

- GARNSWORTHY P.C., FENG S., LOCK A.L., ROYAL M.D. (2010): Short communication: Heritability of milk fatty acid composition and stearoyl-CoA desaturase indices in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93, 1743-1748.
- GERMAN J.B., GIBSON R.A., KRAUSS R.M., NESTEL P., LAMARCHE B., VAN STAVEREN W.A., STEIJNS J.M., DE GROOT L., LOCK A.L., DESTAILLATS F. (2009): A reappraisal of the impact of dairy foods and milk fat on cardiovascular disease risk. *European Journal of Nutrition*, 48, 191-203.
- GRIFFITHS P.H., DE HASETH J.A. (1986): *Fourier Transform Infrared Spectrometry*. Wiley Interscience, New York, 656 s.
- HANUŠ O., ROUBAL P., ŘÍHA J., VYLETĚLOVÁ KLIMEŠOVÁ M., SAMKOVÁ E., JEDELSKÁ R., KOPECKÝ J. (2014): Development in indirect infrared determination of milk acetone. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 62, 919-927.
- HANUŠ O., SAMKOVÁ E., ŠPIČKA J., HASOŇOVÁ L., KALA R., KLÍMOVÁ Z., KOPUNECZ P., KOPECKÝ J. (2015): Porovnání metod používaných při stanovení zastoupení zdravotně významných mastných kyselin mléčného tuku v bazénových vzorcích mléka dojnic. *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 151, 12-15.
- HEIN L., SORENSEN L.P., KARGO M., BUITENHUIS A.J. (2018): Genetic analysis of predicted fatty acid profiles of milk from Danish Holstein and Danish Jersey cattle populations. *Journal of Dairy Science*, 101, 2148-2157.
- HERING P., HANUŠ O., FRELICH J., PYTLOUN J., MACEK A., JANŮ L., KOPECKÝ J. (2008): Relationships between the results of various methods of urea analysis in native and enriched milk. *Czech Journal of Animal Science*, 53, 64-76.
- KALÁČ P., SAMKOVÁ E. (2010): The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: A review. *Czech Journal of Animal Science*, 55, 521-537.
- KRAG K., POULSEN N.A., LARSEN M.K., LARSEN L.B., JANSS L.L., BUITENHUIS B. (2013): Genetic parameters for milk fatty acids in Danish Holstein cattle based on SNP markers using a Bayesian approach. *BMC Genetics*, 14, 79.
- MAURICE-VAN EIJDHOVEN M.H.T., VEERKAMP R.F., SOYEURT H., CALUS M.P.L. (2015): Heritability of milk fat composition is considerably lower for Meuse-Rhine-Yssel compared to Holstein Friesian cattle. *Livestock Science*, 180, 58-64.
- MELE M., DAL ZOTTO R., CASSANDRO M., CONTE G., SERRA A., BUCCHIONI A., BITTANTE G., SECCHIARI P. (2009): Genetic parameters for conjugated linoleic acid, selected milk fatty acids, and milk fatty acid unsaturation of Italian Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, 92, 392-400.
- PENASA M., TIEZZI F., GOTTARDO P., CASSANDRO M., DE MARCHI M. (2015): Genetics of milk fatty acid groups predicted during routine data recording in Holstein dairy cattle. *Livestock Science*, 173, 9-13.
- PETRINI J., IUNG L.H.S., RODRIGUEZ M.A.P., SALVIAN M., PERTILLE F., ROVADOSCKI G.A., CASSOLI L.D., COUTINHO L.L., MACHADO P.F., WIGGANS G.R. ET AL. (2016): Genetic parameters for milk fatty acids, milk yield and quality traits of a Holstein cattle population reared under tropical conditions. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 133, 384-395.
- POULSEN N.A., ESKILDSEN C.E.A., SKOV T., LARSEN L.B., BUITENHUIS A.J. (2014): Comparison of genetic parameters estimation of fatty acids from gas chromatography and FT-IR in Holsteins. In: *Proceedings, 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production*, Vancouver, Canada.
- SAMKOVÁ E. (2011): *Faktory ovlivňující zastoupení mastných kyselin mléčného tuku skotu*. České Budějovice: ZF JU. [Habilitation práce]. 60 s.
- SAMKOVÁ E., HANUŠ O., ŠPIČKA J., KALA R., KOUBOVÁ J., SMETANA P., HASOŇOVÁ L., KRÍŽOVÁ Z., KOPUNECZ P., KOPECKÝ J. (2015): Porovnání referenční a rutinní metody stanovení mastných kyselin mléčného tuku v individuálních vzorcích mléka dojnic - dílčí výsledky. *Náš chov*, 9, 74-76.
- SOYEURT H., DARDENNE P., DEHARENG F., BASTIN C., GENGLER N. (2008): Genetic parameters of saturated and monounsaturated fatty acid content, and the ratio of saturated to unsaturated fatty acids in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 91, 3611-3626.
- SOYEURT H., DARDENNE P., DEHARENG F., LOGNAY G., VESELKO D., MARLIER M., BERTOZZI C., MAYERES P., GENGLER N. (2006): Estimating fatty acid content in cow milk using mid-infrared spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 89, 3690-3695.
- STOOP W.M., VAN ARENDONK J.A.M., HECK J.M.L., VAN VALENBERG H.J.F., BOVENHUIS H. (2008): Genetic parameters for major milk fatty acids and milk production traits of Dutch Holstein-Friesians. *Journal of Dairy Science*, 91, 385-394.
- VANROBAYS M.L., BASTIN C., VANDENPLAS J., HAMMAMI H., SOYEURT H., VANLIERDE A., DEHARENG F., FROIDMONT E., GENGLER N. (2016): Changes throughout lactation in phenotypic and genetic correlations between methane emissions and milk fatty acid contents predicted from milk mid-infrared spectra. *Journal of Dairy Science*, 99, 7247-7260.

