvenci DNA. Pokud cílová sekvence není přítomná ve vzorku ke spojení nedojde. Výhodou tohoto postupu je, že následná PCR se provádí s univerzálními primery a není nutné ji tedy nijak složitě optimalizovat. Detekce a vyhodnocení je prováděno MagPix přístrojem jednak na základě fluorescenční značky navázané na reverse primeru a jednak dle barvy mikrosféry, která nese xTAG sekvenci komplementární k TAG sekvenci v amplikovaném produktu.

Technologie MOL-PCR byla úspěšně použita při detekci DNA významných virů, bakterií a parazitů, které mohou být přenášeny skrz potraviny (Reslova et al., 2017; 2019, Hrdy et al., 2021) nebo patogenů použitelných jako biologické zbraně (Jelinkova et al., 2021).

Rozvoj technologií sekvenování DNA v uplynulém desetiletí výrazně napomohl k možnosti masivního rozšíření sekvenace variabilních oblastí genu 16S rRNA používaných k hodnocení diverzity a složení mikrobiálních společenstev do běžných laboratoří (Anders and Huber, 2010; Caporaso et al., 2011; Callbeck et al., 2013; Walters et al., 2015; Gilbert et al., 2018; Pichler et al., 2018). Tato metoda je založena na struktuře bakteriálního genu kódujícího ribozomální RNA (rRNA), a to konkrétně součástí

malé podjednotky bakteriálního ribozomu 16S. Sekvence tohoto genu je konzervována napříč různými bakteriálními druhy, zároveň však nese i variabilní oblasti, což umožňuje rozlišení mezi jednotlivými mikroorganismy. Podobnost konzervovaných oblastí genu u některých bakterií a archeí umožňuje univerzální PCR pro detekci různých mikroorganismů. Konzervované oblasti jsou proloženy 9 hlavními variabilními oblastmi V1-V9. Tyto oblasti vykazují rozdíly mezi jednotlivými bakteriálními druhy a jsou rozhodující pro taxonomické rozlišení. Dle typu vzorku a předpokládané bakteriální komunity se vybírá vhodná variabilní oblast (Janda and Abbott, 2007, Caporaso et al., 2011).



Obrázek 2: Přehled variabilních oblastí dle McAllistera et al. (2018)

3.2 Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena mírně modifikovaným postupem kitu DNeasy mericon Food Kit (Qiagen).

1. Navážít 2 g obsahu probiotických kapslí nebo prášku
2. Přidat 10 ml Food Lysis Buffer a 25 μ l Proteinase K, vortexovat 10 s
3. Inkubovat v termomixeru 60 min při 60 °C za stálého třepání 1000 rpm, poté inkubovat přes noc v termobloku při 60 °C. Pokud nedojde k naprosté lýzi vzorku, případně ráno přidat inkubaci v termomixeru při 60 °C za stálého třepání 1000 rpm.
4. Vzorky ochladit na teplotu 15 – 25 °C
5. Centrifugovat 5 min při 2500 \times g
6. Do nové zkumavky napipetovat 500 μ l chloroformu a přidat 700 – 800 μ l čirého supernatantu získaného v kroku 5.
7. Vortexovat 15 s a centrifugovat 15 min při 14000 \times g
8. Do nové zkumavky napipetovat 700 μ l Buffer PB a 700 μ l horní vodné fáze získané v kroku 7. Vortexovat 10 s, krátce centrifugovat
9. Roztok z kroku 8. přenést na kolonu (max 750 μ l), centrifugovat 1 min při 17900 \times g, vylít odpad

10. Do kolon přidat 500 μl Buffer AW2, centrifugovat 1 min při $17900 \times g$, odpad vylít a následně centrifugovat 1 min při $17900 \times g$, odpad vylít
11. Kolonu vložit do čisté zkumavky, přidat 100 μl Buffer EB, inkubovat 5 min při pokojové teplotě, centrifugovat 1 min při $17900 \times g$. Následně nanést na kolonu 50 μl Buffer EB, inkubovat 5 min při pokojové teplotě, centrifugovat 1 min při $17900 \times g$

Izolovaná DNA se skladuje při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Před dalším použitím je nutné DNA naředit na koncentraci $1\text{ ng}/\mu\text{l}$. Určení koncentrace a kontrola kvality získané DNA se provede pomocí UV spektrofotometru, který umožňuje měření v mikrolitrových objemech a zároveň provede výpočty běžně udávaných hodnot. Obecně platí, že purifikovaná DNA by měla splňovat kritéria daná měřením absorbance při 230 nm (látky fenolické povahy), 260 nm (nukleové kyseliny) a 280 (proteiny) nm, resp. poměr $A_{260}/A_{280} < 2,0$ naznačuje kontaminaci proteiny a poměr $A_{260}/A_{230} < 2,0$ naznačuje kontaminaci fenolickými metabolity (Green and Sambrook, 2012).

3.3 Provedení MOL-PCR

Chemikálie potřebné pro provedení analýzy

Ampligase[®] DNA Ligase with Buffer, 2,500 U @ 100 U/ μL (LGC)

Dynabeads[™] MyOne[™] Streptavidin C1 (Thermo)

EliZyme HS FAST (Elisabeth Pharmacon)

20 \times UNG Supplement (Elisabeth Pharmacon)

20 \times SSC

10mM TrisCl, pH8

MagPlex[®]-TAG 2.5 x 10⁶ beads/mL, 1mL (Diasorin)

Postup vychází z preamplifikace cílové DNA ve vzorku za účelem zvýšení citlivosti detekce. Preamplifikace namnoží delší úseky DNA (do 300 bp), ve kterých leží cíle pro ligaci. Následná ligace a amplifikace ligačních produktů probíhá pomocí 2 separátních molig, z nichž MOL1 je na 5' konci fosforylován z výroby a MOL2 obsahuje na svém 5' konci biotin pro vychytání ligovaných molig. PCR se provádí s DynaBeads, na kterých jsou navázána ligovaná moliga.

MOL-PCR obsahuje interní amplifikační kontrolu (IAC), která slouží k odlišení falešně negativních a skutečně negativních vzorků. IAC je založená na plazmidovém konstrukt, který obsahuje sekvence preamplifikačních primerů a molig.

