



Certifikovaná metodika QJ1210300 CM5

s názvem

„Postup izolace celkové bakteriální DNA ze sýrů s dohříváním syřeninou pro následnou molekulárně-biologickou analýzu.“

Náplň certifikované metodiky

Aplikace získaných výsledků na základě předchozích teoretických studií a experimentálního výzkumu v rámci řešení projektu podpořeného Ministerstvem zemědělství, Národní agenturou pro zemědělský výzkum, projektem QJ1210300 - Systémy jištění kvality a bezpečnosti mlékařských výrobků vhodnými metodami aplikovatelnými v praxi (2012–2016, MZE/QJ), v programu QJ – Komplexní udržitelné systémy v zemědělství 2012–2018 „KUS“ (2012-2018).

Zdroj certifikované metodiky

Projekt Ministerstvem zemědělství, Národní agentury pro zemědělský výzkum, projekt KUS QJ1210300.

Datum zpracování certifikované metodiky dne: 14. 11. 2016.

Autoři certifikované metodiky jsou:

Ing. Eva Šviráková, Ph.D.:

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav konzervace potravin
procento podílu práce: 52 %

Ing. Andrea Mühlhansová:

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav mléka, tuků a kosmetiky
procento podílu práce: 20 %

Ing. Irena Němečková, Ph.D.:

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.
procento podílu práce: 4 %

Ing. Markéta Jelínková, Ph.D.:

Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i, Středisko sekvenování DNA
procento podílu práce: 12 %

Dr. Jürgen Felsberg, CSc.:

Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i, Středisko sekvenování DNA
procento podílu práce: 12 %.

Zástupcem autorského týmu je: Ing. Eva Šviráková, Ph.D.

Uplatnění certifikované metodiky bylo provedeno zavedením všech principů a postupů metodiky ode dne: 18. 11. 2016.

OBSAH CERTIFIKOVANÉ METODIKY

I. CÍL METODIKY

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

III. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

IV. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

V. EKONOMICKÉ ASPEKTY

VI. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

PŘÍLOHY, DOKUMENTY A DOKLADY

I. CÍL METODIKY

Cílem předkládané certifikované metodiky (dále jen „metodiky“) je navržení nového originálního postupu izolace celkové bakteriální DNA, vyskytující se v sýrech polotvrdých a tvrdých s různými obsahy sušiny a mléčného tuku, pro následnou molekulárně-biologickou analýzu. Tato analýza může přispět zejména k průkazné a spolehlivé detekci, identifikaci a kvantifikaci jak technologicky, tak zdravotně rizikových bakterií, negativně ovlivňujících jakost a bezpečnost těchto sýrů a produktů z nich vyrobených.

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

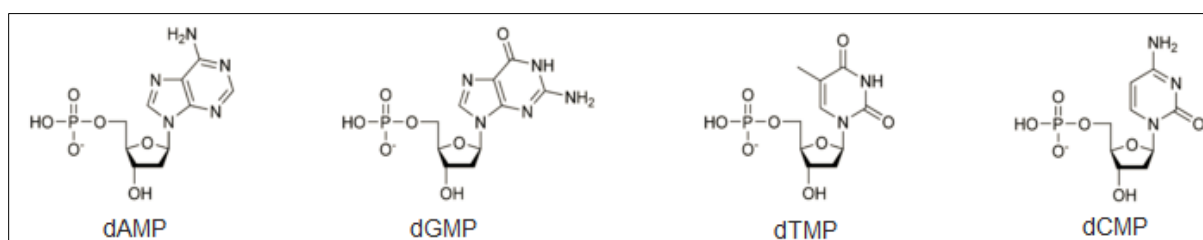
A) ÚVOD

Přestože DNA tvoří jen malou část buňky, její význam je obrovský. Právě díky kódování genetické informace a její exprese patří DNA mezi zcela nepostradatelný typ biopolymeru všech živých soustav (Nečas, 2000; Rozsypal, 2006). Izolace DNA může být v současné době provedena mnoha způsoby. Rozhodující kritéria pro výběr vhodného postupu mohou být nejen požadovaná koncentrace a čistota izolované DNA, ale například i rychlost izolace, obtížnost provedení či cenová dostupnost použitých chemikálií (Lusk a kol., 2013). Izolace DNA je klíčovým krokem pro všechny molekulárně-biologické metody, které mohou být použity pro rychlou a účinnou identifikaci bakterií. V současnosti se využívají především metody založené na polymerasové řetězové reakci (PCR), např. v souvislosti se stanovením přítomnosti zdravotně rizikových patogenů, technologicky rizikových mikroorganismů, ale i zdraví prospěšných mikroorganismů.

B) SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

B–1) Nukleové kyseliny

Nukleové kyseliny jsou polynukleotidy, tj. polymery mononukleotidů spojených navzájem fosfodiesterovými vazbami. Nukleotid se skládá ze tří základních složek: zbytku kyseliny ortofosforečné, pětiuhlíkatého cukru (DNA obsahuje deoxyribosu, v případě RNA se jedná o D-ribosu) a dusíkaté báze, což jsou heterocyklické sloučeniny odvozené buď od pyrimidinu (cytosin, C; thymin, T, pro DNA; uracil, U, pro RNA) nebo od purinu (adenin, A, guanin, G). Monomery (deoxyribonukleotidy) nacházející se v kyselině deoxyribonukleové (DNA) jsou tvořeny: kyselinou deoxyadenylovou (dAMP), kyselinou deoxyguanylovou (dGMP), kyselinou deoxycytidylovou (dCMP) a kyselinou deoxytymidylovou (dTMP) (Soukup, 2005; Rozsypal, 2006). Jejich struktury jsou uvedeny na Obr. 1 (Murray, 2002).



Obr. 1 Struktury deoxyribonukleotidů (dAMP, dGMP, dTMP, dCMP), jež jsou součástí DNA (Murray, 2002; upraveno).

B–2) Izolace DNA

Mezi první fázi většiny molekulárních metod patří izolace DNA z biologického materiálu. Metody izolace nukleových kyselin využívají rozdílné rozpustnosti biologických makromolekul, adsorpce na pevný podklad nebo odstředování za vysokých otáček v gradientních roztocích (Šmarda a kol., 2005). Ačkoli jsou metody izolace deoxyribonukleových kyselin z různých organismů odlišné, základní kroky izolace DNA se u jednotlivých metod prakticky neliší. Je vždy nutné připravit biologický materiál a uvolnit z něj nukleové kyseliny, dále oddělit nukleové kyseliny z nadmolekulárních struktur, purifikovat DNA a nakonec ji eluovat (Vondrejs a Storchová, 1997).