Kontaktní adresa:

doc. Ing. Eva Samková, Ph.D.,
Katedra potravinářských biotechnologií
a kvality zemědělských produktů, Zemědělská fakulta,
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,
Studentská 809, 370 05 České Budějovice,
Česká republika, e-mail: samkova@zf.jcu.cz

Přijato do tisku: 22.5.2018

Lektorováno: 13.6.2018

NÁVRH PRACOVNÍHO POSTUPU IZOLACE CELKOVÉ BAKTERIÁLNÍ DNA Z DOHŘÍVANÝCH SÝRŮ

Eva Šviráková¹, Irena Němečková², Jürgen Felsberg³

¹ Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

² Výzkumný ústav mlékárenský s. r. o.

³ Mikrobiologický ústav Akademie věd České republiky, v. v. i.

Design of working procedure for the isolation of total bacterial DNA from semi-hard and hard cheeses

Abstrakt

Z odborné literatury je známo, že izolace DNA z mlékárenských výrobků je poměrně obtížná vzhledem k vysokému obsahu kationtů Ca²⁺, tuků a dalších látek, které brání působení enzymů nutných pro její úspěšnou izolaci. Na trhu existuje několik komerčních souprav pro izolaci bakteriální DNA z mlékárenských výrobků, ovšem jejich výtěžnost je poměrně nízká a cena za izolaci vysoká. Vzhledem k tomu, že zastoupení případných zdravotně i technologicky nežádoucích bakterií bývá ve srovnání s celkovým složením bakteriální populace v mlékárenských výrobcích minoritní, je zapotřebí použít takovou metodu izolace celkové bakteriální DNA, která zaručí získání dostatečného množství DNA o vysoké kvalitě. Tato práce přináší návrh nového 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 má vazbu na průkaznou a spolehlivou detekci, identifikaci a kvantifikaci zdravotně i technologicky nežádoucích bakterií negativně ovlivňujících jakost a bezpečnost dohřívaných sýrů a produktů z nich vyrobených. Originální postup izolace DNA je možno využít v kontrolních i ve vědecko-výzkumných laboratořích při jistění zdravotní bezpečnosti, technologické nezávadnosti a požadované jakosti dohřívaných sýrů.

Klíčová slova: nový pracovní postup, izolace celkové bakteriální DNA, dohřívané sýry, zdravotní bezpečnost, kontrolní skrining.

Abstract

From the scientific literature it is well known that DNA isolation from dairy products is relatively difficult due to the high content of Ca^{2+} cations, fats content and other substances that can inhibit enzymes activities necessary for its successful isolation. Several commercial kits for isolation bacterial DNA from dairy products are available on the market, but their yield is relatively low and the costs for isolation are high. Considering that the presence of potentially technologically undesirable bacteria is relatively minor in dairy products in comparison with the total composition of bacterial population, it is necessary to use such a method for isolation total bacterial DNA which will guarantee obtaining sufficient amount of DNA in high quality. This work proposes a new, original, working procedure for isolation of total bacterial DNA occurring in semi-hard and hard cheeses with various contents of dry matter and milk fat, for subsequent molecular biological analysis. This analysis is linked to evidence-based and reliable detection, identification and quantification of both healthy and technologically undesirable bacteria that negatively affect the quality and safety of semi-hard and hard cheeses and products made from them. The original DNA isolation procedure can be used both in control and scientific research laboratories to ensure health safety, technological non-riskiness and the required quality of the semi-hard and hard cheeses.

Key words: new working procedure, isolation of total bacterial DNA, semi-hard and hard cheeses, health safety, control screening.

Úvod

Přestože deoxyribonukleová kyselina (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. Mezi rozhodující kritéria pro výběr vhodného postupu může patřit nejenom požadovaná koncentrace a čistota izolované DNA, ale např. 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 detekci různých typů mikroorganismů, včetně bakterií. V současnosti se pro detekci patogenních bakterií, technologicky nežádoucích bakterií a i zdraví prospěšných bakterií využívají především metody založené na polymerasové řetězové reakci (PCR).

Z odborné literatury je známa celá řada metod izolace celkové bakteriální DNA z potravinových 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 (např. lysozymu, RNAsy, proteinasy K) nutných pro úspěšnou izolaci DNA. Na trhu existuje řada komerčních souprav pro izolaci genomové DNA fungujících na různých principech. Tyto soupravy se dají použít i pro mlékárenské výrobky, ovšem jejich výtěžnost je většinou poměrně nízká a cena za izolaci vysoká. Využívají jednak afinitní chromatografii s realizací v kolonkách s křemíkovým nosičem, dále fungují na principu iontoměničů. V posledních letech je populární izolace na principu využití magnetických mikrokuliček (kity jsou dostupné např. u Elizabeth Pharmakon, s.r.o., CZE), které s využitím reverzní adsorpce umožňují navázání celkové DNA a její oddělení od zbytku buněčných stěn, bílkovin, atd. (Křížová a skol., 2005).