3.3.1 Preamplikační PCR

Připravit mix všech preamplifikačních primerů (Tabulka 1) na koncentraci 1 μ M každý

Tabulka 1. Sekvence primerů na preamplifikační PCR

Druh	Název F	Sekvence F	Název R	Sekvence R
IAC	IACF	tctctcgatcaatccatccc	IACR	accgaggaataggcttaatg
<i>Ligilactobacillus salivarius</i>	LS_qPCR_F	acacgtttcttagctgaattaatccc	LS_qPCR_R	gtgcagttaccatgtattgatgaga
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	BBI_qPCR_F	ctggcagccgtgacactact	BBI_qPCR_R	tgaactggccgttaccggtct
<i>Bifidobacterium breve</i>	BBr_qPCR_F	tcatcacggcaaggtcaaga	BBr_qPCR_R	agaacagctggaacaattcgac
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	BLI_qPCR_F	atgatgcgctgccactgtta	BLI_qPCR_R	cggtgagcgtcaatgtatctcc
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	BLL_qPCR_F	gtgtggattacctgctaccatc	BLL_qPCR_R	gtcgcaaccttgaccactt
<i>Lactobacillus casei</i>	pLC_PA_F	tggcttctctgtggaacataac	pLC_PA_R	gcttttagaacgccacatttg
<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>	pLPC_PA_F	tacgacagtgacagcttggtg	pLPC_PA_R	acgttaatccggtactgagc
<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	pLR_PA_F	ctcaccagcggcttttcc	pLR_PA_R	gccgtaaatgccacataatgcc
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	pLA_PA_F	ggcaacgactgtaactcaaaatg	pLA_PA_R	cgttggaatgactgattatctgg
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	LF_qPCR_F	taattgtccctgatgccc	LF_qPCR_R	atttggccacgtaaccacc
<i>Lactobacillus helveticus</i>	pLH_PA_F	caatgttcatcgtggcgtcc	pLH_PA_R	gcatcgtaactgttgccaag
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	pLP_PA_F	ccctgaacagctgcaattaacg	pLP_PA_R	gcggtcagtggtgggatc
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KSSP_PA_F	tgcccgtgctgttggtga	KSSP_PA_R	ccgtrccctcatagtttctga
<i>Lactococcus lactis</i>	pLL_PA_F	ggcatatctttgtgaccatttacc	pLL_PA_R	gggtgcaaccaattcgacag
<i>Pediococcus acidilactici</i>	pPA_PA_F	ggatgtttatactttgttccggc	pPA_PA_R	actgtgctgattcttccgtataag
<i>Streptococcus salivarius</i>	pSS_PA_F	gctcccacaagaatcaagc	pSS_PA_R	cgttttgatcttcagtcgacc
<i>Streptococcus thermophilus</i>	pST_PA_F	tgacatggctgattactcctag	pST_PA_R	gcaatccaccaccagattacc
<i>Heyndrickxia coagulans</i>	pWC_PA_F	acatccgtgactaccgaag	pWC_PA_R	gtttcgtgactaccaggc
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	BAL_qPCR_F	acctcaccaatccgctgttc	BAL_qPCR_R	gatccgcatggtggaactct
<i>Enterococcus faecalis</i>	EFs_PA_F	accattcgtgccagtttaaga	EFs_PA_R	agcgacatcttcaccactca
<i>Enterococcus faecium</i>	EFm_PA_F	catcgattgcttaccgggt	EFm_PA_R	cgccatctccatattgctgt
<i>Bacillus subtilis</i>	BS_qPCR_F	gcgcatcagaacactgct	BS_qPCR_R	agctcctgtcattgtacgca
<i>Lactobacillus gasseri</i>	LGs_qPCR_F	tcaagaatatcaaacccaagg	LGs_qPCR_R	agggattagcatgcaattcattgatt
<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	LRe_qPCR_F	aactaccaagcattcgtgc	LRe_qPCR_R	tgtccaaatgctggtgaactt
<i>Staphylococcus aureus</i>	SA_PA_F	tgttccggtttatttgggtgt	SA_PA_R	tgctgcaactgatcgacgaa
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	LDB_qPCR_F	actaaaagatacggtagatcacagaagt	LDB_qPCR_R	agctccctgaaccgtaattgg
<i>Streptococcus pyogenes</i>	SP_qPCR_F	acctcaaatctccgaactca	SP_qPCR_R	tgctctcaatactggcaaggt
<i>Lactobacillus jensenii</i>	LJ_qPCR_F	aaagtgttcttcgcatacaacg	LJ_qPCR_R	gcttgtgccagcagtagtt
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SC_qPCR_F	tgtaccaatattacatgagggaa	SC_qPCR_R	gatgaggattcttgcagcgttag

Tabulka 2. Příprava preamplifikační reakce

	1×
EliZyme HS FAST	10 μ l
20× UNG Supplement	1 μ l
Voda	2 μ l
Mix primerů (1 μ M každý)	5 μ l
DNA (1 ng/ μ l)	2 μ l
Celkem	20 μ l

Finální koncentrace každého z preamplifikačních primerů je v PCR reakci 250 nM

Tabulka 3. PCR protokol

95 °C	2 min	
95 °C	10 s	30x
60 °C	30 s	
10 °C	Forever	

3.3.2 Ligace

Připravit směs všech molig (Tabulka 6) s koncentrací 1 μ M každého.

Tabulka 4. Příprava ligační reakce

	1x
10x Ampligase pufr	2 μ l
Ligase (5U/ μ l)	0,2 μ l
Mix molig (1 μ M)	0,1 μ l
Voda	16 μ l
Preamplifikovaná DNA	2 μ l
Celkem	20 μ l

Finální koncentrace každého z molig v reakci je 5 nM

Reakci připravit do PCR zkumavek, pro lepší manipulaci je výhodnější využít stripy nebo ustřižené PCR destičky.

Tabulka 5. Protokol ligace (PCR cycler)

95 °C	5 min	
62 °C	1 min	10x
95 °C	5 s	
10 °C	Forever	

Po proběhnutí ligační reakce přidat 3 μ l roztoku Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1. Inkubace aspoň 5 min při RT. Protřepávat průběžně na vortexu. Krátce stočit, dbát na max 500 otáček/min. Kuličky nesmí sednout na dno.

Purifikace na magnetickém stojánku (Biohazard)

Tento krok slouží k odmytí nezligovaných a nenavázaných molig, preamplifikované DNA a chemikálií z ligační směsi.