B–3) Příprava buněk

Dostatečné množství bakteriálních nebo eukaryotických buněk pro přípravu nukleových kyselin lze nahromadit kultivací (délka kultivace závisí na druhu mikroorganismu, může být 24h ale i 72h). Před izolací DNA je třeba oddělit buňky od růstového média buď odstředěním (v případě tekuté matrice) nebo vytřepáním do příslušného pufu a následným odstředěním (v případě pevné matrice) (Vondrejs a Storchová, 1997; Šmarda a kol., 2005). Enzymy přítomné v buněčném extraktu by mohly způsobit degradaci nukleových kyselin. Riziko poškození DNA je tedy sníženo, pokud je vstupní materiál čerstvý, zamražený nebo lyofilizovaný (Šmarda a kol., 2005).

B–4) Lyze buněk

U buněk majících buněčnou stěnou je k uvolnění jejich vnitřního obsahu obvykle nutné tuto stěnu rozrušit. Používají se k tomu například povrchově aktivní látky iontové povahy, např. dodecylsírán sodný (SDS) nebo soli žlučových kyselin či různé enzymy jako například lysozym či lytikasa. Výběr způsobu indukce buněčné lyze závisí na typu buňky (Vondrejs a Storchová, 1997; Šmarda a kol., 2005). Po rozrušení buněčné stěny a cytoplazmatické membrány se uvolní buněčný obsah a v pufrovaném roztoku tak vzniká komplexní směs degradačních produktů biomembrán, DNA, RNA, proteinů, lipidů, sacharidů nízkomolekulárních látek a uhlovodíků. Lyze buňky často způsobí fragmentaci chromozomové DNA. Použitím vhodných lyzačních podmínek (tj. udržováním lyzační směsi v pufrovaném médiu, které kromě detergentů obsahuje kyselinu etylendiaminotetraoctovou - EDTA, a chladu), lze zachovat DNA neporušenou. EDTA váže ionty Ca^{2+} a Mg^{2+} , čímž brání nukleasám uvolněným z lyzovaných buněk, aby rozštěpily čerstvě uvolněnou DNA. Důležité je také vyvarovat se rozpadu DNA, ke kterému může dojít při pipetování lyzátu (Raclavský, 2003; Šmarda a kol., 2005).

B–5) Enzymatická lyze

U bakterií se pro odstranění buněčné stěny většinou využívá enzym lysozym, který se přirozeně vyskytuje např. ve vaječném bílku a slzách. Současně s lysozymem, který narušuje peptidoglykany v buněčné stěně, se používají detergenty pro solubilizaci cytoplazmatické membrány (např. SDS či N-laurylsarkosin, a také chelatační činidla, jako např. EDTA nebo citronan sodný). Chelatační činidla váží dvojmocné kationty, čímž dojde ke snížení jejich reaktivity, a destabilizují tak vnější bakteriální membránu. Mimo jiné, tato činidla také inhibují deoxyribonukleasy (DNasy) (Vondrejs a Storchová, 1997; Raclavský, 2003; Šmarda a kol., 2005). Pro zvýšení čistoty izolované DNA se někdy k lyzačnímu roztoku přidává enzym proteinasa K, který štěpí bílkoviny, včetně histonů vázaných na strukturu DNA (Raclavský, 2003).

B–6) Mechanická lyze

Jak už bylo zmíněno výše, mechanická lyze se často využívá pro rozrušení buněčné stěny rostlin a hub, a to nejčastěji v kombinaci s působením degradačních enzymů (Šmarda a kol., 2005). V případě pevných tkání, ale také buněk s buněčnou stěnou, se k jejich rozrušení využívá působení mechanické síly, a to například protřepáváním se skleněnými nebo zirkoniovými kuličkami. Další možností, využívanou hlavně u rostlin, je drcení tkáně zmražené tekutým dusíkem v třecí misce (Raclavský, 2003; Parayre a kol., 2007). Mezi mechanické metody dále patří ultrasonikace, případně může být celistvost buňky rozrušena ručním rozemletím, kuličkovými mlýnky nebo automatickými homogenizátory (Musilová a Glatz, 2011).

B–7) Fyzikální lyze

Mezi techniky fyzikálního rozrušení buněčné stěny se řadí osmotický nebo teplotní šok (Musilová a Glatz, 2011). K lyzi buňky může tedy dojít opakovaným zmrazováním a rozmrazováním nebo zahříváním při vyšší teplotě, kdy dochází k denaturaci proteinů. Fyzikální dezintegrace buněčné stěny může být i mechanická. V tomto případě se využívají např. tryskové homogenizátory nebo vysokootáčkové mixery (Procházková, 2010).

B–8) Chemická lyze

Chemické metody využívají k rozrušení buněčných stěn chemická činidla, jako jsou například organická rozpouštědla, tenzidy, solné roztoky a další chemická činidla (Procházková, 2010). Organická rozpouštědla mohou být použita samotná nebo naředěná vodou. Pro extrakci polárních metabolitů se využívají především methanol, ethanol nebo acetonitril; pro lipofilní sloučeniny pak chloroform, ethylacetát či hexan. Někdy se používá směs methanolu, chloroformu a vody - její výhodou je současná extrakce polárních i nepolárních metabolitů, a to selektivně do dvou fází (jednu fází tvoří chloroform, druhou methanol a voda). Výhodou extrakce organickými rozpouštědly je hlavně její jednoduchost. Jinou možností chemické lyze je kyselá extrakce (HClO_4 , $\text{CCl}_3\text{CO}_2\text{H}$, HCl) nebo bazická extrakce (KOH , NaOH) extrakce. Po tomto kroku musí být z média odstraněny zbytky buněk a neutralizováno pH. Chemická lyze pomocí extrakce je sice velmi rychlá, ale kvůli extrémním změnám pH není příliš šetrná (Musilová a Glatz, 2011).