V následujícím textu jsou uvedeny informace, které s problematikou obecné izolace DNA (nejenom) z bakterií úzce souvisejí. Jedná se především o charakteristiku nukleových kyselin, také o představení počáteční fáze izolačního postupu v kroku přípravy buněk, dále o specifikaci kroku lyze (konkrétně jsou popsány: enzymatická, mechanická, fyzikální a chemická lyze), se závěrečnými informacemi o extrakci nukleových kyselin, a také precipitaci, purifikaci a eluci DNA.

Nukleové kyseliny. Nukleové kyseliny jsou polynukleotidy, tzn. 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 (pro DNA: cytosin C; thymín T; pro RNA: uracil U) nebo od purinu (adenin A, guanin G). Monomery (deoxyribonukleotidy) nacházející se v DNA jsou tvořeny: kyselinou deoxyadenylovou (dAMP), kyselinou deoxyguanylovou (dGMP), kyselinou deoxycytidylovou (dCMP) a kyselinou deoxytymidylovou (dTMP) (Soukup, 2005; Rozsypal, 2006).

Izolace DNA. K prvním krokům většiny molekulárních metod patří izolace DNA z biologického materiálu. Metody izolace nukleových kyselin využívají rozdílné rozpustnosti biologických makromolekul, adsorpce na pevný podklad nebo odštěďování za vysokých otáček v gradientních roztocích (Šmarda, 2003). 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).

Příprava buněk. Dostatečné množství bakteriálních buněk pro přípravu nukleových kyselin lze nahromadit kultivací (délka kultivace závisí na druhu bakterie a může trvat od 24 h do 72 h). Před izolací DNA je třeba oddělit buňky od kultivačního média buď odstředěním (v případě tekuté matrice) nebo vytrpáním do příslušného pufu a následným odstředěním (v případě pevné matrice) (Vondrejs a Storchová, 1997; Šmarda, 2003). 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, 2003).

Lyze buněk. U buněk majících buněčnou stěnu 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 např. lysozym či lytikasa. Výběr způsobu navození buněčné lyze závisí na typu buňky (Vondrejs a Storchová, 1997; Šmarda, 2003). Po rozrušení buněčné stěny a cytoplazmatické membrány se uvolní buněčný obsah a v pufrovaném roztoku tak vzniká komplexní směs degradačních produktů biomembrán, zbytků buněčných stěn, 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 například při pipetování lyzátu (Raclavský, 2003; Šmarda, 2003).

Enzymatická lyze. U bakterií se pro odstranění buněčné stěny většinou využívá enzym lysozym, který se přirozeně vyskytuje např. ve vaječném bílku a v slzách. Současně s lysozymem, který narušuje peptidoglykany buněčné stěny, se používají povrchově aktivní látky 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, 2003). Pro zvýšení čistoty izolované DNA se někdy k lyzačnímu roztoku přidává enzym proteinasa K, který štěpí bílkoviny i v přítomnosti SDS, a při zvýšených teplotách (50-70 °C) (Raclavský, 2003).

Mechanická lyze. V případě pevných tkání (např. u rostlin a hub), ale také u buněk s buněčnou stěnou (tzn. i u bakterií), se k jejich rozrušení využívá působení mechanické

síly, a to např. protřepáváním se skleněnými nebo zirkoniovými kuličkami. Další možností je drcení v třecí misce s použitím zmrazeného tekutého dusíku (Raclavský, 2003; Parayre a kol., 2007). Mezi další mechanické metody patří ultrasonikace, případně může být celistvost buňky rozrušena ručním rozemletím, kuličkovými mlýnky nebo automatickými homogenizátory (Musilová a Glatz, 2011).

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).

Chemická lyze. Chemické metody využívají k rozrušení buněčných stěn chemická činidla, jako jsou např. organická rozpouštědla o různých koncentracích, tenzidy, solné roztoky a další chemická činidla (Procházková, 2010). 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 fázi tvoří chloroform, druhou methanol a voda). Výhodou extrakce organickými rozpouštědly je hlavně její jednoduchost. Jinou možností chemické lyze je kyselá (HClO_4 , $\text{CCl}_3\text{CO}_2\text{H}$, HCl) nebo bazická (KOH , NaOH) extrakce. Po tomto kroku musí být z média odstraněny zbytky buněk a neutralizováno pH. Chemická lyze je sice velmi rychlá, ovšem vzhledem k extrémním změnám pH není příliš šetrná (Musilová a Glatz, 2011).

Extrakce nukleových kyselin. Odstranění RNA z purifikované DNA lze dosáhnout působením enzymu ribonukleasy (RNasy), který štěpí RNA. RNasy jsou velmi odolné, vydrží i záhřev na teplotu 100 °C, čehož se využívá pro odstranění nežádoucí aktivity příměsí deoxyribonukleas (DNAs) (Asubel a kol., 2003). 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 omezit účinnost následných experimentů. Proteiny se z buněčných lyzátoů odstraňují pomocí proteas, nejčastěji proteinasy K nebo pronasy E, které je degradují na malé peptidy či aminokyseliny. Proteiny se dají extrahovat i pufrem ekvilibrovaným fenolem nebo směsí fenolu a chloroformu (v poměru 1 : 1). Po přidání organických látek do vodného roztoku buněčného lyzáto se vytvoří dvě vrstvy - horní vodná a dolní fenol-chloroformová. Důkladným promícháním 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 je do směsi přidán i isoamylalkohol, dojde ke zvýšení rozpustnosti fenolu, který tak po ukončení

promíchání přejde do fenol-chloroformové fáze. Pokud byl použit fenol ekvilibrovaný neutrálním nebo alkalickým pufrům, 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 prsteneček 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 některých bakterií, rostlin nebo hub je občas potřeba odstranit polysacharidy. Využívá se k tomu extrakce s cetyltrimethylamonium bromidem (CTAB). Na závěr se ještě jednou extrahuje směsí chloroformu a isoamyalkoholu (v poměru 24 : 1), což slouží k odstranění zbytků fenolu v roztoku, které by mohly být na obtíž při další práci s purifikovanou DNA (Vondřejš a Storchová, 1997; Raclavský, 2003; Šmarda, 2003). Další často používanou metodou je adsorpce DNA na silikát. K tomu dochází v přítomnosti chaotropních solí. Protřepáním 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).