1. Zkumavky, stripy nebo PCR destičky s PCR reakcí a kuličkami umístit do magnetického stojánku
2. Nechat stát cca 10 s
3. Opatrně odsát veškerou tekutinu a neporušit zachycené kuličky
4. Přidat 50 μ l 0,1 M NaOH (vždy čerstvě připravený), zkumavky zavřít, důkladně zvortexovat a inkubovat 10 min. Průběžně vortexovat, pak krátce stočit, aby se odstranily případné kapky z víčka a stěn, dbát na max 500 otáček/min, kuličky nesmí sednout na dno.
5. Umístit na magnetický stojánek a nechat stát cca 10 s

6. Opatrně odsát veškerou tekutinu a neporušit zachycené kuličky
7. Přidat 100 µl pufru 10 mM TrisCl, pH8, zkumavky zavřít, důkladně zvortexovat krátce stočit, aby se odstranily případné kapky z víčka a stěn, dbát na max 500 otáček/min, kuličky nesmí sednout na dno
8. Zopakovat kroky 6 a 7
9. Odsát tekutinu, nechat stát v magnetickém stojánku a přidat opatrně 180 µl 10 mM TrisCl, pH8, nijak nesuspendovat a odstranit veškerou tekutinu
10. Zkumavky s kuličkami jsou nyní připraveny na přidání PCR mixu a následnou PCR.

3.3.3 PCR s univerzálním primery

V tomto kroku dochází k amplifikaci ligovaných produktů z předchozího kroku pomocí PCR.

Tabulka 7. Sekvence univerzálních primerů

Název primeru	Sekvence
UniF5	Cy3-TATCCGTCCATCCAAGTCCG
UniR5 Cy3	TGCGTACTACCATACCTGCC

Tabulka 8. Příprava PCR mixu

	1x
EliZyme HS FAST	10 µl
20x UNG Supplement	1 µl
Voda	9 µl
Primer UniR5 (100 µM)	0,1 µl
Primer UniF5 Cy3 (100 µM)	0,2 µl
Celkem	20 µl

