



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Optimalizace izolace DNA z rostlin máku a makových výrobků.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: **ZDRAVOTNÍ LABORANT**

Autor: Václav Zahradník

Vedoucí práce: Ing. Irena Hoštičková

České Budějovice 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Optimalizace izolace DNA z rostlin máku a makových výrobků jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3. 5. 2019

Poděkování

Rád bych tímto poděkoval Ing. Ireně Hoštičkové, za podporu při psaní této bakalářské práce a za její cenné rady jak v oblasti úpravy textu, tak při práci v laboratoři. Dále bych chtěl poděkovat Biotechnologickému centru Zemědělské fakulty JU, za poskytnutí izolačních kitů, chemikálií, vzorků a laboratoří pro uskutečnění této bakalářské práce.

Optimalizace izolace DNA z rostlin máku a makových výrobků

Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá zhodnocením vybraných izolačních metod DNA na vybraných vzorcích máku, za účelem zhodnocení kvality a kvantity vyizolované DNA a vybrání metod, které by mohli být v budoucnu plošně použity při testování padělání máku v potravinách. V Literární rešerši jsou zmíněné metody izolace a způsoby hodnocení. Metodika je dále zaměřena na izolaci za použití jak firemně dostupných kitů, tak klasických metod (CTAB-PVP), zhodnocení získaných vzorků pomocí spektrofotometrického měření a PCR reakce s následnou elektroforézou na gelu. Z výsledků je zřejmé, že jako nejlepší metody se jeví klasické metody CTAB modifikované pro rostliny. Já ovšem tyto metody nedoporučuji kvůli náročnosti při práci a přikláním se k firemně dodávaným kitům, které jsem testoval.

Klíčová slova

mák; makové produkty; PCR metoda; DNA izolace; kvalita DNA

Optimalisation of DNA isolation from opium poppy plants and poppy products.

Abstract

The thesis deals with the evaluation of selected DNA isolation methods on the selected samples of poppy, to evaluation the quality and the quantity of isolated DNA and select methods, which could be used in the future for testing forgery poppy in the food. There are mentioned methods of isolation and methods of evaluation in the literature research. The methodology is focused on isolation using kits and conventional methods (CTAB-PVP), evaluation of obtained samples by spectrophotometric measurement and PCR reaction followed by gel electrophoresis. It is obvious from the results that classical CTAB-PVP methods modified for plants appear to be the best methods. However, I do not recommend these methods because of the difficulty at work and I am inclining towards the company-supplied kits I have tested.

Key words

poppy; poppy products; PCR method; DNA isolation; DNA quality

1	Úvod.....	7
2	Literární rešerše	8
2.1	Mák setý (Papaver somniferum)	8
2.2	Deoxyribonukleová kyselina (DNA)	9
2.3	Izolace DNA z materiálu.....	17
2.4	Zjištění kvality a kvantity vyextrahované DNA	20
2.5	Polymerázová řetězová reakce	21
2.6	Elektroforéza DNA	24
3	Hypotézy a cíl práce	29
3.1	Hypotézy	29
3.2	Cíle práce	29
4	Materiál a metody	30
4.1	Použitý materiál	30
4.2	Metody izolace DNA	30
4.3	Spektrofotometrické stanovení množství a kvality vyizolované DNA.....	37
4.4	Polymerázová řetězová reakce	38
4.5	Elektroforéza	39
5	Výsledky	41
5.1	Modifikovaná metoda pomocí CTAB-PVP pro rostliny	41
5.2	Metoda pomocí CTAB-PVP modifikovaná pro rostliny – zkrácená verze.....	42
5.3	Metoda pomocí Izolačního kitu NucleoSpin® Plant II od firmy Macherey-Nagel (D)	43
5.4	Metoda pomocí Izolačního kitu NucleoSpin® Food od firmy Macherey-Nagel (D)	44
5.5	Instrumentální metoda na přístroji MagCore pomocí kitu 401	46
6	Diskuze	48
7	Závěr	51

1 Úvod

Problematika falšování, či nepovolená úprava surovin je s lidstvem spjata již od nepaměti. Molekulární metody zkoumání pravosti, nebo nezávadnosti použitých surovin, u některých plodin bohužel zatím nejsou zavedeny, či alespoň podpořeny ve výzkumu nadřazeným ministerstvem. Jako jeden z příkladů je mák setý, u nás hojně využívaná rostlina, která nemá striktně zavedené metody analýzy DNA pro zjištění pravosti. Bohužel v neposlední době se objevují stále větší záchyty, kdy je odrůda máku setého, která je určena pro potravinářské účely zaměněna za levnější odrůdu pěstovanou pro technické účely.

2 Literární rešerše

2.1 Mák setý (*Papaver somniferum*)

2.1.1 Popis a stavba

Mák setý je jednoletá rostlina, která dorůstá až do výšky 150 centimetrů. Má jednoduchý kořen a často namodrale ojíňenou lodyhu, ke které přisedají podlouhle vejčité, či laločnatě zubaté listy. Květy na dlouhých stopkách v době před rozkvětem utvářejí převis. Za květu jsou již přímé, v průměru často i 10 centimetrů veliké s lysým kalichem. Korunní plátky jsou zbarveny fialově, červeně, či růžově a na základně mají červenohnědou skvrnu. V květu se nachází velký počet tyčinek a blizna je 8-12 laločná. Semena mohou být černá, šedá, nebo bílá. Mák kvete od června do srpna (Haragsim O., 2007)

2.1.2 Pěstování

V Evropě, potažmo v České republice, se mák pěstuje a využívá již od nepaměti. Nejstarší nálezy na našem území jsou z oblasti severní Moravy. V současné době je mák vzhledem ke svému užitku, ale zároveň i ke svému zneužívání považován za rozporuplnou rostlinu. V některých zemích je jeho pěstování zakázané, v jiných se pěstuje nelegálně a v některých (včetně nás) je jeho pěstování regulováno legislativou (Novák J., 2007), kdy má soukromý pěstitel, který mák pěstuje na ploše větší než je 100 metrů čtverečních ohlašovací povinnost, a je povinen předat hlášení místně příslušnému celnímu orgánu v místě pěstování, písemně nebo elektronicky opatřené elektronickým podpisem pěstitele (Chybík J., 2009).

2.1.3 Základní obsažené alkaloidy

2.1.3.1 Morfin

Morfin byl izolován v prvním desetiletí 19. století lékárníkem Sertünerem z opia. Sám lékárník na sobě vyzkoušel jeho účinky a pojmenoval ho po řeckém bohu snů Morfeovi. Byť již byla připravena řada analogů a derivátů i v současnosti má veliké využití v terapii. Avšak velkým problémem v medicínské terapii je řada nežádoucích účinků na organismus. Mezi závažné nežádoucí účinky patří celkový útlum dechového centra, obstipace, nevolnost, zvracení a v neposlední řadě veliká návykovost na látku. Avšak stále je hojně využíván jako silná látka tišící bolest (Doležal M., 2013). Morfin svými

vlastnostmi na lidský organismus patří do skupiny léčiv nazývaných opioidní analgetika. Svou silou tišit bolest se dále řadí dle World Health Organization do podskupiny silných opioidů (Vorlíček J., et al., 2004).

Morfin je poměrně polární a bazický, v žaludku je téměř zcela ionizován a velmi špatně vstřebáván. Z toho důvodu se podává téměř výlučně injekčním podáním do žíly. I tímto podáním se vstřebává pouze částečně, z důvodu špatného průniku přes hematoencefalickou bariéru. Po průniku začíná ovlivňovat receptory v centrální nervové soustavě (Doležal M., 2013). Dávkování morfinu se upravuje, dokud dávka adekvátně neutiší bolest. U všech přípravků obsahujících morfin jako hlavní léčivou látku není znám tzv. stropový efekt¹ (Vorlíček J., et al., 2004).