B–9) Extrakce nukleových kyselin

Odstranění RNA z purifikované DNA lze dosáhnout působením enzymu ribonukleasy (RNasy), který štěpí RNA. RNasy jsou velmi odolné, a proto vydrží i zahřátí na teplotu $65\text{ }^\circ\text{C}$, při které se odstraňují nežádoucí deoxyribonukleasy (DNasy). Někdy jsou k odstranění RNA dostačující následné purifikační kroky nebo není kontaminace v daném postupu na závadu. Pak je možné tento krok vynechat. Důležitým krokem je odstranění proteinů, protože obsahují enzymy, které nukleové kyseliny degradují. Navázání proteinů na DNA může také omezovat účinnost následných experimentů. Proteiny se z buněčných lyzátů odstraňují pomocí proteáz, nejčastěji proteinázy K nebo pronasy E, které je degradují na malé peptidy či na aminokyseliny. Proteiny se dají extrahovat i pufrem ekvilibrovaným fenolem nebo směsí fenolu a chloroformu (1:1). Po přidání organických látek do vodného roztoku buněčného lyzátu se vytvoří dvě vrstvy – horní vodná a dolní fenol/chloroformová. Důkladným protřepáním směsi dojde k mísení fází, přičemž dochází k denaturaci proteinů přítomných ve vodné fázi a jejich vysrážení (působením fenolu). Pro dokonalé rozdělení fází je roztok odstředován. Pokud byl do směsi přidán i isoamylalkohol, dojde ke zvýšení rozpustnosti fenolu, který tak po ukončení protřepávání přejde do fenol/chloroformové fáze. Pokud byl použit fenol ekvilibrovaný neutrálním nebo alkalickým pufrem, zůstávají nukleové kyseliny ve vodné fázi. V případě použití kyselého

fenolu zůstává ve vodné fázi jen RNA, DNA přechází do organické fáze. Na rozhraní fází se po odstředění objeví bílý prstenec sražených proteinů. Aby došlo k úplnému vyčištění DNA, je nutné extrakci vodné fáze opakovat, dokud se nepřestane vytvářet proteinová sraženina. V případě izolace DNA z rostlin, hub nebo některých bakterií je občas potřeba odstranit polysacharidy. Využívá se k tomu extrakce s cetyltrimetylamonium bromidem (CTAB). Na závěr se ještě jednou extrahuje směsí chloroformu a izoamylalkoholu (24:1), což slouží k odstranění zbytků fenolu v roztoku, které by mohly být na obtíž při další práci s purifikovanou DNA (Vondrejs a Storchová, 1997; Raclavský, 2003; Šmarda a kol., 2005). Další často používanou metodou je adsorpce DNA na silikát. K tomu dochází v přítomnosti chaotropních solí. Protřepáváním směsi roztoku s lyzovaným buněčným obsahem, chaotropních solí a suspenze silikátových částic je usnadněno ulpívání DNA na částice, ostatní sloučeniny zůstávají volně v roztoku. Po usazení částic je roztok odsán a částice propláchnuty novým pufrům s chaotropními solemi. Poté je opět odsán roztok. Na částicích je přilnutá čistá DNA, která se z povrchu částic uvolní přidáním vody nebo pufru bez chaotropních solí. Po odstředění zůstanou na dně zkumavky čisté částice, DNA se vznáší nad nimi v roztoku (Raclavský, 2003).

B–10) Precipitace a purifikace DNA

Převedením DNA z vodného roztoku do malého objemu dojde k jejímu zkoncentrování; její přečištění lze provést srážením alkoholem, nejčastěji koncentrovaným ethanolem nebo izopropanolem. V přítomnosti jednomocných iontů (Na^+ , K^+ , NH_4^+) se nukleové kyseliny sráží za vzniku agregátu, který při odstředění sedimentuje na dně zkumavky. To se projeví jako mléčně zbarvený sediment (tzv. pelet). Sraženina se promyje 70% ethanolem, aby byly odstraněny soli, které se srazily spolu s DNA (Raclavský, 2003; Šmarda a kol., 2005). Purifikace DNA může být provedena i na chromatografických kolonkách. Kolonky bývají vsazeny do mikrozkuvek na odstředování, díky čemuž se kombinuje chromatografie a odstředování („spin-columns“). Používají se dva hlavní přístupy: Afinitní chromatografie založená na interakci mezi makromolekulami vzorku a náplní kolony, přičemž se může jednat o interakci elektrické povahy nebo i o více specifickou interakci. DNA je imobilizována na nosiči, zatímco nežádoucí molekuly kolonou volně prochází, a tak se odmyývají. Použitím jiného pufru se pak DNA uvolní z nosiče. Dnes se nejčastěji využívají komerčně vyráběné kolonky a pufrů. Druhou možností je gelová chromatografie. Vzorek je nanášen na kolonu, malé molekuly prochází do porézní matrice a zpomalují tak svůj pohyb kolonou, kdežto velké molekuly DNA prochází kolonou rychleji. Tento typ purifikace je alternativou k purifikaci DNA srážením alkoholem. Cílem purifikačních procesů je získat nukleovou kyselinu v nativním stavu v dostatečném množství a čistotě. Výběr metody purifikace DNA tak závisí na způsobu její následné analýzy (Šmarda a kol., 2005).

B–11) Eluce

Poté, co je sraženina promyta ethanolem nebo je purifikována jiným způsobem, je odsán supernatant a DNA je rozpuštěna ve vodném roztoku, který většinou obsahuje pufr Tris-HCl (pH 7,5–8,0) (Šmarda a kol., 2005).

C) MATERIÁL A METODY

C–1) Vzorky použitelné pro postup

Postup izolace celkové bakteriální DNA je použitelný pro sýry polotvrdé a tvrdé, konkrétně pro sýry s nízkodohřívanou sýřeninou (typu Eidam, Gouda, Čedar, Tylžský sýr, aj.) a vysokodohřívanou sýřeninou (typu Ementál, Moravská bochník, Parmezán, Pecorino, aj.), s různými obsahy sušiny a mléčného tuku v sušině.

Tento postup má omezenou použitelnost v souvislosti s izolací celkové bakteriální DNA z jiných typů sýrů, např. ze sýrů čerstvých, sýrů měkkých, sýrů plísňových, sýrů tavených a z tvarohů.