Precipitace a purifikace DNA. Převedením DNA z vodného roztoku do malého objemu dojde k jejímu zkoncentrování; její přečištění lze provést srážením alkoholem, nejčastěji 96% ethanolem nebo isopropaholem. V přítomnosti jednomocných iontů (Na^+ , K^+ , NH_4^+) se nukleové kyseliny sráží za vzniku agregátu, který při odstředění sedimentuje na dně zkumavky. Sraženina se promyje 70% ethanolem, aby byly odstraněny soli, které se srazily spolu s DNA (Raclavský, 2003; Šmarda, 2003). Purifikace DNA může být provedena i na chromatografických kolonkách. Kolonky bývají vsazeny do mikrozskumavek 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 odmyvají. Použitím jiného pufru se pak DNA uvolní z nosiče. V současnosti 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, 2003).

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, 2003).

Cílem této práce bylo vytvoření nového originálního pracovního 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 má vazbu na průkaznou a spolehlivou detekci, identifikaci a kvantifikaci zdravotně i technologicky nežádoucích bakterií negativně ovlivňujících bezpečnost a jakost dohříváných sýrů a produktů z nich vyrobených.

Materiál a metody

Použití dohříváných sýrů pro nový pracovní postup

Pro nový pracovní postup izolace celkové bakteriální DNA byly použity sýry tvrdé a polotvrdé ve strouhané formě. Konkrétně se jednalo vzorky sýru s vysokodohříváním sýřeninou typu Ementál (45 % t. v s.) a vzorky sýrů s nízkodohříváním sýřeninou typu Eidam (30 % t. v s.), s různými obsahy sušiny a mléčného tuku v sušině. Sýry byly zakoupeny v tržní síti České republiky.

Návrh nového pracovního postupu izolace celkové bakteriální DNA ze sýrů s dohříváním sýřeninou

Nový originální pracovní postup pro izolaci celkové bakteriální DNA ze sýrů s dohříváním sýřeninou je uveden v následujících 19 bodech a je doplněn o dvě praktické poznámky.

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 (přibližně 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 odstředují se po dobu 10 min, při teplotě 4 °C a 13 552 × 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 Eppendorfově zkumavce (High Pure PCR Template Preparation Kit, Rosche s.r.o., CZE).

9. Odstřeďuje se 2 min při pokojové teplotě, a při 7168 × g.
10. Slíje 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 2 × koncentrovaného pufru pro proteinasu K (30 mM Tris-HCl, pH 8.0) 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 (tzn. fenolu nasyceného soli/salt saturated phenol) a 600 µl směsi chloroformu a isoamylalkoholu (v poměru 24 : 1) a důkladně se promíchá.
16. Zkumavky Falcon se vyváží a odstřeďují se po dobu 10 min, při teplotě 4 °C a 13 552 × g.
17. Opatrně se odebere horní vodná fáze (přibližně 1 ml) do nové 15 ml zkumavky značky Falcon a přidá se 2,5 objemu 2% LiClO₄ v acetonu (přibližně 2,5 ml). Dojde k vysrážení DNA.
18. Odstřeďuje se po dobu 10 min, při teplotě 4 °C a 13 552 × g.
19. Odstraní se supernatant a vysušený sediment se rozpustí v 60 µl 10 mM roztoku Tris (pH 8,0).

Poznámky k pracovnímu postupu

- Poznámka k bodu 2. Čím je podíl tuku v sušince testovaných vzorků pevných potravinových matric vyšší, tím snadněji se vytvoří homogenní suspenze.
- Poznámka k bodu 15. 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.

Ověření kvality a množství celkové bakteriální DNA izolované z dohříváných sýrů

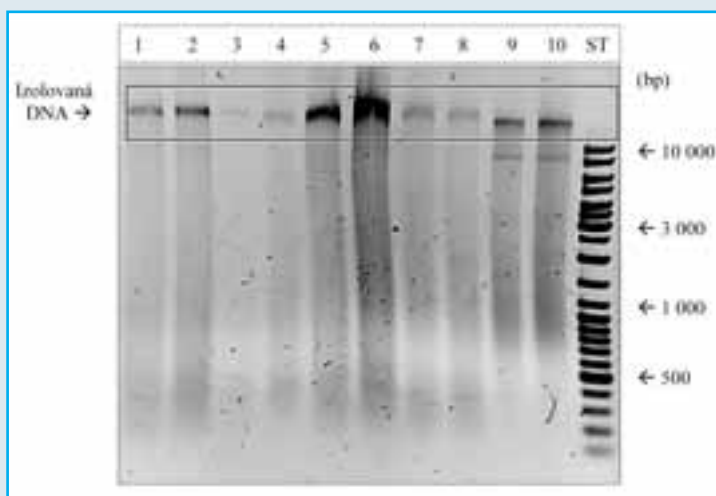
Kvalita a celistvost celkové bakteriální DNA izolované z dohříváných sýrů byla ověřena elektroforeticky. Na gel byly dávkovány vzorky DNA (5 µl). Jako standard byl použit GeneRuler DNA Ladder Mix (5 µl) (Thermo Scientific, USA), jehož specifikace je uvedena na Obr. 1. Jednotlivé bandy standardu přesně definovaly množství DNA a na základě těchto údajů se dala odhadnout koncentrace izolované DNA. Kontrolní elektroforéza byla uskutečněna v agarosovém gelu (1 % hm.) (Sigma, USA) při konstantním napětí 60 V. Doba elektroforézy se lišila