2.1.3.2 Kodein

Kodein je alkaloid opia. Z chemického hlediska se jedná o methylnorfin. Analgetický účinek ve srovnání s předešlým morfinem je nepatrný, avšak kodein nemá typické účinky opiátů vedoucí k závislosti na látce. Účinek kodeinu se často využívá k terapii slabších bolestí v kombinaci s kyselinou acetylsalicylovou či paracetamolem (Lüllmann H., et al., 2004). Při perorální aplikaci se kodein velmi dobře vstřebává ze zažívacího traktu. Analgetický účinek trvá přibližně 6 hodin. V organismu je požitý kodein z 10% přeměněn na morfin, což je nejspíše důvod jeho analgetického účinku na organismus (Adam Z., 2005).

2.2 Deoxyribonukleová kyselina (DNA)

2.2.1 Někteří slavní vědci v oboru genetiky

Záhada dědičnosti fascinovala v polovině 19. století mnoho vědců. Není tedy divu, že právě v tomto období vznikaly největší objevy v nově vznikající vědě, která měla v úmyslu odhalit tajemství dědičnosti a v návaznosti na to i objevit DNA a popsat její struktury a funkce (Bédoyère C., 2006).

Gregor Mendel

Gregor Mendel jako velmi inteligentní nadaný hoch se i přes velkou bídu, ve které žili, dostal na gymnázium. Po úspěšných studiích ho kroky zavedli až do kláštera, kde se stal mnichem a právě zde prováděl své pokusy na hrachu (Hasan H., 2005). Při pokusu, kdy

¹ Další zvyšování dávky nevede ke zvýšení účinku léčiva

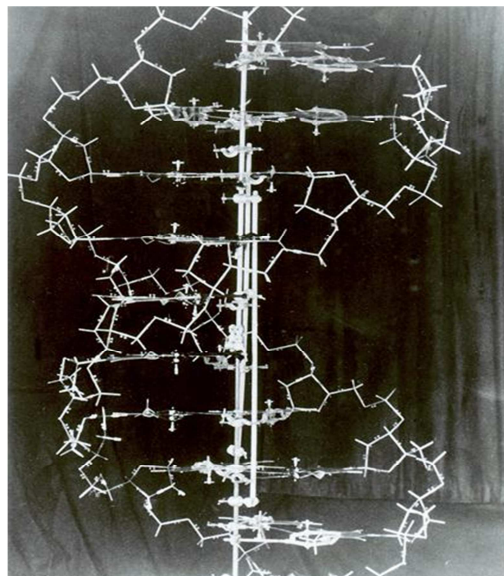
využil pyl z vysokého „T“ hrachu pro opylování nízkého „S“ hrachu, a tím získal semena, ze kterých vypěstoval rostliny, zjistil, že vyrostlé rostliny jsou pořád vysoké proti jeho očekávání, kdy předpokládal, že vyrostou rostliny o střední výšce, či směs vysokých a nízkých. Takto získané rostliny samoopyloval a při další výsadbě zjistil, že směs rostlin je 3:1 vysoké ku nízkým. Díky tomuto pokusu formuloval, že při dědičnosti jsou určité faktory, které jsou dominantní nad jinými faktory, například vyšší výška rostliny je dominantní nad nižší výškou. Každá rostlina dědí právě dva faktory a pro projev nedominantního faktoru, je zapotřebí zdědit oba faktory pro nízký vzrůst. Na základě těchto prací vydal publikace, ze kterých se poté zformulovali, nám dnes známe Mendelovy zákony dědičnosti. (Bédoyère C., 2006).

Walter Fleming

Walter Fleming byl německý biolog, který v roce 1879 objevil barvivo, které obarvovalo útvary v buněčném jádře, ale s ostatními buněčnými komponenty nereagovalo, ony komponenty nazval chromatin. Při zkoumání preparátů zjistil, že jakmile proces dělení započne, chromatin se začne uspořádat do vlákna podobných struktur, které nazval chromosomy. Tento proces také nazval slovem mitóza. Fleming dále viděl, že další krok je rozdělení každého chromosomu na dvě identická vlákna a každé jde na jeden konec buňky. Tímto pokusem Fleming objasnil postup dělení buněk a šíření informace z mateřských do dceřiných buněk (Haven K., 2007)

James D. Watson, Francis H. C. Crick, Maurice H. Frederics

Tato skupina tří vědců kolem roku 1953 pracovala na jednom z největších objevů v oblasti genetiky vůbec. Ze začátku věděli pouze to, že kostru tvoří kombinace cukerno-fosfátových atomů a věděli, že v řetězci se opakují sloučeniny adenin, guanin, thymin a cytosin. Objev byl oznámen 25. dubna 1953. Objev představoval vůbec první představení modelu struktury DNA zvané dvoušroubovice (Obrázek 1) a její kopírovací mechanismus. Tímto objevem



Obrázek 1 - Původní model DNA (Marx Ch., 2005)

odstartovali obrovský zájem o tuto látku od poznávání až po teoretické pokusy (Marx Ch., 2005).

2.2.2 Základní složky DNA

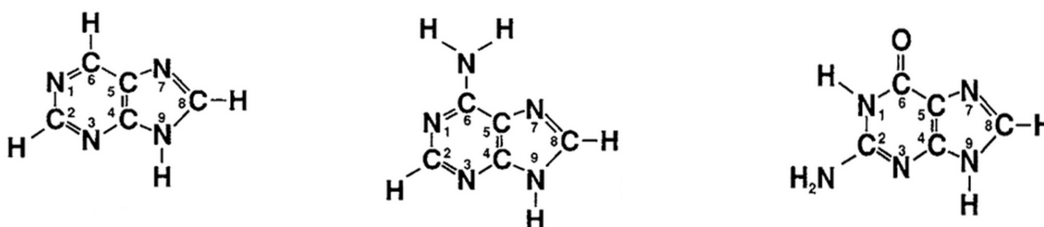
Základní stavební jednotkou jakékoliv DNA je nukleotid, který se skládá ze tří základních stavebních kamenů. Základem je cukr deoxyribóza případně ribóza pokud se jedná o ribonukleovou kyselinu (RNA). Další stavební část je fosfát. Poslední stavební kámen je nukleová báze. Nukleové báze rozlišujeme čtyři a to adenin, guanin, thymin a cytosin. Pokud se jedná o RNA je thymin vyměněn za uracil (Harvey R., Ferrier D., 2011).

2.2.2.1 Nukleové báze

Nukleové báze dělíme do dvou skupin. První skupina jsou purinové báze a druhá jsou pyrimidinové báze. Nukleové báze mají roli jako hlavní informační molekuly v buňce. Vše se děje díky diferenciatnímu umístění vodíkových můstků mezi donorem a akceptorem, což vede k unikátní strukturální identitě, která jim umožňuje sloužit jako genetická informace (Sinden R., 1994).

Purinové báze Adenin a Guanin

Jedná se o dvě rozdílné heterocyklické aromatické báze, kdy každá obsahuje purinový kruh (Obrázek 2). Syntéza těchto látek probíhá v buňce de novo vícestupňovou biochemickou reakcí. Jako konečný krok syntézy je právě rozlišení vznikající sloučeniny na adenin, nebo guanin. V případě, že se jedná o adenin (Obrázek 3), je na purin v pozici C6 navázána amino skupina (-NH₂). Pokud se jedná o guanin (Obrázek 4), je amino skupina navázána na pozici C2 a pozice C6 je doplněna o karbonylovou skupinu (Sinden R., 1994).