C–2a) Chemické reagentie použitelné pro postup

- Dihydrát citrátu trisodného (2% roztok)
- EDTA (0,1 M, pH 7,5)
- Chloroform+isoamylalkohol (směs chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1).
- LiClO₄ v acetonu (roztok 2% LiClO₄ v acetonu).
- PBS (roztok)
- SDS (10%)
- ss-fenol

C–2b) Biologické reagentie použitelné pro postup

- Agarosa
- Lysozym (10 mg.ml⁻¹)
- RNAsa A (20 mg.ml⁻¹)
- Pufr pro proteinasu K (2x koncentrovaný)
- Proteinasa K (10 mg.ml⁻¹)
- Reagentie pro PCR reakci
- Roztok Tris (10 mM, pH 8,0)
- Standard GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific, USA)
- TBE pufr (45 mM kyselina boritá, 45 mM Tris-base, 1 mM EDTA, pH 8,0) pro gelovou elektroforézu na agarose

C–3a) Laboratorní přístroje a pomůcky použitelné pro postup

- Elektroforetická vana (s příslušenstvím)
- Inkubátor (laboratorní s termostatem)
- PCR cycler (laboratorní)
- Předvážky (laboratorní)
- Odstředivka (laboratorní)
- Třepačka (laboratorní, orbitální s termostatem)

C–3b) Laboratorní pomůcky drobné použitelné pro postup

- Běžné laboratorní sklo na přípravu roztoků.
- Kuličky skleněné (o průměru 2–4 mm).
- Pinzeta (laboratorní, kovová).
- Tyčinky (laboratorní, skleněné).
- Třecí miska (porcelánová s tloučkem).

C–4) Laboratorní spotřební materiál použitelný pro postup

- Automatické pipety o různých objemech (1000, 20–200, 10–100, 2–20, 1–10 µl)
- Zdravotnická gáza
- Zdravotnická vata
- Zkumavky typu Eppendorf (objem 1,5 ml)
- Zkumavky typu Falcon (objem 50 ml)
- Zkumavky pro PCR reakci (objem 0,2 ml)

C-5) VLASTNÍ POSTUP IZOLACE CELKOVÉ BAKTERIÁLNÍ DNA ZE SÝRŮ S DOHŘÍVANOU SYŘENINOU

Originální pracovní postup izolace celkové bakteriální DNA ze vzorků dohříváných sýrů je uveden v následujících 19 základních bodech. Postup je vhodný pro vzorky sýrů ve strouhané formě.

1. Přibližně 2,5 g strouhaného sýra se vloží do 50 ml zkumavky typu Falcon, přidá se 30 ml 2% roztoku dihydrátu citrátu trisodného a 10–15 skleněných kuliček (o průměru 2–4 mm).
2. Vzorek se třepe v orbitální třepačce při teplotě 37 °C, dokud se nevytvoří homogenní mléčná suspenze (cca 30–40 min). Čas od času se vzorek ještě velmi intenzivně protřepe v ruce.
3. Na konci doby třepání se vzorek třepe ještě 1–2 min velmi intenzivně ručně.
4. Suspenze se přefiltruje přes trojitou vrstvu gázy do nové 50 ml zkumavky typu Falcon; skleněné kuličky se ještě omyjí 5 ml 2% roztoku dihydrátu citrátu trisodného a přidají se k filtrátu.
5. Zkumavky se vyváží a odstředí se po dobu 10 min, při teplotě 4 °C a 13 552 x g.
6. Supernatant se slije a vrstva tuku, která se utvořila na okrajích zkumavky, se odstraní vatou omotanou kolem skleněné tyčinky nebo pinzety.
7. Sediment se resuspenduje ve 30 ml 2% roztoku dihydrátu citrátu trisodného a opakují se kroky 5 a 6.
8. K sedimentu se přidá 1 ml 0,1 M EDTA (o pH 7,5), důkladně se promíchá a vzniklá suspenze se převede do 1,5 ml zkumavky typu Eppendorf. Zkumavka Falcon se ještě omyje 500 µl 0,1 M EDTA (o pH 7,5) a takto vzniklá suspenze se přidá k suspenzi v Eppendorfové zkumavce.
9. Odstředí se 2 min při pokojové teplotě, a při 7168 x g.
10. Slije se supernatant a sediment se resuspenduje v 500 µl roztoku PBS. Přidá se 10 µl lysozymu (10 mg.ml⁻¹) a 10 µl RNAsy A (20 mg.ml⁻¹).
11. Inkubuje se 20 min při teplotě 37 °C. Čas od času se promíchá otáčením.
12. Přidá se 50 µl 10% SDS a inkubuje se při teplotě 37 °C dalších 10 min.
13. Přidá se 580 µl 2x koncentrovaného pufru pro proteinasu K a 20 µl proteinasy K (10 mg.ml⁻¹).
14. Inkubuje se 10 min při teplotě 70 °C a čas od času se promíchá.
15. Lyzát se přepipetuje do 15 ml zkumavky značky Falcon, přidá se 600 µl ss-fenolu a 600 µl směsi chloroformu a isoamylalkoholu (v poměru 24:1) a důkladně se promíchá.

16. Zkumavky Falcon se vyváží a odstředí se po dobu 10 min, při teplotě 4 °C a 13 552 x g.
17. Opatrně se odebere horní vodná fáze do nové 15 ml zkumavky značky Falcon (cca 1 ml) a přidá se 2,5 objemu 2% LiClO₄ v acetonu (cca 2,5 ml). Dojde k vysrážení DNA.
18. Odstředí se po dobu 10 min, při teplotě 4 °C a 13 552 x g.
19. Odstraní se supernatant a vysušený sediment se rozpustí v 60 µl 10 mM roztoku Tris (o pH 8,0).

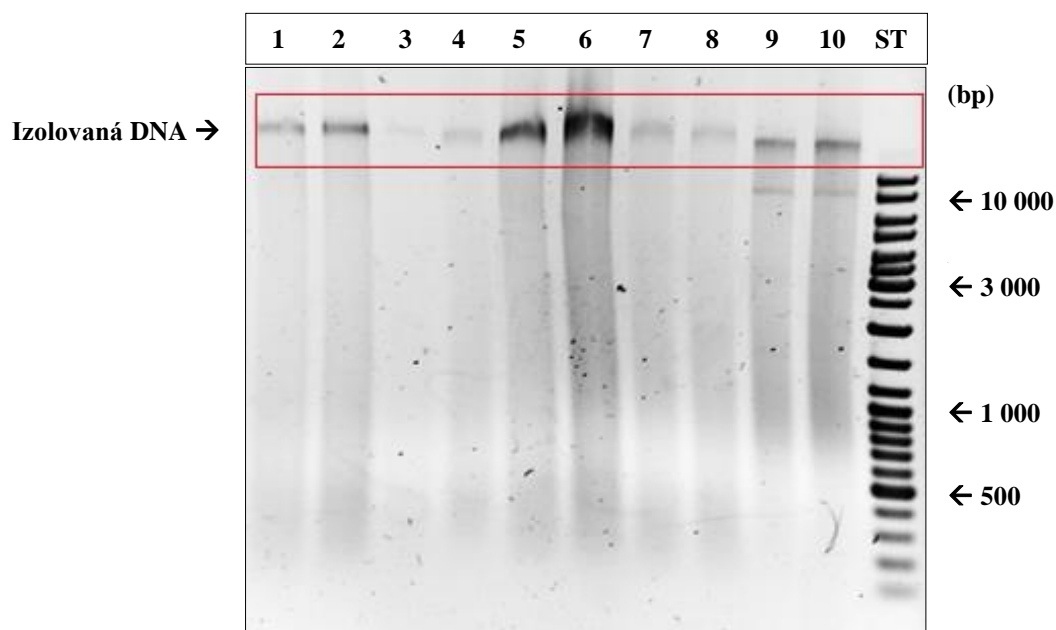
Praktické poznámky k výše uvedenému postupu