Tabulka 9. PCR protokol

95 °C	2 min	
95 °C	5 s	30x
60 °C	5 s	
10 °C	Forever	

Tabulka 6. Sekvence molig použitých na ligaci

Druh	TAG	Název MOL1	Sekvence MOL1	Název MOL2	Sekvence MOL2
IAC	12	MOL1_IAC2_T12	atgtgtttgcccctcaatggatcAGTAGAAAGTTGAAATTGATTATGCGGACTTGGATGGACGGATA	MOL2_IAC2_T12	TGCGTACTACCATACCTGCCcaggaaatagcttaatgatactatggctca
<i>Ligilactobacillus salivarius</i>	13	MOL1_pLS_T13	tggagaattggctttatcttagggcAGTGAATGTAAGATTATGTATTGCGGACTTGGATGGACGGATA	MOL2_pLS_T13	TGCGTACTACCATACCTGCCcaaatctcatgcatgacagcgc
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	14	MOL1_pBBI2_T14	gcaactgaatcagaccgaacgATTGTGAAAGAAAGAGAAGAAATTCGGACTTGGATGGACGGATA	MOL2_pBBI2_T14	TGCGTACTACCATACCTGCCcaagccagcagatgacaatctt
<i>Bifidobacterium breve</i>	15	MOL1_pBBr2_T15	gcgtgctgctgtggctGTTGTAATTTGTAGTAAAGAAGTACGGACTTGGATGGACGGATA	MOL2_pBBr2_T15	TGCGTACTACCATACCTGCCctgtgggtggctgttgg
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	18	MOL1_pBLI2_T18	tcccgtgacacaggtGTAATTGAATTGAAAGATAAAGTGTGCGGACTTGGATGGACGGATA	MOL2_pBLI2_T18	TGCGTACTACCATACCTGCCcgtgctgcaactgttaatgcc
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	19	MOL1_pBL2_T19	cgacatacacaagttccagcGTGTGTTATTTGTTTAAAGTATCGGACTTGGATGGACGGATA	MOL2_pBL2_T19	TGCGTACTACCATACCTGCCctaccatcggccaagtgc
<i>Lactobacillus casei</i>	20	MOL1_pLC_T20	tttggtaacgactcaaatgaccagAAATTAGTTGAAAGTATGAGAAAGCGGACTTGGATGGACGGATA	MOL2_pLC_T20	TGCGTACTACCATACCTGCCcttctggtgactatgtggca
<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>	21	MOL1_pLPC_T21	cattgtgctgtatctcttagggcATTAAGTAAAGATTGAGAGTTTACGGACTTGGATGGACGGATA	MOL2_pLPC_T21	TGCGTACTACCATACCTGCCctttaccgccagccga
<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	22	MOL1_pLR_T22	ctctgttctgctggcgttcGATTGATATTTGAATGTTTGTTCGGACTTGGATGGACGGATA	MOL2_pLR_T22	TGCGTACTACCATACCTGCCcttctgtcatgccagcatg
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	25	MOL1_pLA_T25	gttactccaactgacctggcGTATGTTGTAATGTATTAAGAAAGCGGACTTGGATGGACGGATA	MOL2_pLA_T25	TGCGTACTACCATACCTGCCcaagccaagtgtccaaca
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	26	MOL1_pLF_T26	cctctgccaaccaagaTTTGATTTAAGAGTGTGAATGTACGGACTTGGATGGACGGATA	MOL2_pLF_T26	TGCGTACTACCATACCTGCCgtacttgcgtggtaaccgtc
<i>Lactobacillus helveticus</i>	27	MOL1_pLH_T27	atcatggaacatcacagaattactAAGATGATAGTTAAGTGAAGTTACGGACTTGGATGGACGGATA	MOL2_pLH_T27	TGCGTACTACCATACCTGCCctggggatgaaatcgtgtttcc
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	28	MOL1_pLP_T28	gaagcgtttggcagcggGATAGATTAGAATGAATTAAGTGTGCGGACTTGGATGGACGGATA	MOL2_pLP_T28	TGCGTACTACCATACCTGCCcggaccgattcaagactactgg
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	29	MOL1_KP_T29	gtctggcgaatcgctcatgTTAAGTGTATAGAAAGTAGTACGGACTTGGATGGACGGATA	MOL2_KP_T29	TGCGTACTACCATACCTGCCggcagcgttataccgaaattc
<i>Lactococcus lactis</i>	30	MOL1_pLL_T30	aatagcttgagcaatcataactgaaggGTGTTATAGAAGTTAAATGTTAAGCGGACTTGGATGGACGGATA	MOL2_pLL_T30	TGCGTACTACCATACCTGCCcttgaaccagttactttcaa
<i>Pediococcus acidilactici</i>	33	MOL1_pPA_T33	cgaccgcatgtttgccTATTAGAGTTTGAGAATAAGTAGTACGGACTTGGATGGACGGATA	MOL2_pPA_T33	TGCGTACTACCATACCTGCCgctcgtttggaagcaactcg
<i>Streptococcus salivarius</i>	34	MOL1_pSS_T34	tgttgatagagtggttacctttcagtTGATATAGTAGTGAAGAAATAAGTGTGCGGACTTGGATGGACGGATA	MOL2_pSS_T34	TGCGTACTACCATACCTGCCgctgatgaaatcaaggctttaagac
<i>Streptococcus thermophilus</i>	35	MOL1_pST_T35	ttagtgataaacactttgcttcaggtaacAATAAGAGAATTGATATGAAGATGCGGACTTGGATGGACGGATA	MOL2_pST_T35	TGCGTACTACCATACCTGCCctggtaaactagttgatcttcaagcg
<i>Heyndrickxia Weizmannia coagulans</i>	36	MOL1_pWC_T36	tcgatgaacatgctggtttgtcTTGTGTAGTTAAGAGTGTGTTAATCGGACTTGGATGGACGGATA	MOL2_pWC_T36	TGCGTACTACCATACCTGCCggtacttgcgtgaaccatacctc
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	37	MOL1_pBAL_T37	cggacaacagggcaaacTGATATGTTAATGAGATGTTGTACGGACTTGGATGGACGGATA	MOL2_pBAL_T37	TGCGTACTACCATACCTGCCcaatccgctgttcgcca
<i>Enterococcus faecalis</i>	38	MOL1_EFs_T38	aaagcggaaatcgtgaagaattgcAGTAAGTGTAGATAGTATTGAATCGGACTTGGATGGACGGATA	MOL2_EFs_T38	TGCGTACTACCATACCTGCCatgggttctagtgctggaattagc
<i>Enterococcus faecium</i>	39	MOL1_EFm_T39	gcgtgaaccagcggaaagtacTTGTGATAGTAGTTAGATATTTGCGGACTTGGATGGACGGATA	MOL2_EFm_T39	TGCGTACTACCATACCTGCCggtgatgagcagcaccgttttg
<i>Bacillus subtilis</i>	42	MOL1_pBS_T42	caaggttcaacaggggaaacgATTTGTTATGATAAATGTGTAGTGTGCGGACTTGGATGGACGGATA	MOL2_pBS_T42	TGCGTACTACCATACCTGCCcggcagccgctctca
<i>Lactobacillus gasseri</i>	43	MOL1_pLGs_T43	aatggaactctgactaacgccAAATAAGAATAGAGAGAGAAAGTTCGGACTTGGATGGACGGATA	MOL2_pLGs_T43	TGCGTACTACCATACCTGCCggagcaccgtggcatc
<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	44	MOL1_pLRe_T44	cacaagcaaacctgacggatgacAATGTAAAGTAAAGAAAGTGTGACGGACTTGGATGGACGGATA	MOL2_pLRe_T44	TGCGTACTACCATACCTGCCggaactgcttcttcaaccgtttat
<i>Staphylococcus aureus</i>	45	MOL1_SA_T45	acaaggtgctaagactctggGTTAGTTATGATGAATATTGTGTACGGACTTGGATGGACGGATA	MOL2_SA_T45	TGCGTACTACCATACCTGCCcgttctgagctgaagtggc
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	46	MOL1_pLDB_T46	tgttctgtctcaagtagcatattcGTGATTGAATAGTAGATTGTTAACGGACTTGGATGGACGGATA	MOL2_pLDB_T46	TGCGTACTACCATACCTGCCctatacaaataccgactatcttaccgc
<i>Streptococcus pyogenes</i>	48	MOL1_pSP_T48	tgaccaatcaataccatattcttatcccTATGAATGTTATTGTGTGTTGATTTCGGACTTGGATGGACGGATA	MOL2_pSP_T48	TGCGTACTACCATACCTGCCactactattactggtttcaagacattg
<i>Lactobacillus jensenii</i>	51	MOL1_pLJ_T51	attcttgatgactgctggttcaatcGATAAGAAAGTAAATGTTAATTGCGGACTTGGATGGACGGATA	MOL2_pLJ_T51	TGCGTACTACCATACCTGCCgatgaccaaatcgtttcaagcgac
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	52	MOL1_pSC_T52	cagttggaagtgggtagcgGTAAGATTAGAAGTTAATGAAGAACGGACTTGGATGGACGGATA	MOL2_pSC_T52	TGCGTACTACCATACCTGCCggagatccttagaagaacctgaag

3.3.4 Hybridizace

V tomto kroku dochází k hybridizaci amplifikovaných ligačních produktů na xTAG mikrosféry.