Obrázek 2–Purin (Sinden R., 1994) Obrázek 3–Adenin (Sinden R., 1994) Obrázek 4–Guanin (Sinden R., 1994)

Pyrimidinové báze Thymin, Cytosin a Uracil

Na rozdíl od předešlých dvou bází, tyto báze obsahují pyrimidinový kruh (Obrázek 5), což je šestičlenná heterocyklická aromatická organická sloučenina. Syntéza probíhá také de novo v buňce. Rozdíl v konečném kroku syntézy je takový, že pokud se jedná o thymin (Obrázek 6), na pozici C5 je navázána methylová skupina a na pozice C2 a C4 jsou navázány karbonylové skupiny. Cytosin (Obrázek 7) na rozdíl od thyminu nemá na pozici C5 navázanou methylovou skupinu a na pozici C4 má ještě amino skupinu. Uracil je velmi podobný thyminu, akorát s tím rozdílem, že nemá na pozici C5 methylovou skupinu. Uracil (Obrázek 8) se za běžných podmínek v DNA nevyskytuje, jedná se o pyrimidinovou bázi RNA, kde nahrazuje thymin (Sinden R., 1994).



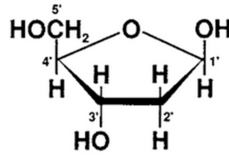
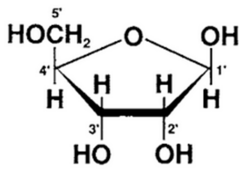
Obrázek 5 – Pyrimidin (Sinden R., 1994) Obrázek 6 – Thymin (Sinden R., 1994)



Obrázek 7 – Cytosin (Sinden R., 1994) Obrázek 8 – Uracil (Sinden R., 1994)

2.2.2.2 Cukerná složka

Zdroj deoxyribózy při biochemické syntéze nukleových bází je sloučenina nazvaná 5-phosphoribosyl pyrophosphate, který je odvozený od α -D-ribose-5-phosphate. V DNA nacházíme cukr β -D-2-deoxyribózu (Obrázek 10), který je derivát od β -D-ribózy (Obrázek 9). Rozdíl v látkách je ten, že na pozici 2' je hydroxyl v β -D-ribóze nahrazen vodíkem, a tím vznikne β -D-2-deoxyribóza. Tuto biochemickou reakci vykonává enzym zvaný ribonukleotid reduktáza. Cukerná část DNA je jednou z více flexibilních a dynamických částí celé molekuly. Po sloučení nukleové báze k cukerné části nazýváme sloučeninu deoxynukleosid (Sinden R., 1994)



Obrázek 9 - β -D-ribóza (Sinden R., 1994) Obrázek 10 - β -D-2-deoxyribóza (Sinden R., 1994)

2.2.2.3 Nukleotid

Nukleotid je chemická sloučenina, která se skládá z báze, cukerné složky a fosfátové skupiny. Každý nukleotid může mít jednu, dvě až tři fosfátové skupiny. Nukleotidy nalezneme jak v DNA, tak v RNA a v různých energetických sloučeninách (Sinden R., 1994). Ribonukleotidy jsou syntetizovány jako monofosfáty, které jsou následně převedeny na difosfáty a poté na trifosfáty. Před inkorporací do DNA musí být ribonukleotid difosfát ještě redukován na deoxyribonukleotid difosfát pomocí enzymu ribonukleotid reduktáza (Harvey R., Ferrier D., 2011).

Ribonukleotid reduktáza

Skládá se z dvou neidentických podjednotek R1 a R2 a jeho specifická práce jak bylo již zmíněno je redukce ribonukleotidů na deoxyribonukleotidy, proto se nachází ve všech žijících buňkách (Andersson K., 2008). Okamžitý donor atomů vodíku potřebných pro redukci 2-hydroxyl skupin jsou dvě sulfhydrylové skupiny obsažené v samotném enzymu, které při redukci vytvoří disulfidickou vazbu. Regenerace redukováného enzymu probíhá za pomoci thioredoxinu což je peptidový koenzym tohoto enzymu, který funguje jako donor vodíku pro enzym. Regenerace redukováného thioredoxinu probíhá již za pomoci sloučeniny $\text{NADPH} + \text{H}^+$ (Harvey R., Ferrier D., 2011).

2.2.3 Chemické vazby v DNA

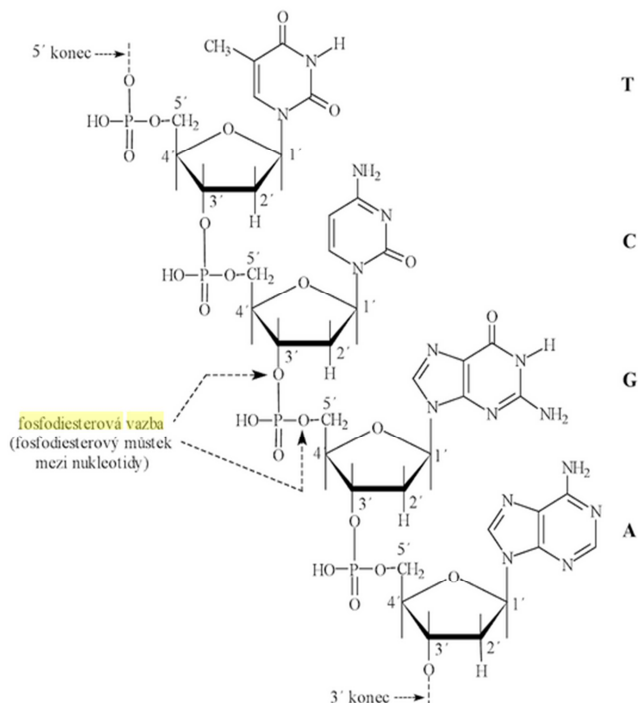
Glykosidová vazba

Vazbu, která vzniká mezi cukrem a jednou z bází, nazýváme vazbou glykosidovou respektive N-glykosidovou (Whitten K., et al., 2014). Báze, která byla takto navázaná, se může kolem vzniklé vazby volně otáčet. Rozlišujeme dva typy standardních konformací báze kolem vazby, a to syn a anti. Anti konformaci nalezneme téměř ve

všech formách DNA, na rozdíl od syn konformace, která se nachází výlučně pouze v Z-formě DNA (Sinden R., 1994).

Fosfodiesterová vazba

Nukleovou kyselinu můžeme nazvat jako polynukleotid, jelikož obsahuje veliké množství v řetězci za sebou jdoucích nukleotidů. Tyto nukleotidy jsou spojeny fosfátovou skupinou, která vytváří dvě esterové vazby. Toto spojení nukleotidů nazýváme jako fosfodiesterovou vazbu (Obrázek 11). Při vzniku této vazby je vždy dodržováno základní pravidlo, a to takové, že fosfát jednoho nukleotidu, který se nachází na 5 uhlíku, se za každé situace váže pouze na třetí uhlík v pentóze



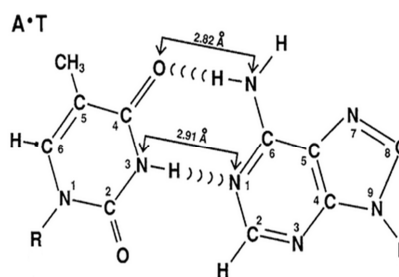
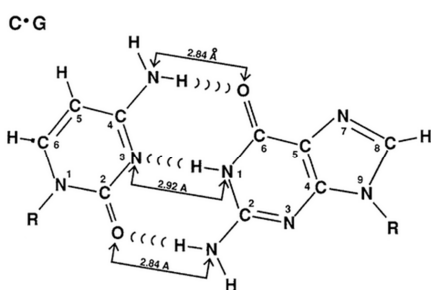
Obrázek 11 - Fosfodiesterová vazba mezi nukleotidy (Streblová E., 2012)

dalšího nukleotidu (Streblová E., 2013). Ze zmíněného pravidla je zřejmé, že kostra nukleové kyseliny poroste vždy směrem od 5' konce do 3' konce. Počet a hlavně pořadí postupně připojovaných nukleotidů určuje primární strukturu nukleové kyseliny (Beránek M., 2016). Celý tento proces řídí a koordinuje enzym, který se nazývá DNA polymeráza (Sinden R., 1994).