- **Poznámka k bodu 2:** čím je podíl tuku v sušině testovaných vzorků pevných potravinových matric vyšší, tím snadněji se vytvoří homogenní suspenze.
- **Poznámka k bodu 17:** pro intenzivnější odstranění zbytku fenolu z vodné fáze se doporučuje opakovat protřepání vodné fáze se směsí chloroformu a isoamylalkoholu (v poměru 24:1). Zbytkové množství fenolu je nutno odstranit zcela.

C–6) Ověření kvality a množství celkové bakteriální DNA izolované z dohříváných sýrů

Kvalitu a množství celkové bakteriální DNA izolované z dohříváných sýrů je možné ověřit elektroforeticky. Na gel se dávkuje vzorky DNA (5 µl). Jako standard se použije GeneRuler DNA Ladder Mix (5 µl) (Thermo Scientific, USA), jehož specifikace je uvedena níže. Kontrolní elektroforéza se uskuteční v 1% (hm.) agarosovém gelu, při konstantním napětí 60 V. Doba elektroforézy se liší podle použité velikosti gelu (mohou být nality různé velikosti gelů) a přibližně se pohybuje v rozmezí 75–90 min.

Příklad ověření kvality a množství celkové bakteriální DNA izolované ze vzorků dohříváných sýrů je uveden na Obr. 2.



Obr. 2 Příklad ověření přítomnosti celkové bakteriální DNA (o velikosti cca 40–50 kbp) izolované z dohříváných sýrů (Eidamu a Ementálu): 1) Ementál A, 2) Ementál B, 3)

Ementál C, 4) Ementál D, 5) Ementál E, 6) Ementál F, 7) Ementál G, 8) Ementál H, 9) Eidam A, 10) Eidam B, ST) standard GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific, USA).

III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Z odborné literatury je známa celá řada metod izolace celkové bakteriální DNA z potravinářských výrobků (Monnet a kol., 2012; Quigley a kol., 2012; Lusk a kol., 2013).

Izolace DNA z mlékárenských výrobků je však poměrně obtížná vzhledem k vysokému obsahu kationtů Ca^{2+} , tuků a dalších látek, které brání působení enzymů nutných pro úspěšnou izolaci DNA (lysozym, RNAsa, proteinasa K). Na trhu existuje několik komerčních souprav, fungujících na bázi afinitní chromatografie s realizací v kolonkách s křemíkovým nosičem. Tyto soupravy nabízejí izolaci bakteriální DNA a dají se použít i pro mlékárenské výrobky, ovšem jejich výtěžnost je poměrně nízká a cena za izolaci vysoká.

Vzhledem k tomu, že zastoupení případných zdravotně i technologicky rizikových bakterií bývá, ve srovnání s celkovým složením bakteriální populace, v mlékárenských výrobcích minoritní, je potřebí použití takové metody izolace celkové bakteriální DNA, která zaručí získání dostatečného množství DNA o vysoké kvalitě.

Na základě klasické fenol/chloroformové extrakce DNA (Kirby, 1956) byl vyvinut nový moderní postup izolace celkové bakteriální DNA ze vzorků dohřívaných sýrů, s realizací v nastrouhané formě. Popsaný postup extrakce celkové DNA z bakteriálních buněk je unikátní díky opakovanému střídání extrakčních/izolačních a čistících kroků. Na mechanickou a chemickou homogenizaci výchozího materiálu střídavě navazují kroky na odstranění nežádoucích složek materiálu a buněčné hmoty, následované čistícími postupy vzniklého extraktu. Během nich se střídají chemické a enzymatické kroky. Výsledkem je získání DNA v dostatečné koncentraci a kvalitě, přičemž cena izolace je ve srovnání s komerčními soupravami nižší.

Tato jednoduchá, ovšem velmi účinná, metoda zahrnuje 5 stěžejních, dále popsanych, kroků. 1) Homogenizaci zkoumané pevné potravinářské matrice pomocí skleněných kuliček v roztoku dihydrátu citrátu trisodného. 2) Lyzi bakteriálních buněk pomocí lysozymu a současné odstranění molekul RNA pomocí enzymu RNasy A. 3) Opracování lyzátu pomocí enzymu proteinasy K. 4) Extrakci DNA pomocí fenol/chloroformové směsi. 5) Závěrečnou precipitaci DNA roztokem LiClO_4 v acetonu.

Jedná se tedy o zcela novou neznámou metodiku podle § 2, odst. 1, písm. b) a písm. c) zákona č. 130/2002 Sb.

IV. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Certifikovaná metodika obsahuje laboratorní postupy a experimentální doporučení týkající se kroků vhodných pro účinnou a systematickou kontrolu sýrů polotvrdých a tvrdých, konkrétně sýrů s nízkodohřivanou syřeninou (typu Eidam, Gouda, Čedar, Tylžský sýr, aj.) a vysokodohřivanou syřeninou (typu Ementál, Moravská bochník, Parmezán, Pecorino, aj.), s různými obsahy sušiny a mléčného tuku v sušině, v souvislosti s eliminací případného výskytu zdravotně a technologicky rizikových bakterií nebo i zdraví prospěšných bakterií, pomocí metody izolace celkové bakteriální DNA, pro následnou molekulárně-biologickou analýzu.

Smlouva o uplatnění metodiky QJ1210300 CM5 je uzavřena mezi poskytovateli a uživatelem, kterým je společnost EUROFINS CZ, s.r.o. Uživatel využije metodiku v rámci

poskytovaných služeb, konkrétně analýz mikrobiologického charakteru, pro potřeby svých zákazníků.