podle použité velikosti gelu (byly nalaty různé velikosti gelů) a trvala přibližně 75-90 min. Přesná koncentrace a čistota DNA byla stanovena také spektrofotometricky (spektrofotometr Ultrospec™ 2100 pro, Amersham Biosciences Corp., USA), a to měřením absorbance při vlnové délce 235 nm, 260 nm a 280 nm.

Výběr, kultivace, stanovení počtu buněk a uchování kmenů *Acinetobacter* spp.

V souvislosti s cílenou kontaminací testovaných sýrů byl pro experimenty vybrán sbírkový kmen *A. baumannii* CCM 4353 (původem z pasterovaného mléka, izolovaný na průmyslovém závodě OLMA a.s.) a již dříve identifikovaný kmen *A. johnsonii* O9/328 (původem ze syrového mléka/cisterny č. 7, izolovaný na nejmenovaném mlékárenském průmyslovém závodě v České republice) (Šviráková a kol., 2015a). Důvodem byl fakt, že se acinetobakterie v mlékárenské výrobní praxi vyskytují relativně často jako kontaminanti se statutem technologicky nežádoucích bakterií (Šviráková a kol., 2015a). Kmeny byly uloženy do Sbírkvy mikroorganismů na Ústavu konzervace potravin VŠCHT Praha.

Kmeny byly aerobně kultivovány v Trypton-sójovém bujónu (Merck KGaA, DEU), za individuálních teplotních podmínek (*A. baumannii* CCM 4353 byl kultivován při teplotě 37 °C a kmen *A. johnsonii* O9/328 při teplotě 25 °C), po dobu 18 h. Počty buněk byly následně zjištěny plotnovou metodou (technikou přelivu) (ČSN EN ISO 7218, 2008), po 72h aerobních kultivacích na Trypton-sójovém agaru (Merck KGaA, DEU), při individuálních teplotách. Kmeny byly během experimentů uchovávány v chladničce při teplotě 8 °C, a po ukončení experimentů zamrazeny do glycerolu a uchovávány při teplotě -20 °C v mrazicím boxu.



Obr. 1 Příklad ověření přítomnosti celkové bakteriální DNA (o velikosti přibližně 40-50 kbp) izolované ze vzorků vysokodohříváného sýra typu Ementál (45 % t. v s.) a vzorků nízkodohříváného sýra typu Eidam (30 % t. v s.): 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).

Tab. 1 Počet buněk kmenů *Acinetobacter* spp. použitých pro modelovou kontaminaci vzorků nízkodohřivaného sýra typu Gouda (48 % t. v. s.) v laboratorních podmínkách

Označení vzorku/ vzorkovnice	Označení kmene	Počet buněk (KTJ g ⁻¹)
Gouda A	<i>Acinetobacter baumannii</i> CCM 4353	1,6 · 10 ⁵
Gouda B	<i>Acinetobacter baumannii</i> CCM 4353	9,7 · 10 ⁵
Gouda C	<i>Acinetobacter johnsonii</i> 09/328	2,0 · 10 ⁵
Gouda D	<i>Acinetobacter johnsonii</i> 09/328	8,0 · 10 ⁵
K	–	–

K... kontrolní vzorek sýra nekontaminovaný kmenem *Acinetobacter* sp.

Výběr dohřivaných sýrů a jejich kontaminace kmeny *Acinetobacter* spp.

K experimentům byly použity vzorky nízkodohřivaného sýra typu Gouda (48 % t. v. s.) zakoupeného v tržní síti České republiky. V laboratorních podmínkách byl sýr ručně nastrouhán na struhadle a rozdělen do 5 vzorkovnic po 40 g. Obsah vzorkovnice "K" představoval kontrolní vzorek. Vzorky sýra (Gouda A, Gouda B, Gouda C a Gouda D) umístěné do čtyř vzorkovnic byly modelově kontaminovány (inokulum 1 %) kmeny *Acinetobacter* spp., o různých počtech buněk v řádu 10⁵ KTJ g⁻¹ (viz Tab. 1), a poté podrobeny dalším vyšetřením.

Detekce bakterií rodu *Acinetobacter* z cíleně kontaminovaných vzorků dohřivaného sýra pomocí metody PCR s rodově specifickými primery

Pro detekci bakterií rodu *Acinetobacter*, kterými byly testované vzorky nízkodohřivaného sýra typu Gouda (48 % t. v. s.) cíleně kontaminovány, byla použita metoda PCR s rodově specifickými primery AcinetoF1 a AcinetoR2 (jejich sekvence viz Tab. 2). Primery byly originálně navrženy dr. Jürgenem Felsbergem, CSc. a Ing. Markétou Jelínkovou, Ph.D. na Mikrobiologickém ústavu AV ČR, v. v. i, na Středisku sekvenování DNA (Šviráková a kol., 2015b; Šviráková a kol., 2016). Finální PCR produkt měl velikost 1228 bp.