Vodíková vazba

Častěji nazývaná jako tzv. vodíkový můstek, je nejsilnější nevazebnou interakcí. Pro vznik můstku je nutný donor vodíkových můstků což je například skupina $-NH$, či $-SH$ a volný elektronový pár akceptorů například dusíku, nebo síry (Koolman J., Röhm K., 2012). Vazba vodíku s jedním ze zmíněných prvků je tak silně polární, že vazebný elektronový pár je velmi posunut k elektronegativnějšímu atomu. Vodík již nemá kolem jádra žádné další nevazebné elektrony, dokonce můžeme říci, že je to již téměř proton H^+ , díky čemuž může vytvořit interakci neboli můstek s volným elektronovým párem na atomu další molekuly (Streblová E., 2013). V nukleové kyselině hraje roli akceptoru

dušík a kyslík. Ač se zdá, že vodíkové můstky jsou slabé interakce, které se dají snadno rozrušit, opak je díky velkému množství těchto můstků v nukleové kyselině pravdou. Právě díky vodíkovým můstkům, které párují nukleové báze, může vzniknout ze samostatných řetězců dvoušroubovice DNA. V dvoušroubovici nacházíme dva různé páry a to Cytosin-Guanin (Obrázek 12), mezi kterými se nachází tři vodíkové můstky (2x O-H s délkou 2,84Å a 1x N-H s délkou 2,92Å) a Adenin-Thymin (Obrázek 13) se dvěma vodíkovými můstky (1x O-H s délkou 2,84Å a 1x N-H s délkou 2,91Å). Jakmile je dvoušroubovice sestavená, je pozoruhodně pevná. Každá individuální interakce je sice velmi slabá, jak bylo již zmíněno, ale v součtu dokáží vytvořit velmi odolnou a stabilní dvoušroubovici (Sinden R., 1994).



Obrázek 12 - Cytosin-Guanin pár (Sinder R., 1994) Obrázek 13 - Adenin-Thymin pár (Sinder R., 1994)

2.2.4 *Formy DNA*

Dvoušroubovice nukleové kyseliny se nachází ve více formách, které jsou mezi sebou více, či méně odlišné. Některé můžeme nalézt téměř všude, jiné jsou velmi specializované, či je jejich výskyt závislý pouze na umělé přípravě v laboratoři (Streblová E., 2012).

B-forma DNA

B-forma (Obrázek 15) nukleové kyseliny je jednou z nejhojněji se vyskytujících forem vůbec. Její nález byl uskutečněn kolem roku 1980 pomocí rentgenové difrakce jediného krystalu. Tato forma dvoušroubovice je pravotočivá. Pokud se podíváme na 3D model, vidíme, že páry nejsou všechny kolmé k ose šroubení, ale vykazují jev, který můžeme nazvat jako „kroucení vrtule“ kde páry neleží ve stejné rovině, ale jsou zkroucené s respektem k ostatním párům právě jako listy vrtule. Kromě toho, pokud se podíváme na osu šroubovice, všimneme si, že není přímá, ale mírně zakřivená, což dělá z centra

šroubovice relativně inertní místo pro ukládání genetických informací (Bates A., Maxwell A., 2005).

A-forma DNA

A-forma (Obrázek 16) a B-forma nukleové kyseliny nese pár společných znaků, což je například pravotočivost. Rozdíly lze nalézt v šířce šroubovice, kdy A-forma je širší přibližně o 3Å. Klíčový rozdíl je však v konformaci cukerné složky, která u B-formy směřuje dovnitř C2' a u A-formy C3'. Tato konformace se blíží podobě dvojité šroubovici RNA. Není jisté, zda se tato forma vyskytuje *in vivo*², ačkoliv její přítomnost byla navržena v některých vazebných místech pro transkripční faktor (Bates A., Maxwell A., 2005).

Z-forma DNA

Z-forma (Obrázek 17) je zcela odlišná od předchozích dvou už jen tím, že jako jediná je levotočivá. Název Z získala podle „Zig-zag“ fosfátové kostry. Na 3D modelu můžeme vidět, že hlavní žlábek tzv. major groove (Obrázek 14) téměř skoro zmizel na téměř plochý povrch, takže struktura obsahuje pouze jeden hluboký úzký žlábek. Výlučně v této formě můžeme naleznou syn konformaci glykosidické vazby (Sinden R. 1994). Předpokládá se, že výskyt této formy je pouze přechodný v průběhu buněčných procesů, jako je například transkripce (Bates A., Maxwell A., 2005).



Obrázek 14 - Ukázka tzv. major groove na B-formě (Baynes J., Dominiczak M., 2014)



Obrázek 15 - B-forma (Bates A., Maxwell A., 2005)



Obrázek 16 - A-forma (Bates A., Maxwell A., 2005)



Obrázek 17 - Z-forma (Bates A., Maxwell A., 2005)

² Výskyt v živém organismu.

2.3 Izolace DNA z materiálu

Ať se bavíme o rostlinném, či živočišném materiálu, většina metod jako startovní materiál vyžaduje jaderné buňky. Zahajovací krok je vždy tedy lýza buněk. Pokud se extrakce provádí z plné krve, využíváme ještě krok hemolýzy, který nám odstraní červené krvinky. Lýza je mnohdy uskutečněna pouhou inkubací s detergenty. Do směsi je tradičně přidávána Proteináza K, která inaktivuje uvolněnou DNázu a tím zabraňuje degradaci DNA. Z lyzátu je poté DNA izolována buďto organickou extrakcí, proteinovou precipitací, či vazbou na pevná média, záleží na metodě, kterou si zvolíme. Surová DNA je poté ještě několikrát promyta a pomocí precipitace či eluce získaná čistá DNA (Grody W. et al., 2009).

2.3.1 Fenol-chloroformová metoda

Tato metoda je považovaná za zlatý standard pro získání DNA o vysoké čistotě ze vzorku, kde je předpokládán nepatrný obsah DNA (vlasy, kostní vzorky). Metoda je stále hojně využívána i přes to, že je nutná práce s nebezpečnými chemikáliemi, jako je například fenol, který vyžaduje k použití digestoř. Práce je zároveň velmi manuálně náročná (Carracedo A., 2005). Lýza buněk je zahájena přidáním Tris (8.0) a proteinázy K. K lyzátu je dále přidána nasycená směs fenol/chloroform/isoamylalkoholu. Následuje krok centrifugace, při kterém je oddělena vodná fáze od organické. DNA nalezneme ve vodné fázi. Vodná fáze je opatrně přemístěna do čisté zkumavky. Takto získaná vodná fáze může být ještě několikrát přečištěna směsí fenol-chloroformu. Do takto získané surové DNA jsou následně přidány stejné objemové díly chloroformu a isoamylalkoholu, díky čemuž se zbavíme zbytkového fenolu. Následně se směs koncentruje pomocí ethanolu, či isopropanolu za přítomnosti octanu sodného, či octanu amonného, pro ethanol a chloridu sodného pro isopropanol. Získaná směs se poté nechá odpařit do sucha a následný precipitát, je hydratován vodou, či Tris-EDTA pufrem a inkubován do 50°C. Precipitát by neměl být přesušen, je poté obtížnější zpětná hydratace (Grody W. et al., 2009).

2.3.2 Vysolovací metoda

Vysolovací metoda je alternativa k fenol-chloroformové metodě, která nevyužívá nebezpečné chemikálie a není tak manuálně pracná. Metoda je založena na principu, že proteiny a ostatní buněčné kontaminanty precipitují v nasyceném solném roztoku díky jejich relativnímu hydrofobnímu charakteru na rozdíl od DNA. První krok je

samozejmě lýza za pomoci nasyceného roztoku soli, většinou se jedná o 6M chlorid sodný. Následná směs je odstředěna. Získaný supernatant obsahuje přečištěnou DNA a ostatní látky zůstanou obsaženy ve spodní vrstvě. Supernatant se opatrně přemístí do nové zkumavky a smíchá s dvojnásobným objemem čistého ethanolu, což zapříčiní vznik sraženiny DNA. Díky své jednoduchosti, je čistota získané DNA bohužel nesrovnatelně horší než u fenol-chloroformové metody (Grody W. et al., 2009).