Tabulka 10. Sekvence xTAG mikrosfér a jejich asignace jednotlivým druhům

Druh	TAG	
IAC	12	AGTAGAAAGTTGAAATTGATTATG
<i>Ligilactobacillus salivarius</i>	13	AGTGAATGTAAGATTATGTATTTG
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	14	ATTGTGAAAGAAAGAGAAGAAATT
<i>Bifidobacterium breve</i>	15	GTTGTAAATTGTAGTAAAGAAGTA
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	18	GTAATTGAATTGAAAGATAAGTGT
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	19	GTGTGTTATTTGTTTGTAAAGTAT
<i>Lactobacillus casei</i>	20	AAATTAGTTGAAAGTATGAGAAAG
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	21	ATTAAGTAAGAATTGAGAGTTTGA
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	22	GATTGATATTTGAATGTTTGTGTTG
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	25	GTATGTTGTAATGTATTAAGAAAG
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	26	TTTGATTTAAGAGTGTTGAATGTA
<i>Lactobacillus helveticus</i>	27	AAGATGATAGTTAAGTGTAAAGTTA
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	28	GATAGATTTAGAATGAATTAAGTG
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	29	TTTAAGTGAGTTATAGAAGTAGTA
<i>Lactococcus lactis</i>	30	GTGTTATAGAAGTTAAATGTTAAG
<i>Pediococcus acidilactici</i>	33	TATTAGAGTTTGAGAATAAGTAGT
<i>Streptococcus salivarius</i>	34	TGATATAGTAGTGAAGAAATAAGT
<i>Streptococcus thermophilus</i>	35	AATAAGAGAATTGATATGAAGATG
<i>Heyndrickxia coagulans</i>	36	TTGTGTAGTTAAGAGTTGTTAAT
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	37	TGTATATGTTAATGAGATGTTGTA
<i>Enterococcus faecalis</i>	38	AGTAAGTGTTAGATAGTATTGAAT
<i>Enterococcus faecium</i>	39	TTGTGATAGTAGTTAGATATTTGT
<i>Bacillus subtilis</i>	42	ATTTGTTATGATAAATGTGTAGTG
<i>Lactobacillus gasseri</i>	43	AAATAAGAATAGAGAGAGAAAGTT
<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	44	AATGTAAAGTAAAGAAAGTGATGA
<i>Staphylococcus aureus</i>	45	GTTAGTTATGATGAATATTGTGTA
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	46	GTGATTGAATAGTAGATTGTTTAA
<i>Streptococcus pyogenes</i>	48	TATGAATGTTATTGTGTGTTGATT
<i>Lactobacillus jensenii</i>	51	GATAAGAAAGTAAATGTAAATTG
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	52	GTAAGATTAGAAGTTAATGAAGAA

Tabulka 11. Příprava hybridizační reakce

	1×
20×SSC	30 µl
Každá xTAG beads ($2,5 \times 10^3 / \mu\text{l}$)	á 0,4 µl
Voda	23 µl
PCR produkt	5 µl
Celkem	60 µl

Tabulka 12. Protokol hybridizace

95 °C	1,5 min
50 °C	10 min
37 °C	Forever

3.3.5 Příprava přístroje MagPix na analýzu

Před započítáním analýzy je nutné provést pročištění a kalibraci přístroje MagPix. Kalibrace a verifikace přístroje se provádí podle doporučení výrobce. Před započítáním analýz v daný den je doporučeno provést hloubkové čištění přístroje (Weekly maintenance routine), aby bylo zajištěno důkladné promytí celého systému. Stejně promytí je doporučeno provést i po skončení analýz.

3.3.6 MagPix analýza

Protokol měření na přístroji MagPix musí být nastaven s následujícími parametry: Heat blok na 37 °C, objem vzorku 50 µl a aktivovaný parametr Sample wash. Analýza probíhá manuálně, není potřeba nastavovat interní parametry analýzy.

3.3.7 Analýza a interpretace výsledků

Metoda MOL-PCR poskytuje pouze kvalitativní analýzu probiotických doplňků stravy. Potvrzuje tedy přítomnost nebo absenci vyjmenovaných druhů probiotických bakterií. Přístroj MagPix poskytuje hodnoty MFI (median fluorescence intensity) pro každý vzorek. Tato veličina ukazuje medián intenzity fluorescence PCR produktů označených Cy3, které jsou specificky navázány na konkrétní xTAG mikrosféru prostřednictvím TAG sekvence. Výsledky měření jsou pak dostupné ve formě csv souboru, který se pro potřeby hodnocení a interpretace analýzy převádí do Excel souboru. Tato tabulka ukazuje MFI jednotlivých vzorků pro konkrétní mikrosféru.

Tabulka 13. Interpretace výsledků probíhá podle následujícího klíče:

MFI < 100	Daná bakterie/kvasinka není přítomna
100 > MFI < 170	Daná bakterie/kvasinka přítomna v minimální množství*
MFI > 170	Daná bakterie/kvasinka je přítomna

* Během testování metody bylo zjištěno, že celá řada probiotických výrobků (v závislosti na jejich složení nebo pokud se jedná o vícedruhové) obsahuje stopové množství nedeklarovaných bakterií, které pravděpodobně pochází z výroby. Vzhledem k podstatě metody, která spočívá v multiplexní detekci můžou u konkrétních výrobků, především více druhových a také v závislosti na jejich složení, bylo v průběhu testování zjištěno, že dochází k detekci těchto stopových množství nedeklarovaných probiotických bakterií. Z empirických dat získaných v průběhu testování byl stanoven interval, který by

měl úspěšně rozlišit mezi skutečnou přítomností deklarovaného probiotického kmene a „provozní kontaminací“. V případě pochybností lze pro vyloučení nebo potvrzení použít analýzy pomocí qPCR prokazující specifická probiotika, které byly v rámci řešení projektu vyvinuty pro konfirmaci a potenciální kvantifikaci vybraných probiotických kmenů bakterií a kvasinek.

3.4 Provedení 16S sekvenování

3.4.1 Příprava knihovny

3.4.1.1 Příprava PCR směsi pro amplifikaci 16S rRNA knihovny

Z důvodu možné kontaminace bakteriální DNA z prostředí musí být příprava PCR prováděna v PCR boxu, v prostoru, kde nedochází k manipulaci s PCR produkty nebo bakteriální DNA. Před začátkem práce se veškerý povrch PCR boxu a používané pomůcky očistit pomocí prostředků degradujících DNA a RNA.

Do jednotlivých jamek 96jamkové PCR destičky/stripů připravíme reakční směsi pro daný počet vzorků.

Tabulka 14. Složení reakční směsi na jeden vzorek

Komponenta	Objem
Kapa2G robust 2x mix	10,0 µl
Primer Set V1-V2	2,0 µl
PCR voda	6,0 µl

Do jednotlivých jamek 96jamkové PCR destičky s připravenými reakčními směsmi přidáme 2,0 µl izolované DNA z analyzovaných vzorků nebo PCR DEPC RNase/DNase Free vodu jako negativní kontrolu.

96jamkové PCR destičky nebo 8jamkové stripy s amplifikačními směsmi zalepíme PCR fólií nebo zavřeme víčky, krátce stočíme a vložíme do PCR cykleru.