Tab. 2 Rodově specifické primery pro identifikaci bakterií rodu *Acinetobacter* použité pro PCR (originální návrh primerů: dr. Jürgen Felsberg, CSc. a Ing. Markéta Jelínková, Ph.D., MBÚ AV ČR, v. v. i, Středisko sekvenování DNA) (Šviráková a kol., 2015b; Šviráková a kol., 2016)

Označení primeru	Sekvence 5' - - 3'
Forward: AcinetoF1	GGT GAG TAA TRC TTA GGA ATC TG
Reverse: AcinetoR2	CCT TAG CGA TCA TTA GCG CCT AG

Podmínky kontrolní PCR pro detekci a identifikaci bakterií rodu *Acinetobacter*

Reakce PCR probíhala v objemu 50 µl a obsahovala 25 µl Combi PPP Master Mix (Top-Bio s.r.o, CZE), 20 µl PCR H₂O, 2 µl forward a reverse primeru (10 µmol.l⁻¹) a 1 µl DNA (40 ng). Individuální PCR probíhala za dále popsaných podmínek v 6 krocích. Krok 1: počáteční denaturace: 95 °C po dobu 5 min. Poté následovalo 40 cyklů s ampli-

fikačním profilem: krok 2: 95 °C po dobu 45 s (denaturace), krok 3: 67 °C po dobu 45 s (nasedání primerů), krok 4: 72 °C po dobu 90 s (prodlužování řetězce); krok 5: konečné dosyntetizování řetězce: 72 °C po dobu 5 min. Krok 6: reakce PCR byla ukončena při teplotě 4 °C.

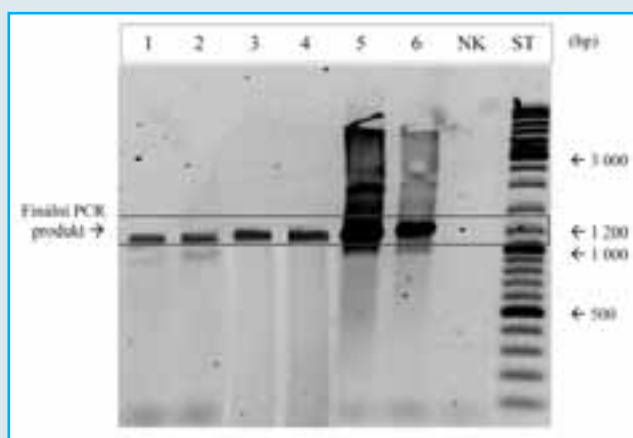
Výsledky a diskuse

Ověření kvality a množství celkové bakteriální DNA izolované ze vzorků dohřivaných sýrů a ověření přítomnosti DNA u bakterií rodu *Acinetobacter*, jimiž byly vzorky dohřivaných sýrů modelově kontaminovány

První část výstupů uvedená v této části představuje výsledky z uskutečněných experimentů týkajících se ověření kvality a množství celkové bakteriální DNA izolované z vybraných vzorků dohřivaných sýrů typu Ementál a Eidam, které jsou presentovány na Obr. 1.

Druhá část výstupů představuje výsledky z experimentů pro ověření přítomnosti DNA izolované z bakterií rodu *Acinetobacter*, kterými byly vybrané vzorky dohřivaného sýra typu Gouda v laboratorních podmínkách modelově kontaminovány, a které jsou uvedeny na Obr. 2.

Pro případy zpětného ověření přítomnosti DNA, presentované na Obr. 1 a Obr. 2, byla použita kontrolní elektroforéza jako separační technika, založená na principu separace nabitých molekul v elektrickém poli. Velikost DNA (nebo jejího fragmentu) byla určena srovnáním její elektroforetické pohyblivosti s elektroforetickou pohyblivostí molekul DNA (nebo jejich fragmentů) o známé velikosti, tedy se standardem o známé velikosti (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific, USA). Molekuly bakteriální DNA byly na agarosovém gelu detekovány jako proužky (bandy), jejichž intenzita byla úměrná koncentraci bakteriální DNA.



Obr. 2 Gelová elektroforéza produktů PCR (o velikosti 1228 bp) demonstrující přítomnost DNA bakterií rodu *Acinetobacter*, jimiž byly vzorky dohřivaného sýru typu Gouda (48 % t. v. s.) cíleně kontaminovány; pozice na gelu 1-6): 1) Gouda A, 2) Gouda B, 3) Gouda C, 4) Gouda D, 5) *A. baumannii* CCM 4353 (36 ng), 6) *A. johnsonii* 09/328 (28 ng), NK) negativní kontrola, ST) standard GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific, USA)

Jak je vidět z Obr. 1, u všech 8 vyšetřovaných vzorků vysokodohříváných sýrů typu Ementál (označených jako A-H) a dvou vzorků nízkodohříváných sýrů typu Eidam (označených jako A a B) byla zpětně ověřena přítomnost celkové bakteriální DNA o velikosti přibližně 40-50 kbp, která z nich byla s využitím nově navrženého pracovního postupu izolována. Aby bylo možné určit přesnou velikost vyizolované chromozomální DNA, bylo by třeba použít pulzní elektroforézu, která však nebývá běžným vybavením laboratoří. Použitý velikostní standard GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific, USA) byl pro tento typ experimentů vhodně zvolen, jelikož se běžně používá. Ohraničený band nad úrovní horního fragmentu standardu o velikosti 10 kbp byl považován za důkaz přítomnosti vyizolované chromozomální DNA v 1% agarosovém gelu. Slabý "smír" o velikosti 9 kb na gelu v pozicích vzorků 9 a 10 poukazyval na mírnou degradaci DNA.