2.3.3 Metody využívající adsorpci na pevný materiál

Na rozdíl od zmíněných dvou metod, tato metoda nevyžaduje precipitaci a rehydrataci DNA. Metoda má výhodu v malém množství vstupního materiálu, v řádech μg a μl . Metody jsou založené na selektivní adsorpci DNA na pozitivně nabitá skelná vlákna, nebo silikátovou membránu za přítomnosti vysoké koncentrace chaotropních solí jako je například guanidinium chlorid. Začíná se jako vždy lýzou za přítomnosti proteinázy K. Jediný rozdíl v prvním kroku v této metodě je krátká inkubace při lýze a teplota, která může být i pokojová. Po lýze je substrát přenesen na membránový filtr. Filtrace bývá často podpořena centrifugací, či vakuováním. Tradičně první membránový filtr propustí DNA a zachytí nečistoty a druhý membránový filtr zachytí surovou DNA. Pokud si přejeme DNA z membrány vyvázat, stačí na kolonku přidat pufr, který membránu zbaví pozitivního náboje a vytvoří negativní náboj, tím se vazby uvolní a DNA proteče do sběrné zkumavky pod kolonkou. Na trhu je mnoho kitů, které nabízejí široké spektrum použití pro různorodé materiály. Hlavní výhodou této metody je možnost její automatizace (Grody W. et al., 2009).

2.3.4 Extrakce DNA s využitím magnetů

Princip této metody je velmi podobný principu metody s využitím adsorpce na pevný materiál. Hlavní rozdíl mezi metodami je, že namísto použití filtrace či centrifugace k separaci DNA od nečistot, je použito magnetických kuliček, na které se naváže DNA ze vzorku. Postup metody je takový, že pomocí vysoké koncentrace chaotropních solí je započata lýza. Do lyzátu jsou přidány magnetické kuličky a taková směs je poté speciálně navrženými špičkami pipetována do speciálních promývacích pufrů obsahujících alkoholy, které z DNA odstraní nežádoucí nečistoty, popřípadě může být magnetickým polem přitáhnuta ke dnu zkumavky a být promývána pouze v jedné zkumavce. V přístrojové extrakci lze využít obou metod. Po promytí je DNA eluována do roztoku s nízkou koncentrací soli a odvázána z povrchu kuliček. Čistota a výtěžnost

této metody je oproti filtraci značně menší, ale jelikož není vyžadována žádná centrifugace či vakuování, metoda je velmi snadno automatizovaná. Další výhodou je, že nedochází k ucpávání filtrů, pokud se ve vzorku nachází mnoho pevných nečistot jako u předešlé metody, jelikož se zde žádné filtrační kroky nenacházejí (Grody W. et al., 2009).

2.3.5 Metoda využívající cetyltrimethylammonium bromid – CTAB metoda

Jedná se o poměrně starší metodu z roku 1961, ale s použitím několika modifikací dle potřeb je dnes stále hojně využívána pro extrakci DNA z jídla, krmiv, listů, semen, či zrn. Velké mínus této metody je relativně pracné provedení a použití toxických chemikálií například chloroformu, či fenolu, které vyžadují použití digestoře. Nejvyužívanější lyzační CTAB pufr obsahuje 2% CTAB, který slouží jako detergent, dále 20 mM EDTA využívány pro zachycování kovových iontů a tím zabránění poškození DNA, dále 1,4 M NaCl, který přispívá k rozpustnosti DNA, 100 mM Tris-HCl o pH 8,0. Při různých modifikacích je k CTAB pufru přidáván mercaptoethanol, proteináza K, N-phenacylthiazolium bromid, nebo polyvinylpyrrolidon v tomto případě hovoříme o metodě CTAB-PVP. Při výběru přidávaných chemikálií k CTAB pufru, je důležité posoudit klady a zápory, jaký vzorek využiji k extrakci a jaký výsledek z extrakce očekávám (Xu W., 2016). Po lýze následuje extrakce chloroform-isoamylalkoholem a precipitace komplexu CTAB-DNA alkoholem z vodné fáze. Vysušený získaný pelet DNA po centrifugaci je poté rozpuštěn v TE pufru (Weising K., 2005).

2.3.6 Metoda využívající dodecylsulfát sodný – SDS metoda, či extrakce dle Dellaporta

Tato metoda byla poprvé představena kolem roku 1983. Jedná se o obměnu CTAB metody. Rozdíl je ve složení lyzačního činidla, které obsahuje 1% SDS, 150 mM Tris-HCl o pH 8,0, 50 mM EDTA, 0,5M NaCl a 10 mM 2-mercaptoethanol. SDS zde funguje jako detergent a 2-mercaptoethanol jako biologický antioxidant ke snížení degradace DNA a snížení disulfidických vazeb. Lýza je většinou prováděna při 65°C několik hodin. Další postup je stejný jako u CTAB metody tj. nečistoty jsou odebrány pomocí organické extrakce (Xu W. 2016). Existuje modifikace této metody, kdy se při lýze přidá ještě 5M octan draselný a díky tomu není vyžadována žádná další organická extrakce (Weising K., 2005).

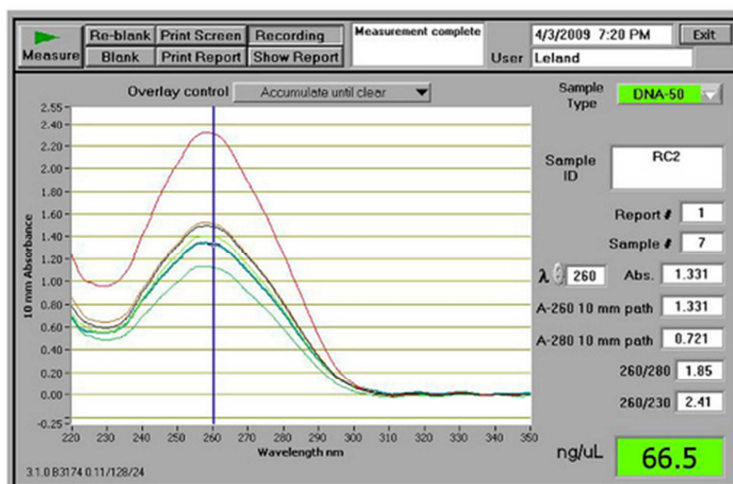
2.3.7 Extrakce pomocí Chelexu

Tato metoda je zvláště využívána ve forenzních laboratořích, jelikož k extrakci stačí i miniaturní vzorek (vlasy, krevní stopy, slinné stopy). Další nesporná výhoda je levné, rychlé a nenáročné provedení. Kontaminace je při práci minimální, jelikož celá izolace se děje prakticky v jedné zkumavce (Lawrence F., et al., 2007). Metoda je založena na klasické lýze buněk například proteinázou K a přidáním chemikálie zvané chelex. Jedná se o pryskyřici složenou ze styren divinylbenzen kopolyméru. Následně se směs přivede k varu, při kterém dojde ke zničení buněk a uvolnění DNA. Při varu slouží chelex k vychytávání nečistot, které by následně mohli interferovat, či znemožnit analýzu DNA. Následně je vzorek zcentrifugován a oddělen vzniklý supernatant s DNA. Metodu není možné provést, pokud extrahovaná DNA má být využita například pro RFLP, protože extrahovaná DNA se při varu rozbije na dva řetězce. Extrahovaný vzorek je vhodný pro metody založené na polymerázové řetězové reakci (PCR), kde tato skutečnost nijak nevadí, důležité je však kvalitní odstranění chelexu, jelikož se jedná o silný inhibitor PCR reakce (Norah R., Keith I., 2002).