Je možné konstatovat, že nový, originálně navržený, pracovní postup izolace celkové bakteriální DNA ze vzorků dohříváných sýrů je vhodný jak pro použití v kontrolních laboratořích, tak také ve vědecko-výzkumných laboratořích, a dále v kontrolních laboratořích dozorových orgánů a zkušebních laboratořích poskytujících klientům analýzy na komerční bázi, s hlavním cílem zajistit zdravotní bezpečnost, technologickou nerizikovost a požadovanou jakost vyráběných dohříváných sýrů.

V. EKONOMICKÉ ASPEKTY

V současnosti je v oblasti potravinářství kladen důraz nejenom na průmyslovou výrobu zdravotně bezpečných a jakostních potravinářských výrobků, ale také na ekonomický dopad jejich výrob. Např. nedostatečná mikrobiologická jakost vstupních mlékárenských surovin může negativně ovlivnit jakost konečných výrobků, tj. sýrů, pokud jsou tyto kontaminovány zdravotně i technologicky rizikovými bakteriemi, způsobujícími vážné texturní i senzorické změny, projevujícími se formou nežádoucích defektů. Zlepšení mikrobiologické jakosti sýrů by se mělo uskutečňovat nejenom díky jednorázovým kontrolám, ale především díky plánovanému periodickému screeningu, za pomoci erudovaných pracovníků kontrolních laboratořích, kteří ovládají i techniky moderních detekčních metod, mezi které patří např. metody z oblasti molekulární biologie.

V následujících statích je předložen kvalifikovaný odhad nákladů a tržeb zisku, které metodika přinese svým přímým uživatelům.

Náklady spojené se zavedením a aplikací certifikované metodiky

A) Přínos pro uživatele

Zavedení metodiky QJ1210300 CM5 umožní kontrolním laboratořím dozorových orgánů a zkušebním laboratořím poskytujícím klientům analýzy formou služeb v popisu uplatnění metodiky rozšířit spektrum poskytovaných PCR analýz (viz „Srovnání novosti postupů III“ na str. 9–10.). V současné době tuto metodiku využije odhadem 5 laboratořích. Každá z nich ročně zpracuje přibližně 50 vzorků, za které utrží cca 300,- Kč za jeden vzorek, což bude představovat 75 tis. Kč ročně a co bude za období 5 let činit částku 375 tis. Kč. Při odhadovaném zisku 10 % z tržeb to bude činit částku přibližně 7,5 tis. Kč ročně, což bude za období 5 let představovat částku 37,5 tis. Kč.

Hlavní ekonomický přínos metodiky spočívá ve zvýšení úrovně jistění zdravotní bezpečnosti, hygienické nerizikovosti a jakosti sýrů a zároveň vede ke snížení nákladů na léčbu osob s alimentárními onemocněními či na likvidaci neshodných šarží výrobků. Odhad těchto přínosů u nepřímých uživatelů je nad rámec této metodiky.

B) Přínos pro konkrétního uživatele – EUROFINS CZ, s.r.o.

B–a) Investiční náklady – EUROFINS CZ, s.r.o.

Na základě toho, že je pracoviště uživatele metodiky, tj. společnost EUROFINS CZ, s.r.o., vybaveno přístroji a laboratorními pomůckami pro molekulárně-biologické práce, není zapotřebí, aby uživatel metodiky investoval finance např. do nákupu chlazené odstředivky,

elektroforetické vany s příslušenstvím, PCR cykleru, apod. Celkové investiční náklady pro praktické zrealizování certifikované metodiky nejsou tedy uvažovány a plánovány.

Obecné investiční náklady určené pro laboratoř, která by nebyla dostatečně erudovaně vybavena pro práce z oblasti molekulární biologie, by měly být věnovány na nákup nejdůležitějšího základního přístroje, a to laboratorního PCR cykleru (s orientační pořizovací cenou do 200 tis. Kč bez DPH) nebo případně laboratorního qPCR cykleru (s orientační pořizovací cenou do 500 tis. Kč bez DPH), dále například chlazené odstředivky (s orientační pořizovací cenou do 80 000 Kč bez DPH), elektroforetické vany s příslušenstvím (s orientační pořizovací cenou do 15 tis. Kč bez DPH), laboratorní třepačky (s orientační pořizovací cenou do 20 tis. Kč bez DPH) aj.

B–b) Provozní náklady – EUROFINS CZ, s.r.o.

Provozní náklady spojené s realizací a periodickou aplikací metodiky na pracovišti uživatele budou tvořeny položkami, specifikovanými níže.

- Enzym lysozym (cena cca 1,2 tis. Kč včetně DPH; množství 1 g).
- Enzym proteinasa K (cena cca 3 tis. Kč včetně DPH; množství 1 ml).
- Skleněné kuličky o průměru 3 mm (cena 381 Kč včetně DPH; množství 1 kg) (BDL Czech Republic s.r.o., ČR).
- Drobný laboratorní spotřební materiál (např. špičky s filtry, zkumavky typu Eppendorf; cena cca do 3 tis. Kč včetně DPH).
- Běžné chemikálie typu citrát sodný, EDTA, PBS, apod. (cena cca do 1 tis. Kč včetně DPH).

Provozní náklady na jednu reakci izolace celkové DNA byly kalkulovány a jsou plánovány ve výši 50 Kč (včetně DPH).

B–c) Přínos pro uživatele výsledků certifikované metodiky – EUROFINS CZ, s.r.o.

- Finanční přínos pro uživatele výsledků metodiky, charakterizovaný tržbami a ziskem, se odrazí – co se tržeb týká – především v oblasti rozšíření spektra a počtu analýz izolace celkové bakteriální DNA a její následné molekulárně-biologické analýzy (např. pro PCR) v oblasti provádění rutinního screeningu a servisního poradenství v souvislosti se zajišťováním bezpečnosti a jakosti průmyslově vyráběných potravinářských výrobků.
- Dle kvalifikovaného odhadu může roční finanční přínos pro uživatele metodiky činit přibližně až 15 tis. Kč (včetně DPH), což za 5leté období aplikování metodiky může představovat částku až 75 tis. Kč (včetně DPH), za předpokladu finanční kalkulace 300 Kč (včetně DPH) za jednu izolaci celkové bakteriální DNA. Dále je možné uvažovat o finančním přínosu z následně uskutečňovaných molekulárně-biologických analýz (např. při použití metody PCR).
- Při provozních nákladech 50 Kč (včetně DPH), a při kalkulaci množství 50 vzorků určených pro izolaci celkové bakteriální DNA během jednoho roku s cenou 300 Kč (včetně DPH) za jednu uskutečněnou izolaci DNA, by mohl čistý zisk pro uživatele činit 12,5 tis. Kč. Tato finanční kalkulace je provedena bez úvahy mzdových nákladů, které nejsou poskytovateli certifikované metodiky známy.