Z Obr. 2 je patrné, že kontrolní elektroforéza finálních produktů PCR o velikosti 1228 bp demonstrující přítomnost DNA bakterií rodu *Acinetobacter*, kterými byly čtyři vzorky nízkodohříváného sýru typu Gouda (označené jako: Gouda A, Gouda B, Gouda C a Gouda D) modelově kontaminovány, proběhla s pozitivním výsledkem u všech testovaných vzorků. Byly také detekovány produkty PCR po amplifikaci u kontrolních kmenů *A. baumannii* CCM 4353 (36 ng) a *A. johnsonii* O9/328 (28 ng) (viz Obr. 2). Při izolaci chromozomální DNA byla izolována veškerá DNA, ovšem podíl specifické chromozomální DNA náležející bakteriím rodu *Acinetobacter* nebylo možné určit. K tomu určení následně posloužila metoda PCR se specifickými primery designovanými pro rod *Acinetobacter* (viz část Materiál a metody, Detekce bakterií rodu *Acinetobacter*). Pro PCR byla jako templát použita DNA o výchozím množství srovnatelným s celkovou DNA, aby bylo možné zjistit přibližné poměrné zastoupení DNA bakterií rodu *Acinetobacter* na základě přítomnosti a intenzity PCR produktů očekávané velikosti.

Originalita nového pracovního postupu izolace celkové bakteriální DNA

Na základě klasické fenol-chloroformové extrakce DNA (Kirby, 1956) byl v rámci této práce vyvinut postup izolace celkové bakteriální DNA ze vzorků dohříváných sýrů, s praktickou realizací v nastrouhané formě. Navržený postup je unikátní díky opakovanému střídání extrakčních/izolačních a čistících kroků. Na mechanickou a chemickou homogenizaci výchozího materiálu střídavě navazují kroky pro odstranění nežádoucích složek materiálu a buněčné hmoty, následované čistícími postupy vzniklého extraktu. Během nich se střídají chemické a enzymatické kroky. Výsledkem tohoto procesu je získání DNA v dostatečné koncentraci a kvalitě, přičemž cena izolace je ve srovnání s komerčními soupravami nižší. Tento jednoduchý a účinný izolační postup zahrnuje 5 stěžejních, dále zevrubně popsáných kroků A-E. Podle § 2, odst. 1, písm. b) a písm. c) zákona č. 130/2002 Sb. se jedná o zcela nově vytvořený, neznámý, pracovní postup.

- A. Homogenizace testovaného vzorku sýru pomocí skleněných kuliček v roztoku dihydrátu citrátu trisodného.
- B. Lyze bakteriálních buněk pomocí lysozymu a současné odstranění molekul RNA pomocí enzymu RNasy A.
- C. Opracování lyzátu pomocí enzymu proteinasy K.
- D. Extrakce DNA pomocí fenol-chloroformové směsi.
- E. Závěrečná precipitace DNA roztokem LiClO₄ v acetonu. Tento postup, který je rychlejší a účinnější ve srovnání s precipitací etanolem nebo isopropanolem, byl vyvinut dr. Jürgenem Felsbergem, CSc. na Mikrobiologickém ústavu AV ČR, v.v.i. a je připraven k publikování.

Realizace nového pracovního postupu izolace celkové bakteriální DNA

Nový pracovní postup obsahuje laboratorní kroky a doporučení pro vhodnou, účinnou a systematickou kontrolu sýrů polotvrdých a tvrdých, konkrétně sýrů s nízkodohřívánou sýřeninou (typu: Eidam, Gouda, Čedar, Tylžský sýr aj.) a sýrů s vysokodohřívánou sýřeninou (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 nežádoucích bakterií, a případně také zdraví prospěšných bakterií, pomocí metody izolace celkové bakteriální DNA, pro následnou molekulárně biologickou analýzu.

Ekonomické aspekty nového pracovního postupu izolace celkové bakteriální DNA

V současnosti je v oblasti potravinářství, včetně mlékárenského průmyslu, kladen důraz nejenom na průmyslovou výrobu zdravotně bezpečných a jakostních výrobků, ale také na ekonomický dopad jejich výrob. Nedostatečná mikrobiologická kvalita vstupních potravinových surovin může negativně ovlivnit jakost koncových výrobků, pokud jsou tyto kontaminovány technologicky nežádoucími bakteriemi, způsobujícími závažné senzorycké a texturní změny projevujícími se ve formě různých vad a defektů, na jejichž odstranění se musí vynaložit nemalé finanční prostředky. Ke zlepšení zdravotní bezpečnosti, hygienické nerizikovitosti a požadované jakosti potravinových surovin a výrobků by mělo docházet nejenom na základě jednorázových kontrol, ale především v rámci plánovaného periodického skríningu, za pomoci erudovaných pracovníků kontrolních laboratoří ovládajících techniky moderních detekčních metod, mezi které se řadí mimo jiné i metody z oblasti molekulární biologie.