2.4 Zjištění kvality a kvantity vyextrahované DNA

2.4.1 Spektrofotometrické měření

Základní a nejjednodušší metoda pro posouzení kvality a kvantity vyextrahované DNA je spektrofotometrické měření absorbance ultrafialového (UV) světla většinou od 220nm do 350nm s vyjádřením dvou poměrů absorbance a to A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230} , které nám charakterizují čistotu vzorku a vyjádřením kvantity



Obrázek 18 - Ukázka výsledku při použití metody NanoDrop (Conn P. 2012)

nukleové kyseliny většinou v ng/ μ l (Obrázek 18). Nukleové kyseliny jako je DNA a RNA a volné nukleotidy vykazují silnou absorbanci při 260nm. První poměr A_{260}/A_{280} nám ukazuje míru znečištění vzorku většinou proteiny nebo fenolem, jelikož tyto příměsi vykazují silnou absorbanci právě při 280nm, hodnota poměru by

pro čistý vzorek DNA měla být 1,8 a pro čistý vzorek RNA 2,0. Druhý poměr A260/A230 nám ukazuje míru znečištění vzorku většinou polysacharidy, či ostatními příměsemi. Hodnota poměru pro čistý vzorek by se měla pohybovat v kolem 2,0. V průběhu let byla tato metoda velmi rapidně modernizovaná až do dnešní podoby, kdy pro vlastní měření je vyžadovaná pouze kapka (1-2 μ l) zkoumaného vzorku, která se umístí na vyznačené místo na přístroji, tím odpadlo i využívání kyvet (Conn P., 2012)

2.4.2 Fluorometrické měření

Fluorometrické metody jako je například Qubit® mají pár výhod oproti spektrofotometrickému měření. První je výhoda toho, že lze rozlišit ssDNA od dsDNA. Další výhoda je schopnost měření dsDNA za současného ignorování RNA, či volných nukleotidů, což spektrofotometr nedokáže. Navíc tato metoda není nijak ovlivněna přítomností kontaminantů, jako jsou proteiny, soli a jiné organické látky. Další nespornou výhodou je větší přesnost při měření velmi malých koncentrací kdy UV metoda je použitelná přibližně od 2ng/ μ l, ale fluorometrická metoda již od 10pg/ μ l (Jennings W., 2017). Metody jsou založeny na použití speciálních barviv, které se specificky váží na to, co potřebujeme měřit, například jenom na dsDNA, tudíž nedochází ke zkreslení výsledků kontaminanty (Conn P., 2012).

2.5 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce dále jen PCR, je metoda, při které dochází k namnožení námi zvolené části DNA, či RNA. Dnes již plně nahradila dřívější metodu klonování v bakteriálním plasmidu. Metoda je tak citlivá, že lze amplifikovat jedinou molekulu DNA (Innis M., 1990). Metoda je dnes plně automatizovaná na přístrojích zvaných termocyclery a obsahuje tři základní kroky. Začátek reakce je denaturace typicky v rozmezí 94-97°C, díky tomu získáme volné řetězce DNA. Pak pokračuje část nazývaná hybridizace, při které je směs velmi rychle ochlazená na teplotu většinou v rozmezí 55-72°C. Teplota bývá povětšinou charakteristická podle použitých primerů. Po ochlazení dojde k nasednutí primerů na jednovláknovou DNA. Nakonec přichází na řadu krok elongace, při kterém je směs ohřata typicky na 72°C, při které dochází k odváznání nespecificky navázaných primerů. Přidaná DNA polymerára musí být tedy termostabilní. Po dokončení syntézy se celý cyklus několikrát opakuje, většinou 30-40 krát, kvůli získání velkého množství požadované DNA. Množství cyklů by nemělo převyšovat číslo 45, poté dochází k většímu množství nespecifického dosedání primerů.

Po dokončení PCR reakce je původní DNA ve vzorku téměř nezatelná oproti požadované (McPherson M., Møller S., 2006).

2.5.1 Chemikálie pro PCR

Všechny chemikálie bývají obsaženy ve směsi nazvané většinou „master mix“. Níže jsou uvedené nejdůležitější komponenty. Do mixu se dále přidává želatina, či hovězí sérový albumin, dále se jedná o detergenty například Tween 20 nebo Laureth 12. Další důležité složky, které již ale nejsou obsaženy v master mixu jsou primery (Innis M., 1990).

100 mM Tris-HCl pH 8,3

Jedná se o dipolární iontový pufr, který mění pH dle své teploty. Při reakci bude tedy pH kolísat od 6,8 a 8,3. Taq polymeráza má při nižším pH větší přesnost, je tedy doporučeno, pokud má být zajištěna vysoká přesnost, používat pufr například Bis-Tris propan u kterého se pH zase tak výrazně nemění (McPherson M., Møller S., 2006).

500 mM KCl

Napomáhá annealingu templátů. Je důležité ale nepřekročit doporučené koncentrace, vyšší koncentrace může vést ke vzniku anomálních produktů prostřednictvím nasedání primerů na neshodná místa (McPherson M., Møller S., 2006).

15 mM MgCl₂

Hořčík je jedním z nejvíce kritických komponentů při PCR reakci. Taq DNA polymeráza je závislá na výskytu volného hořčíku v koncentraci 1,2-1,3 ve formě Mg²⁺. Koncentraci volného hořčíku ovlivňuje koncentrace dNTP, je tedy velmi důležité vyvážit poměr a zvážit vždy klady a zápory, které vzniknou snížením, či zvýšením koncentrace jedné ze složek. V případě špatného výsledku z PCR reakce, je vhodné upravit tyto koncentrace (McPherson M., Møller S., 2006).

Deoxinukleotid trifosfát

Směs deoxinukleotidů by měla být neutralizovaná na pH 7,0 a jejich koncentrace změřena spektrofotometrickou metodou. Koncentrace v master mixu by měla být v rozmezí od 20-200 μM. Při nižších koncentracích je zabráněno chybám, které jsou zapříčiněné nespecifickým dosedáním (Innis M., 1990).

Tag DNA polymeráza

Jedná se o nejdůležitější složku, která startuje PCR reakci. Koncentrace je doporučena mezi 1-2,5 jednotkami na 100 μ l reakční směsi. Pokud je koncentrace příliš vysoká, dochází k nespecifickému dosedání, pokud je koncentrace příliš nízká, dochází k malému množství produktu (Innis M., 1990).

Primery

Doporučená koncentrace se pohybuje mezi 0,1 a 0,5 μ M. Typická délka primeru je kolem 18-28 nukleotidů s 50-60% zastoupením G+C. Základní podmínka je samozřejmě specifita primerů a vzájemná nekompatibilita. Do reakce jsou potřebné dva typy nazývané jako forward, který začíná od 5' konce a druhý reverse (Innis M., 1990).

2.5.2 Některé modifikace PCR

Horký start

Tato modifikace je používána pro zabránění nesprávného navázání primerů. Při této modifikaci jsou komponenty reakce aktivní až při dosažení dostatečné teploty pro správné dosedání primerů. Této schopnosti lze dosáhnout několika způsoby. Jako první způsob je navázání protilátky na DNA polymerázu, která ji inaktivuje. Po zahřátí směsi přibližně na 70°C se protilátka odváže a DNA polymeráza se aktivuje. Další způsob je chemicky upravená DNA polymeráza například AmpliTaq Gold™ DNA polymerase od společnosti PerkinElmer, která je aktivovaná dosažením teploty 95°C. Jako poslední možnost je zabalení DNA polymerázy do voskové kuličky například AmpliWax™ od firmy PerkinElmer. Princip je, že kulička při zvyšování teploty taje a při dosažení vysokých teplot vypustí aktivní DNA polymerázu (Singleton P., 2000).