Tabulka 15. Parametry reakčního cyklu v termocykleru

95 °C	10 min
95 °C	30 s
55 °C	30 s 25x
72 °C	90 s
12 °C	Forever

3.4.1.2 Exo-SAP přečištění

V následujícím kroku dojde k přečištění amplikonů pomocí směsi exo-SAP

K 2 μl PCR směsi v jednotlivých jamkách 96 jamkové destičky přidáme jednotlivé enzymy dle tabulky níže:

Tabulka 16. Složení směsi k přečištění amplikonů

Komponenta	Objem
PCR směs	2,0 μl
ExoI (20U/ μl)	0,5 μl
CIAP (1U/ μl)	1,5 μl

96jamkové PCR destičku nebo 8jamkové stripy s amplifikačními směsmi zalepí PCR fólií nebo zavřít víčky, krátce stočit a vložit do PCR cyklieru.

Tabulka 17. Parametry reakčního cyklu v termocyklieru

Teplota	Čas
37 °C	15 min
95 °C	10 min
12 °C	Hold

3.4.1.3 Příprava indexační PCR

Každý vzorek musí mít unikátní kombinaci primerů (indexů) P7 a P5. Je nutné si zapsat kombinace indexů svých vzorků pro pozdější vyhodnocení. V rámci amplifikace vzorků pro 16S rRNA sekvenanční knihovnu je nutné použít min. dvě negativní kontroly (PCR DEPC RNase/DNase Free vodu).

Do jednotlivých jamek 96jamkové PCR destičky připravíme reakční směsi pro daný počet vzorků.

Tabulka 18. Složení směsi na jeden vzorek

Komponenta	Objem
Kapa2G robust 2x mix	10,0 μl
FW primer (P7) 2,5 μM	2,0 μl
REV primer (P5) 2,5 μM	2,0 μl
PCR voda	4,0 μl

Do jednotlivých jamek 96jamkové PCR destičky s připravenými reakčními směsmi přidáme 2,0 μl přečištěných amplikonů z předchozího kroku.

96jamkové PCR destičku nebo 8jamkové stripy s amplifikačními směsmi zalepíme PCR fólií nebo zavřeme víčky, krátce stočíme a vložíme do PCR cyklieru.

Tabulka 19. Parametry reakčního cyklu v termocyklieru

Teplota	Čas
95 °C	10 min
95 °C	30 s
55 °C	30 s

25×

72 °C	90 s
12 °C	Hold

3.4.1.4 Purifikace DNA amplifikátu 16S rRNA knihovny

1. Připravíme si dostatečný objem čerstvého 80% roztoku ethanolu, kdy na každý vzorek bude potřeba 0,5 ml. V případě 96 vzorků smícháme 40 ml ethanolu (min 99,8 %, p. a.) s 10 ml PCR vody.
2. Vytemperujeme roztok SPRI select beads na pokojovou teplotu a vortexujeme roztok jednu minutu.
3. Přepipetujeme celý objem PCR reakce (25 µl) do nové 96jamková 0.2 ml semi-skirted PCR destičky.
4. Přidáme 20 µl SPRI select beads a směs 6krát propipetovat pomocí 8kanálové pipety.
5. Inkubujeme 5 min při pokojové teplotě.
6. Přeneseme destičku na magnetický stojánek a počkáme 2 minuty.
7. Poté ponecháme destičku na magnetickém stojánku a pomocí 8kanálové pipety odstraníme supernatant.
8. Přidáme pomocí 8kanálové pipety 200 µl 80 % ethanolu a inkubujeme 30 s.
POZOR: Po přidavku ethanolu destičku nesundáváme z magnetického stojánku, nevortexujeme a ani nepropipetováváme pomocí 8kanálové pipety.
9. Poté ponecháme destičku na magnetickém stojánku a pomocí 8kanálové pipety odstraníme supernatant.
10. Opět přidáme pomocí 8kanálové pipety 200 µl 80 % ethanolu a inkubujeme 30 s.
POZOR: Po přidavku ethanolu destičku nesundáváme z magnetického stojánku, nevortexujeme a ani nepropipetováváme pomocí 8kanálové pipety.
11. Poté ponecháme destičku na magnetickém stojánku a pomocí 8kanálové pipety odstraníme supernatant a necháme zbytky ethanolu odpařit po dobu 2 minut.
POZOR: Dodržujeme čas, pelety z paramagnetických kuliček nesmějí úplně vyschnout!
12. Sundáme destičku z magnetického stojánku a pomocí 8kanálové pipety přidáme do jamek 20 µl 1 x TE pufru. Poté pomocí 8kanálové pipety důkladně propipetujeme nebo zvortexujeme paramagnetické kuličky s TE pufrům a inkubujeme 5 minut při pokojové teplotě.
POZOR: Paramagnetické kuličky musí být v 1 x TE pufru důkladně resuspendovány!
13. Následně destičku dáme opět na magnetický stojánek a počkáme 2 minuty.
14. Poté ponecháme destičku na magnetickém stojánku a odebereme supernatant s přečištěnou DNA do nové destičky/PCR stripu.

3.4.1.5 Měření koncentrace 16S rRNA knihovny

Ke stanovení koncentrace je doporučeno použití kitu QuantiFluor® dsDNA System (Promega, USA).

1. Připravíme si dostatečný objem čerstvého Working solution vzniklého zředěním QF dye roztoku s 1 x TE pufru v poměru 1:400). Na každý vzorek/standard bude potřeba 50 µl roztoku. Na kvantifikaci 96 vzorků včetně 6 standardů smícháme 11 µl QF dye roztoku s 4389 µl 1 x TE pufru a směs dobře zvertexujeme.
2. Následně i připravíme 6 standardů DNA pro kalibrační křivku. DNA standard z kitu QuantiFluor® dsDNA System (Promega, USA) o koncentraci 100 ng /µl naředit na koncentrace 50 ng – 1 ng /µl dle tabulky níže:

Tabulka 20: Složení směsi na jeden vzorek

Standard	Koncentrace	Příprava
STD 1	25 ng /µl	10 µl DNA (100 ng/µl) + 15 µl 1 x TE
STD 2	12,5 ng /µl	10 µl STD1 + 10 µl 1 x TE
STD 3	6,4 ng /µl	10 µl STD2 + 10 µl 1 x TE
STD 4	3,2 ng /µl	10 µl STD3 + 10 µl 1 x TE
STD 5	1,6 ng /µl	10 µl STD4 + 10 µl 1 x TE
STD 6	0 ng /µl	10 µl 1 x TE

3. Poté smícháme do bílé 96jamkové PCR destičky kompatibilní s real-time PCR cyklerem 48 µl Working solution se 2 µl jednotlivých přečištěných vzorků a 6 standardů.
4. Destičku přelepíme PCR fólií kompatibilní s real-time PCR cyklerem, zvertexujeme, krátce stočíme a vložíme do real-time PCR cykleru.