Závěr

Výsledky této práce potvrdily, že pro nový originálně navržený pracovní postup izolace celkové bakteriální DNA jsou vhodné sýry polotvrdé a tvrdé ve strouhané formě. Tímto pracovním postupem je vhodné izolovat DNA především ze sýrů s nízkodohřívánou sýřeninou (typu: Eidam, Gouda, Čedar, Tylžský sýr aj.) a ze sýrů s vysokodohřívánou sýřeninou (typu: Ementál, Moravská bochník, Parmezán, Pecorino aj.).

vanou sýřeninou (typu: Ementál, Moravský bochník, Parmezán, Pecorino aj.), s různými obsahy sušiny a mléčného tuku v sušině. Postup má omezenou použitelnost pro sýry čerstvé, měkké, plísňové, tavené, a také pro tvarohy.

Postup je vhodný jak pro použití v kontrolních laboratořích, tak ve vědecko-výzkumných laboratořích, včetně kontrolních laboratoří dozorových orgánů a zkušebních laboratoří poskytujících klientům analýzy na komerční bázi, s hlavním cílem jištění zdravotní bezpečnosti, technologické nerizikovitosti a požadované jakosti dohříváných sýrů. Další přínos postupu spočívá v reálném snížení ekonomických nákladů při léčbě osob s alimentárními onemocněními či při likvidaci neshodných šarží výrobků - dohříváných sýrů.

Poděkování

Tato práce byla podpořena Ministerstvem zemědělství, Národní agenturou pro zemědělský výzkum, projektem QJ1210300 (2012-2016, MZE/QJ), v programu QJ - Komplexní udržitelné systémy v zemědělství na období 2012-2018 "KUS", s dobou řešení projektu 04/2012-12/2016.

Práce byla dále podpořena Ministerstvem zemědělství, Národní agenturou pro zemědělský výzkum, projektem QK1710156 (2017-2021, MZE/QK), v programu QK - Program aplikovaného výzkumu Ministerstva zemědělství na období 2017-2025 "ZEMĚ", s dobou řešení projektu 02/2017-12/2021.

Autoři článku děkují Ing. Markétě Jelínkové, Ph.D. (Mikrobiologický ústav Akademie věd České Republiky, v. v. i., Středisko sekvenování DNA) za cenné rady a připomínky při poskytnutých odborných konzultacích.

Literatura

- ASUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A., STRUHL, K. *Current Protocols in Molecular Biology*, sv. 1. John Wiley & Sons, Inc., New York, **2003**.
- ČSN EN ISO 7218. *Mikrobiologie potravin a krmiv - Všeobecné požadavky a doporučení pro mikrobiologické zkoušení*, 68. Praha, Český normalizační institut, **2008**.
- KIRBY, K. S. A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. *Biochemical Journal*, **1956**, *64*, 405.
- KŘÍŽOVÁ, J., ŠPANOVÁ, A., RITTICH, B., HORÁK D. Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres for genomic DNA isolation. *Journal of Chromatography A*, **2005**, *1064*, 247-253.
- 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.
- MONNET, C., BOGOVIĆ 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**.

- MUSILOVÁ, J., GLATZ, Z. Metabolomika - základní pojmy, strategie a metodologie. *Chemické listy*, **2011**, *105*, 745-751.
- NEČAS, O. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*, 3. vyd. H & H, Jihlava, **2000**.
- 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 18. 5. 2018).
- 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.
- RACLAVSKÝ, V. Izolace nukleových kyselin. Ústav biologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, **2003**. <http://biologie.upol.cz/metody/> (staženo 18. 5. 2018).
- ROZSYPAL, S. Nukleové kyseliny. *Úvod do molekulární biologie I*, 4. vyd., kap. 1.3, 31-77. Rozsypal, Brno, **2006**.
- SOUKUP, F. Molekulární genetika. *Lékařské biologie a genetika II*, 1. vyd., 41-62. Karolinum, Praha, **2005**.
- ŠMARDA, J. *Genetika pro gymnázia*, 1. vyd. Fortuna, Praha, **2003**.
- ŠVIRÁKOVÁ, E., MÜHLHANSOVÁ, A., NĚMEČKOVÁ, I., JUNKOVÁ, P., PURKRTOVÁ, S., JELÍNKOVÁ, M., FELSBURG, J.: Identifikace technologicky rizikových bakterií rodu *Acinetobacter*. *Mlékařské listy - Zpravodaj*, **2015a**, *150*, XIV-XX.
- 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, **2015b**.
- 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 přehledky sýrů 2016, Praha, 19. - 20. 1. 2016. V: *Sborník Celostátní přehledky sýrů 2016 - Výsledky přehledek a sborník konference Mléko a sýry* (Štětina J., Čurda L., ed.), 136-140. VŠCHT Praha, Praha, **2016**.
- VONDREJS, V., STORCHOVÁ, Z. *Genové inženýrství I*, 1. vyd. Karolinum, Praha, **1997**.
- ZÁKON č. 130/2002 Sb. o podpoře výzkumu a vývoje z veřejných prostředků a o změně některých souvisejících zákonů (zákon o podpoře výzkumu a vývoje), částka 56, str. 3182-3204, v aktuálně platném znění. Sběrka zákonů **2002**, Česká republika.

Korespondenční autor: Ing. Eva Šviráková, Ph.D.,

Ústav konzervace potravin,

Fakulta potravinářské a biochemické technologie,

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,

Technická 3/5, 166 28 Praha 6 - Dejvice, Česká republika,

e-mail: eva.svirakova@vscht.cz

Přijato do tisku: 22.5.2018

Lektorováno: 14.6.2018