TaqMan Real-Time PCR

Tato modifikace využívá 5' exonukleázovou aktivitu DNA polymerázy. Metoda vyžaduje vytvoření fluorescenčně značených oligonukleotidových sond. Sonda sebou nese i svůj tzv. zhášec, který pokud je sonda v celku potlačuje fluorescenci. Princip je v tom, že se sonda váže na DNA, která je syntetizována, tj. DNA polymeráze do cesty. Při syntéze nového vlákna DNA je sonda pomocí DNA polymerázy oddělena od DNA a rozbita na kousky, to dovoluje vzdálení zhášeče od značené sondy, která poté již excituje fluorescenční záření, které je detekované pomocí speciálního termocycleru.

Čím více DNA je nasyntetizované, tím více sond je „rozlámaných“ a tím více fluorescence zaznameneáme. Měření se provádí během PCR reakce, bez zásahu do zkumavky (Rapley R., Walker J., 2005).

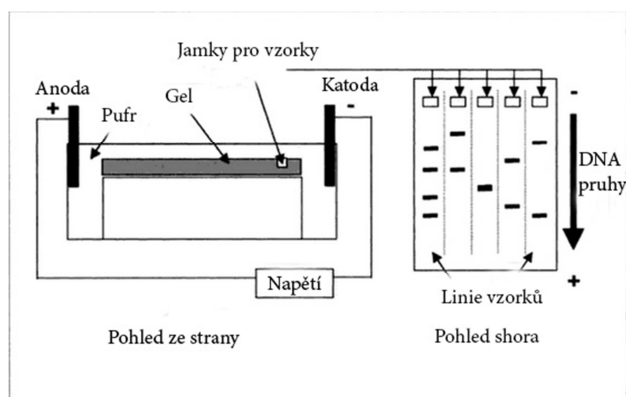
2.6 Elektroforéza DNA

Jedná se o separační metodu, která je velmi hojně využívána napříč odbornostmi. Elektroforéza pochází z řeckého slova electron (nabitý) a latinského phore (nosič). Metoda elektroforézy je tedy založena na elektrickém náboji neseném molekulami. V případě DNA máme fosfátovou skupinu, která je v kostře DNA a nese záporný náboj. Nukleové kyseliny nazýváme kyseliny z toho důvodu, že fosfátová skupina se snadno vzdá H^+ iontu, právě to jí dělá ve většině pufrů negativně nabytou částicí. Pod vlivem elektrického pole, budou molekuly DNA migrovat od negativně nabyté elektrody, kterou nazýváme katoda, ve směru k pozitivně nabyté elektrodě, známou jako anoda. Čím větší napětí je použito, tím větší je vyvíjena síla na migraci molekul, a tím rychlejší je pohyb molekul DNA. Při pohybu iontů v elektrickém poli vzniká teplo. Toto teplo musí být rozptýleno, odvedeno, či pohlceno systémem. V případě zvýšené teploty systému může nastat problém, že pruhy DNA budou mít tvar „úsměvu“, či v extrémních případech může dojít k rozpuštění gelu, na kterém elektroforéza probíhá (Butler J., 2005).

2.6.1 Gelová elektroforéza

Gely obsahují pevnou matici s množstvím pórů a roztok pufru, kterým během elektroforézy molekuly procházejí. Při přípravě gelu, je materiál dle příslušného návodu smíchán dohromady a naléván do formy, která bude definovat jeho tvar. Do formy jsou vloženy speciální hřebeny, které při tuhnutí vytvoří jamky pro nanášení vzorků. Po ztuhnutí gelu jsou hřebeny vyjmuty a gel je možno použít pro elektroforézu (Obrázek 19). Většinou jsou využívány dva typy gelů. Agarozový gel má větší velikost pórů a je tedy hojně využíván při separaci větších molekul DNA. Polyakrylamidový gel má naopak menší póry a slouží k vysokému separačnímu rozlišení pro menší molekuly

DNA o velikosti 500 - 1000bp (Butler J., 2005).



Obrázek 19 - Schéma jednoduché elektroforézy (Butler J., 2005)

Agarozový gel

Agaróza je v podstatě forma mořských řas. Obsahuje póry, které jsou řádově v průměru 200nm. Příprava agarosového gelu je velmi jednoduchá. Spočívá v navážení agarosového prášku a smíchání s elektroforézovým pufrem. Po promíchání se směs zahřeje nejlépe pomocí mikrovln do bodu varu, kdy se prášek plně rozpustí. Směs se zchladí studenou vodou a vlije do formy, která dá směsi požadovaný tvar (Butler J., 2005).

Polyakrylamidový gel

Póry v polyakrylamidovém gelu jsou tvořeny chemickou cestou pomocí zesíťování akrylamidu a bisakrylamidu. Gel je vytvořen polymerizací, příprava je tedy o něco obtížnější než u agarosového gelu. Polymerace probíhá za přítomnosti monomeru akrylamidu a za přítomnosti různého množství polymeračního činidla bisakrylamidu. Polymerace je zahájena vznikem volného radikálu za pomoci persíranu amonného. Polymerace se ukončuje přidáním TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin). Velikost pórů v gelu může být opravena celkovou koncentrací polymeračních činidel. Celková hodnota koncentrace akrylamidu v gelu se označuje jako %T. Póry se dají upravit ještě poměrem monomeru a „síťovače“. Poměr se označuje jako %C. Při polymeraci je nutné odvádět vznikající teplo, které by mohlo zapříčinit vytvoření bublinek v gelu. Z toho důvodu se polymerace většinou provádí ve vakuu. Nevýhoda gelu je neurotoxicita a mutagenní schopnost monomeru akrylamidu, je tedy důležitá bezpečnost práce při přípravě (Butler J., 2005).

Rozdíl mezi gelem pro nativní a denaturovanou DNA

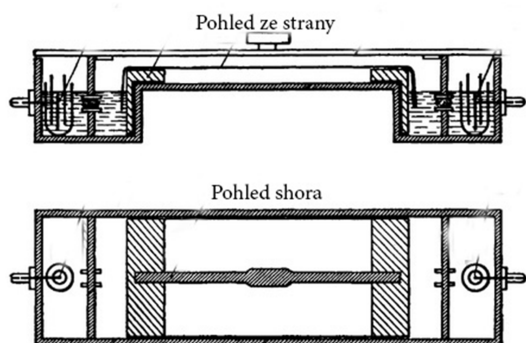
Za běžné situace se pro elektroforézu používá dvoušroubovicová DNA jinak nazývaná jako nativní. Pokud ale chceme rozlišit řetězce DNA, které jsou si velikostně velmi blízké, je vhodné použít pouze jednořetězcovou DNA jinak nazývanou jako denaturovaná DNA, protože je více flexibilní při procházení póry než nativní DNA. V tom případě musí být ale upraven vzorek DNA, či celý gel. Pro úpravu gelu je nejčastěji použita 6 molární urea, která je přidána do gelu a tím vznikne tzv. denaturovaný gel, který zabrání vzniku nativní DNA při elektroforéze (Butler J., 2005).

2.6.1.1 Dříve používaná nosná média

Stejně jako většina metod i elektroforéza prošla velkým vývojem. Na začátcích se však využívala jiná nosná média než dnes. Většina z nich se již přestala zcela využívat, či našla uplatnění pouze v úzkém spektru využití.