VI. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

LUSK T.S., STRAIN E., KASE J.A. Comparison of six commercial DNA extraction kits for detection of *Brucella neotomae* in Mexican and Central American-style cheese and other milk products. *Food Microbiology* **2013**, 34, 100–105.

KIRBY K.S. A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. *Biochemical Journal* **1956**, 64, 405.

MONNET C., BOGOVIČ MATIJAŠIĆ B. Application of PCR-based methods to dairy products and to non-dairy probiotic products. In: *Polymerase Chain Reaction* (Hernandez-Rodriguez P., Ramirez Gomez A.P., eds.), 11–50. INTECH, Rijeka, Croatia, **2012**.

MURRAY R.K. Struktura, funkce a replikace informačních makromolekul. *Harperova biochemie*, 4. vyd., kap. 4, 307–442. H & H, Praha, **2002**.

MUSILOVÁ J., GLATZ Z. Metabolomika – základní pojmy, strategie a metodologie. *Chemické listy* **2011**, 105, 745-751.

QUIGLEY L., O’SULLIVAN O., BERESFORD T.P., ROSS R.P., FITZGERALD G.F., COTTER P.D. A comparison of methods used to extract bacterial DNA from raw milk and raw milk cheese. *Journal of Applied Microbiology* **2012**, 113, 96-105.

PARAYRE S., FALENTIN H., MADEC M.N., SIVIERI K., LE DIZES A.S., SOHIER D., LORTAL S. Easy DNA extraction method and optimisation of PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis to identify the predominant high and low GC-content bacteria from dairy products. *Journal of Microbiological Methods* **2007**, 69, 431–441.

PROCHÁZKOVÁ E. Dezintegrace buněčné stěny. Škola molekulárních biotechnologií – Profession, **2010**. [on/line]
<http://webcast.skola-profession.cz/Contexts/profession/Documents/prochazkova.pdf> (staženo 14. 11. 2016).

RACLAVSKÝ V. *Izolace nukleových kyselin*. Ústav biologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, **2003**. <http://biologie.upol.cz/metody/> (staženo 14. 11. 2016).

ROZSYPAL S. Nukleové kyseliny. *Úvod do molekulární biologie I*, 4. vyd., kapitola 1.3, 31–77. Rozsypal: Brno, **2006**.

SOUKUP F. Molekulární genetik. *Lékařské biologie a genetik II*, 1. vyd., 41–62. Karolinum, Praha, 2005.

ŠMARDA J. *Genetika pro gymnázia*, 1.vyd. Fortuna, Praha, **2003**.

ŠMARDA J., DOŠKÁŘ J., PANTUČEK R. RŮŽIČKOVÁ V., KOSTÍKOVÁ J. *Metody molekulární biologie*, 1. vyd. Masarykova univerzita, Brno, **2005**.

VONDREJS V., STORCHOVÁ Z. *Genové inženýrství I.*, 1. vyd. Karolinum, Praha, **1997**.

VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

FELSBERG J., JELÍNKOVÁ M., MATOULKOVÁ D. Oligonukleotidové sekvence pro detekci bakterií rodu *Zymophilus* a způsob detekce bakterií rodu *Zymophilus*. PV **2014**–282. (Příhláška vynálezu; dedikace: projekty: RVO61388971, GAP503/12/1424.)

FELSBERG J., JELÍNKOVÁ M., KUBIZNIAKOVÁ P., MATOULKOVÁ D. Development of a species-specific PCR assay for identification of the strictly anaerobic bacterium *Selenomonas lactificifex* found in biofilm-covered surfaces in brewery bottling halls. *Journal of Applied Microbiology* **2014**, 117, 1328–1335. (Článek impaktovaný; dedikace: projekty: RVO61388971, GAP503/12/1424.)

.....
KOPECKÁ, J., MATOULKOVÁ, D., NĚMEC, M., JELÍNKOVÁ, M., FELSBERG, J. Comparison of DNA extraction methods in terms of yield, purity, long-term storage and downstream manipulation with brewer's yeast chromosomal DNA. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **2014**, 72(1), 1–5. (Článek impaktovaný; dedikace: projekty: MSM0021622413, FRVS 424/2013, RO1012, AV0Z50200510, 61388971).

NAJMANOVA L., ULANOVA D., JELINKOVA M., KAMENIK Z., KETTNEROVA E., KOBERSKA M., GAZAK R., RADOJEVIC B., JANATA J. Sequence analysis of porothramycin biosynthetic gene cluster. *Folia Microbiologica* **2014**, 59, 543–552. (Článek impaktovaný; dedikace: projekty: CZ.1.07/2.3.00/20.0055, CZ.1.07/2.3.00/30.0003, BIOCEV- No. CZ.1.05/1.1.00/02.0109.)

BUKOVSKÁ P., JELÍNKOVÁ M., HRSELOVÁ H., SÝKOROVÁ Z., GRYNDLER M. Terminal restriction fragment length measurement errors are affected mainly by fragment length, G+C nucleotide content and secondary structure melting point. *Journal of Microbiological Methods* **2010**, 82(3), 223–228. (Článek impaktovaný; dedikace: projekty: MŠMT 1M0571, AV0Z50200510.)

.....
MÜHLHANSOVÁ A., ZHEXENBAY N., KOZYBAYEV A., HORÁČKOVÁ Š., SOLICHOVÁ K., PLOCKOVÁ M. Quantification of *Lactobacillus helveticus* in a mixture of lactic acid bacteria using qPCR in cheese. *Acta Alimentaria* **2016**, 45(4), 493–499. (Článek impaktovaný; dedikace: projekt MŠMT č. 20/2014).

MÜHLHANSOVÁ A., HORÁČKOVÁ Š., PLOCKOVÁ M. Stanovení životaschopných laktobacilů s využitím propidium monoazidu pomocí qPCR. *Mlékařské Listy – Zpravodaj* **2016**, 154, 9–13. (Článek recenzovaný; dedikace: projekt QI 101B090).