Tabulka 21: Parametry reakčního cyklu v termocykleru

Teplota	Čas
40 °C	1 min
40 °C	30 s

Odečet signálu v kanálu SYBR Green/FAM

5. Z odečtených hodnot jednotlivých standardů sestrojíme kalibrační přímku a z ní odečteme koncentraci jednotlivých vzorků.

POZOR: Vzorky by měly dosahovat min. koncentrace 2 ng/µl a max. koncentrace 30 ng/µl. Pokud je koncentrace vzorku nižší než 2 ng/µl, je doporučeno provést opakovaně amplifikaci 16S rRNA knihovny, pokud je naopak koncentrace vzorku vyšší než 30 ng/µl, je doporučeno vzorek naředit a změřit koncentraci znovu. Koncentrace DNA u negativních kontrol by měla být pod 0,5 ng/µl. Pokud je vyšší než 1 ng/µl mohlo dojít ke kontaminaci v rámci příprava PCR směsi pro amplifikaci 16S rRNA knihovny a velmi se doporučuje provést amplifikaci 16S rRNA knihovny znovu.

3.4.1.6 Smíchání výsledné sekvenační 16S rRNA knihovny

1. Na základě změřené koncentrace vzorků upravíme u všech vzorků (vyjma negativní kontroly) pomocí 1 x TE pufru koncentraci DNA na 2 ng/μl.
2. Následně vytvoříme směsi vzorků, kdy budou smíchána stejná množství 8-12 vzorků (typicky 4 μl) zahrnující i negativní kontrolu.
3. Následně u jednotlivých směsí ověřit pomocí Qubit™ dsDNA Quantification Assay Kitu na Fluorimetru Qubit koncentraci DNA. Postupovat dle instrukcí u Qubit™ dsDNA Quantification Assay Kitu, kdy je pipetováno 4 μl vzorku. Koncentrace jednotlivých směsí by měla být cca 2 ng/μl. **POZOR:** Pokud je u některé ze směsí koncentrace výrazně odlišná, tzn. ≥ 3 ng/μl nebo \leq než 1,5 ng/μl, zkontrolovat ředění vzorků.
4. Pokud jsou koncentrace směsí v očekávaných hodnotách kolem 2 ng/μl, smícháme stejná množství jednotlivých směsí (typicky 10-15 μl).
5. Výslednou koncentraci sekvenační 16S rRNA knihovny ověřit pomocí Qubit™ dsDNA Quantification Assay Kitu na Fluorimetru Qubit a přepočítáme ji na nmol/l, kdy průměrná délka fragmentů DNA je 390 bp. Při koncentraci 2 ng/μl je poté tato koncentrace 8,0 nmol/l.
6. Takto připravená 16S rRNA sekvenační knihovna může být skladována při -20 °C po dobu max. 1 měsíce.
7. Následnou přípravu knihovny pro sekvenaci pomocí NGS přístroje Illumina MiSeq/MiniSeq provést pomocí instrukcí u jednotlivých sekvenačních kitů.

3.4.2 *Odeslání vzorků k sekvenování*

Vzorky připravené dle výše uvedené metodiky jsou odeslány k sekvenování. Tato služba je nabízena i externě v tuzemských nebo zahraničních institucích.

4 **Srovnání „novosti postupů“**

Popsaný postup založený na MOL-PCR nebyl doposud v tomto rozsahu nikde použit a jeho využití v oblasti identifikace složení probiotických doplňků stravy je v celosvětovém kontextu naprosto unikátní. V rámci projektu byl původní postup publikovaný předchozími autory významně vylepšen především, co se týče zahrnutí kroku preamplifikace a purifikace ligovaných fragmentů pomocí Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1. Uvedené změny umožnily oproti publikovaným výsledkům značně rozšířit počet cílů detekovaných v jedné reakci na 30, což v dostupné literatuře nemá obdoby. Zkušenosti získané během řešení projektu budou využity i v rámci přípravy dalších projektů, protože spolehlivá technologie na multiplexní detekci cílových molekul DNA nebo RNA může přinést do celé

řady zemědělských a potravinářských odvětví nové postupy, které zefektivní a zlevní dosavadní postupy založené především na technikách PCR. Nový postup založený na MOL-PCR umožňuje komplexně analyzovat probiotické preparáty dostupné na trhu v ČR. Celý postup byl navržen tak, aby využil komerčně dostupné technologie (postup izolace DNA) a spojil je s moderní technologií. Dosavadní postupy analýzy probiotických doplňků stravy založené na kultivaci a následné identifikaci izolátů pomocí MALDI-TOF nedokáží komplexně analyzovat probiotický přípravek s např. 12 druhy probiotických bakterií a kvasinkou *Saccharomyces boulardii*. Kultivační vyšetření takového výrobku je problematické jednak kvůli rozdílným podmínkám růstu jednotlivých bakterií, ale také kvůli rozdílnému množství jednotlivých druhů v přípravku. Navíc kultivace vyžaduje delší čas a některé druhy mohou mít problém s růstem při určitých podmínkách. Další komplikací, která může nastat při identifikaci jednotlivých bakteriálních druhů ve výrobku je identifikace izolátů pomocí MALDI-TOF, což naráží na vysokou podobnost např. druhů laktobacilů mezi sebou a s tím spojenou nedokonalost knihoven používaných k identifikaci. Všechna tato omezení řeší právě navrhané postupy, doba extrakce DNA může být zkrácena na cca 30 minut a celý postup MOL-PCR, včetně analýzy na přístroji MagPix trvá cca 3 hodiny.

Rozvoj technologií sekvenování DNA vedlo k masivnímu rozšíření sekvenace variabilních oblastí genu 16S rRNA. Tyto metody jsou vhodné k hodnocení diverzity a složení mikrobiálních společenstev a jsou využitelné i v běžných laboratořích. Metody založené na struktuře bakteriálního genu kódujícího rRNA jsou vhodné i k testování probiotických preparátů a detekci v nich obsažených mikrobiálních kultur. Publikace zaměřené na využití těchto metod k detekci bakterií v doplňcích stravy jsou zatím velmi vzácné. Tato certifikovaná metodika přináší metodu vhodnou k analýze komplexních vzorků, obsahujících větší počet probiotických kmenů.