MÜHLHANSOVÁ A., HORÁČKOVÁ Š., JEBAVÁ I., PLOCKOVÁ M. Quantification of *Lactobacillus acidophilus* in fermented milk products using real-time quantitative PCR. Studentská odborná konference „Chemie je život 2014“, Brno, 4.–5. 12. 2014. V: *Sborník příspěvků ze Studentské odborné konference „Chemie je život 2014“*, 343–348. VUT v Brně, FCH, Brno, **2014**. ISBN 978-80-214-5078-3. (Příspěvek ve sborníku; dedikace: MSMT No. 20/2014).

ZHEXENBAY N., MÜHLHANSOVÁ A., JEBAVÁ I., ALIMARDANOVA M., KULAZHANOV T., KOZYBAEV A., PLOCKOVÁ M. Stanovení *Lactobacillus helveticus* a *Streptococcus thermophilus* v tradičních kazašských sýrech vyrobených ze směsi kravského a kozího mléka pomocí qPCR. Celostátní přehlídka sýrů 2014, Praha, 22.–23. 1. 2014.

V: *Sborník Celostátní přehlídky sýrů 2014, Výsledky přehlídek a sborník příspěvků konference Mléko a sýry*, str. 155–160. VŠCHT Praha, Praha, **2014**. ISBN 978-80-7080-909-9. (Příspěvek ve sborníku; dedikace: projekt QI101B090.)

.....
ŠPANOVÁ A., RITTICH B., NĚMEČKOVÁ I. Metodika izolace DNA v kvalitě pro PCR z komplexních vzorků pomocí magnetických mikročastic. Uplatněno v Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i., 6. 11. 2015. Osvědčení SVS č. SVS/2015/135589-G ze dne 10. 12. 2015. (Certifikovaná metodika; dedikace: projekt: QJ1210300).

NĚMEČKOVÁ I., CHRAMOSTOVÁ J., MÜHLHANSOVÁ A., JEBAVÁ I., PURKRTOVÁ S. Gramovo barvení a další jednoduché testy pro rozlišení mikroorganismů. *Mlékařské listy – Zpravodaj* **2013**, 141, XIII–XVIII. (Článek recenzovaný; dedikace: projekt QJ1210300).

NĚMEČKOVÁ I., SOLICHOVÁ K., ROUBAL P., UHROVÁ B., ŠVIRÁKOVÁ E.: Methods for detection of *Bacillus* sp., *B. cereus*, and *B. licheniformis* in raw milk. *Czech Journal of Food Sciences* **2011**, 29, Special Issue, S55–S60. (Článek impaktovaný; dedikace: projekty: MSM2672286101, 2B06048.)


.....
ŠVIRÁKOVÁ E., MÜHLHANSOVÁ A., PURKRTOVÁ S., JELÍNKOVÁ M., FELSBURG J. Identifikace bakterií rodu *Acinetobacter*, izolovaných z mlékárenských surovin, výrobků a výrobního zařízení, pomocí metody PCR s originálně navrženými rodově specifickými primery. *Celostátní přehlídky sýrů 2016*, Praha, 19.–20. 1. 2016. V: *Sborník Celostátní přehlídky sýrů 2016 – Výsledky přehlídek a sborník konference Mléko a sýry* (Štětina J., Čurda L., ed.), 136–140. VŠCHT Praha, Praha, **2016**. ISBN 978-80-7080-973-0. (Příspěvek ve sborníku; dedikace: projekt: QJ1210300).

ŠVIRÁKOVÁ E., MÜHLHANSOVÁ A., PURKRTOVÁ S., NĚMEČKOVÁ I., JELÍNKOVÁ M., FELSBURG J. Uplatněná certifikovaná metodika QJ1210300 CM3: Identifikace bakterií rodu *Acinetobacter*, vyskytujících se v mléce, mlékárenských výrobcích a na výrobním zařízení a pomůckách, pomocí metody polymerázové řetězové reakce s využitím rodově specifických primerů. Osvědčení SVS č. SVS/2015/135598-G ze dne 10. 12. 2015. VŠCHT Praha, Praha, **2015**. ISBN 978-80-7080-942-6. (Certifikovaná metodika; dedikace: projekt: QJ1210300.)

ŠVIRÁKOVÁ E., MÜHLHANSOVÁ A., NĚMEČKOVÁ I., JUNKOVÁ P., PURKRTOVÁ S., JELÍNKOVÁ M., FELSBURG J.: Identifikace technologicky rizikových bakterií rodu *Acinetobacter*. *Mlékařské listy – Zpravodaj* **2015**, 150, XIV–XX. (Článek recenzovaný; dedikace: projekt QJ1210300.)

ŠVIRÁKOVÁ E., PURKRTOVÁ S., JEBAVÁ I., HANUŠOVÁ J., DEMNEROVÁ K.: Identifikace *Bacillus* sp. izolovaných z mlékárenských výrobků a výrobních zařízení pomocí PCR a MALDI TOF-MS. *Mlékařské listy – Zpravodaj* **2014**, 146, XXV–XXVII. (Článek recenzovaný; dedikace: projekt QJ1210300.)

JEBAVÁ I., PURKRTOVÁ S., HANUŠOVÁ J., SAVICKÁ D., ŠVIRÁKOVÁ E., NĚMEČKOVÁ I., DEMNEROVÁ K.: Identifikace mikrobiálních původců vad mlékárenských výrobků moderními molekulárně-biologickými metodami. *Mlékařské listy – Zpravodaj* **2013**, 138, XX–XIV. (Článek recenzovaný; dedikace: projekt QJ1210300.)

Za zhotovitele:	
V Praze dne: 14. 11. 2016	 Ing. Eva Šviráková, Ph.D.

Certifikovaná metodika QJ1210300 CM5 pro laboratorní kontrolní praxi byla podporována řešením projektu Ministerstva zemědělství, Národní agentury pro zemědělský výzkum, projektem KUS QJ1210300.

OPONENTI DVOU NEZÁVISLÝCH OPONENTNÍCH POSUDKŮ

1. posudek odborníka v daném oboru:

Ing. Lukáš Valihrač, Ph.D.,
Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i.

2. posudek pracovníka příslušného odborného orgánu státní správy:

MVDr. Jiří Hlaváček
odborný rada
Odbor veterinární hygieny a ekologie,
Ústřední veterinární správa Státní veterinární správy.

**PŘÍLOHY, DOKUMENTY A DOKLADY
K CERTIFIKOVANÉ METODICE**

- Uzavřená smlouva s uživatelem.
- Dva nezávislé oponentní posudky:
 - jeden posudek odborníka v daném oboru,
 - jeden posudek pracovníka příslušného odborného orgánu státní správy.
- Osvědčení o uznání certifikované metodiky.

ISBN 978-80-7080-977-8