5 Popis uplatnění metodiky

Celý projekt vznikl na zadání Státní zemědělské a potravinářské inspekce, která potřebuje vhodné nástroje pro provádění úředních kontrol. Metodika bude primárně sloužit k pokrytí požadavků SZPI. V rámci projektu proběhlo předání metodiky do laboratoří SVÚ Jihlava, kde bude metodika akreditována a bude sloužit primárně pro potřeby úředních kontrol, ale bude k dispozici i pro další zájemce o analýzy probiotických preparátů.

Výše popsané postupy jsou vyčerpávající a umožňují provedení obou metod i v jakékoli jiné laboratoři, která vedle běžných laboratorních přístrojů disponuje i přístrojem MagPix pro multiplexní analýzu vzorků a má přístup k sekvenátorům Illumina nebo podobným zařízením NGS (buď formou služby nebo vlastnictvím zařízení).

6 Ekonomické aspekty

Náklady na zavedení metodiky do laboratoře lze odhadnout na cca 400 tisíc Kč, což představuje náklady na pořízení nezbytného materiálu, kde hlavní část nákladů představuje pořízení 30 sad xTAG mikrosfér a všech oligonukleotidů. Náklady na chemikálie (ligáza, polymerázy) tvoří relativně malou část, ostatní chemikálie mají minimální finanční náročnost. Za tuto cenu lze ovšem analyzovat cca 2000 vzorků, což při započítání nákladů na izolaci DNA činí cca 300 Kč za vzorek.

Náklady na zavedení metodiky sekvenování do laboratoře jsou nízké. Zahrnují základní vybavení molekulárně biologické laboratoře, nákup izolačního kitu pro extrakci DNA a kitu pro přípravu knihoven. Sekvenování lze objednat jako službu u některé z tuzemských či zahraničních firem. Vyhodnocení výsledků lze provést volně stažitelnými programy. Předpokládané náklady na vyšetření jednoho vzorku by se mohly pohybovat v rozmezí od 3 do 5 tisíc Kč v návaznosti na náklady na vlastní sekvenování.

Ekonomický přínos pro uživatele SZPI bude spočívat především v efektivnější kontrole trhu s probiotickými doplňky stravy. Zde je obtížné vyčíslit ekonomický přínos pro státní správu. Lze hovořit především o přínosu společenském spočívajícím v efektivnější kontrole probiotických preparátů a ochraně spotřebitelů před falšovanými potravinami. Přímý ekonomický přínos bude měřitelný u SVÚ Jihlava, který obohatí své portfolio akreditovaných metod. MOL-PCR umožní významnou úsporu nákladů a času, které jsou nyní potřebné pro komplexní kultivační analýzu a následnou identifikaci získaných izolátů pomocí MALDI-TOF nebo sekvenování.

7 Seznam použité související literatury

Anders, S., and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology* 11, R106. doi: 10.1186/gb-2010-11-10-r106

Callbeck, C. M., Sherry, A., Hubert, C. R. J., Gray, N. D., Voordouw, G., and Head, I. M. (2013). Improving PCR efficiency for accurate quantification of 16S rRNA genes. *Journal of Microbiological Methods* 93, 148–152. doi: 10.1016/j.mimet.2013.03.010

Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., et al. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *PNAS* 108, 4516–4522. doi: 10.1073/pnas.1000080107

Deshpande, A., Gans, J., Graves, S.W., Green, L., Taylor, L. (2010). A rapid multiplex assay for nucleic acid-based diagnostics. *Journal of microbiological methods*. Roč. 80, č. 2, s. 155-163.

Gilbert, J., Blaser, M. J., Caporaso, J. G., Jansson, J., Lynch, S. V., and Knight, R. (2018). Current understanding of the human microbiome. *Nat Med* 24, 392–400. doi: 10.1038/nm.4517

Green, M. and Sambrook, J. (2012) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th Edition, Vol. II, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Hrdy, J., Vasickova, P., Nesvadbova, M., Novotny, J., Mati, T., et al. (2021). MOL-PCR and xMAP Technology: A Multiplex System for Fast Detection of Food- and Waterborne Viruses. *The Journal of Molecular Diagnostics*. Roč. 23, č. 6, s. 765-776.

Janda JM, Abbott SL. (2007). *16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls*. *J Clin Microbiol* ;45(9):2761-2764.

Jelinkova, P., Hrdy, J., Markova, J., Dresler, J., Pajer, P., et al. (2021). Development and Inter-Laboratory Validation of Diagnostics Panel for Detection of Biothreat Bacteria Based on MOL-PCR Assay. *Microorganisms*. Roč. 9, č. 1.

McAllister, T. A., Dunière, L., Drouin, P., Xu, S., Wang, Y., Munns, K., Zaheer, R. (2018). Silage review: Using molecular approaches to define the microbial ecology of silage. *Journal of Dairy Science*, 101*(5), 406–4074. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13704>

Pichler, M., Coskun, Ö. K., Ortega-Arbulú, A.-S., Conci, N., Wörheide, G., Vargas, S., et al. (2018). A 16S rRNA gene sequencing and analysis protocol for the Illumina MiniSeq platform. *MicrobiologyOpen* 7, e00611. doi: 10.1002/mbo3.611

Reslova, N., Huvarova, V., Hrdy, J., Kasny, M., Kralik, P. (2019). A Novel perspective on MOL-PCR optimization and MAGPIX analysis of in-house multiplex foodborne pathogens detection assay. *Scientific reports*. Roč. 9, č. 1, s. 2719.

Reslova, N., Michna, V., Kasny, M., Mikel, P., Kralik, P. (2017). Xmap Technology: Applications in Detection of Pathogens. *Frontiers in Microbiology*. Roč. 8, č. 55.

Walters, W., Hyde, E. R., Berg-Lyons, D., Ackermann, G., Humphrey, G., Parada, A., et al. (2015). Improved Bacterial 16S rRNA Gene (V4 and V4-5) and Fungal Internal Transcribed Spacer Marker Gene Primers for Microbial Community Surveys. *mSystems* 1, e00009-15. doi: 10.1128/mSystems.00009-15

8 Seznam publikací, které předcházely metodice

Dušková M., Koláčková I., Zapletalová M., Novák D., Králík P., Karpíšková R. Průkaz probiotických kultur v komerčních doplňcích stravy na českém trhu. *Výživa a potraviny*, 2023, 1211-846X.