Papír jako první nosné médium

Papír se využíval jako jeden z prvních materiálů pro zónovou elektroforézu proteinů. Většinou se využíval strip o velikosti 20x150mm vytvořený z filtračního papíru, který měl tužkou označená místa pro anodu a katodu. Vzorek se umisťoval doprostřed stripu. Pufř pro elektroforézu byl nalit do dvou oddělených nádob. V jedné nádobě byla umístěna katoda a ve druhé anoda, bylo důležité, aby hladiny měly stejnou výšku (Obrázek 20). Papír byl umístěn uprostřed nádob a s nádobami spojen knoty, nebo vrstvami filtračního papíru. Délka knotů musela být stejná. Po nasáknutí papíru pufřem mohla elektroforéza začít (Dennison C., 2003)



Obrázek 20 - Schéma papírové elektroforézy (Block R., 1955)

Membrána z acetátu celulózy

Acetát celulózy je jemnější derivát celulózy vytvořený esterifikací celulózy. Membrána z acetátu celulózy poskytuje ostřejší proužky při dělení proteinů než předtím využívaný filtrační papír a tím pádem ho vytlačila do dnešní doby z používání. Princip elektroforézy při použití tohoto nosného média zůstal stejný jako u použití filtračního papíru. Membrána je využívána do dnešní doby i z důvodu možného skenování proužků proteinů pro vyhodnocování počítačem (Dennison C., 2003)

Škrobový gel

Historicky je škrobový gel první použitý gel pro elektroforézu. Gel ze škrobu byl představen kolem roku 1955. Škrob tvoří mikoretikulární gely složené ze vzájemně provázaných škrobových šroubovic zesíťovaných pomocí vodíkových můstků. Škrobový gel je v dnešní době v biochemii ve velkém útlumu, ale v biologii je velmi hojně využíván. Hlavní přednosti gelu jsou, že není toxický a je biologicky odbouratelný (Dennison C., 2003)

2.6.1.2 Modifikace gelové elektroforézy

Gradient pórů v gelu

Pro tuto modifikaci je nutné vyrobit speciální gel, který má různou velikost pórů. Vzorok postupně při migraci přecházejí od větších pórů, ke stále menším a menším. Modifikace je využívána k rozdělení proteinů, kdy je využito toho, že každý protein má specifickou velikost a dokáže projít pouze do určitého místa v gelu, pak mu v průchodu brání jeho vlastní velikost a protein zůstane zaseknutý na místě. Tím dojde k přesnému rozdělení podle velikosti proteinů (Dennison C., 2003)

Izoelektrická fokusace

Modifikace je využívána při rozdělení proteinů díky jejich amfolytické schopnosti a specifickému izoelektrickému bodu. Pro tuto metodu je použito speciální prostředí, kde se postupně od anody ke katodě zvyšuje pH. U anody je nejnižší pH, proteiny budou mít tedy pozitivní náboj a budou migrovat ke katodě. Při migraci ve vzrůstajícím pH dojdou proteiny do bodu, kdy ztratí kladný náboj a jejich migrace se tedy pomalu zastaví. Pokud protein přejde svými izoelektrickou hodnotu pH, získá záporný náboj a bude migrovat zpět k anodě. Tímto postupem se každý protein po čase zastaví na svém

charakteristickém izoelektrickém bodě a tím dojde k rozdělení směsi proteinů (Dennison C., 2003)

2.6.2 Pulsní elektroforéza

Kolem roku 1970 byla představena jedna z nejvýznamnějších modifikací elektroforézy. Díky pulsni elektroforéze, bylo možné rozdělit opravdu velké fragmenty DNA. Běžně je využívána pro molekuly větší než 15 kb, ale je možné dělit molekuly velké až několik Mb, což do té doby nebylo efektivně možné. Princip pulsni elektroforézy je takový, že se na vzorky DNA aplikuje první elektrické pole, díky kterému se vzorky začnou podle směru proudu prodlužovat a migrovat v gelu. Po nějaké době je první elektrické pole vypnuto a zapnuto druhé elektrické pole v určitém úhlu od prvního. To donutí vzorky DNA změnit konformaci a migrovat podle druhého elektrického pole. Čas pro změnu konformace je velmi specifický podle délky molekuly DNA. Čím větší molekula je, tím delší čas pro reorganizaci a následnou migraci potřebuje. Přepínání mezi elektrickými poli je aplikováno několikrát za sebou, tím je docíleno detailnějšího rozdělení. Hlavní nevýhoda je v izolaci DNA, která je speciálně upravena, aby nedošlo díky střížným silám k poškození velkých fragmentů (nad 500 kb) (Birren B., Lai E., 1993).

3 Hypotézy a cíl práce

Tato práce se zabývá hledáním nejvhodnější metody purifikace DNA z různých typů vzorků obsahujících mák, pro použití například v referenčních laboratořích při zkoumání, zda nedošlo k nahrazení jedlého máku v makovém výrobku za levnější farmaceutický mák.

3.1 Hypotézy

- 1) Pro získání dostatečně kvalitní DNA z různých typů vzorků je potřeba využít různé metody její izolace.
- 2) Z různých typů vzorků obsahujících mák se získá DNA s různou kvalitou a koncentrací.

3.2 Cíle práce

- 1) Vyzkoušet izolaci DNA z máku a makových výrobků pomocí nejběžnějších metod.
- 2) Změřit koncentraci získané DNA.
- 3) Ověřit kvalitu získané DNA pomocí PCR a elektroforézy.
- 4) Na základě získaných výsledků doporučit nejvhodnější metodu izolace DNA z jednotlivých typů vzorků máku a makových výrobků.

4 Materiál a metody

4.1 Použitý materiál

Pro izolaci jsem vybral dvě odrůdy máku, relativně novou odrůdu máku modrého ONYX a odrůdu máku bělosemenného OREL. Z každé odrůdy jsem zhotovil čtyři typy vzorků pro izolaci - z listí, semen, z uvařené nádivky pro výrobu buchet a z hotových buchet. Dva poslední vzorky byly použity pro otestování vlivu tepelné úpravy vzorků na množství a kvalitu DNA a také vlivu kontaminace makové DNA nukleovými kyselinami ostatních použitých surovin pro přípravu výrobku, jako je například DNA kvasinek, pšenice, krávy, slepice aj.

4.2 Metody izolace DNA

Z každého vzorku jsem extrahoval DNA pomocí následujících pěti metod:

- 1) Modifikovaná metoda pomocí CTAB-PVP pro rostliny.
- 2) Modifikovaná metoda pomocí CTAB-PVP pro rostliny – zkrácená verze.
- 3) Izolační kit NucleoSpin® Plant II od firmy Macherey-Nagel (D).
- 4) Izolační kit NucleoSpin® Food od firmy Macherey-Nagel (D).
- 5) Instrumentální metoda na přístroji MagCore, pomocí kitu 401.

4.2.1 Izolace DNA pomocí CTAB-PVP modifikované metody pro rostliny

Metoda je založena na schopnosti CTAB vytvářet komplex s nukleovými kyselinami a spolu s PVP lze dosáhnout účinnějšího odstranění kontaminujících látek, což dále přispívá k získání čistší DNA. Rozdíl modifikované verze pro rostliny uvedené níže (4.2.2) od standardního postupu, je větší robustnost metody s výsledkem většího vyextrahovaného množství DNA a důkladnější přechištění od nečistot.

Použité chemikálie a přístrojové vybavení

- 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky Eppendorf
- Termoblok
- Centrifuga chlazená
- Vortex
- Mikropipety
- Plastové homogenizátory pro použití s mikrozukumavkami Eppendorf
- Mrazicí box (-20°C)

- Digestoř
- Analytické váhy
- Extrakční CTAB-PVP pufr
- B-mercaptoethanol
- 5% CTAB pufr
- Chloroform-IAA
- Isopropanol
- 96% ethanol
- 70% ethanol
- TE pufr
- Sterilní křemičitý písek

4.2.1.1 Příprava vzorků pro izolaci

Navážil jsem si 100mg od každého vzorku do zkumavek. Ke každému vzorku jsem přidal v digestoři 450μl předeřátého (65°C) CTAB-PVP pufru, 5μl β-mercaptoethanolu a pro lepší homogenizaci malé množství sterilního křemičitého písku. Pomocí plastových homogenizátorů jsem všechny vzorky důkladně zhomogenizoval. Po homogenizaci jsem vzorky vložil do termobloku a inkuboval 45 minut při 65°C. Během inkubace jsem vzorky lehce každých 15 minut promíchal. Po inkubaci jsem zkumavky centrifugoval 10 minut na 12 000 otáček/min.

4.2.1.2 Vlastní izolace DNA

Ze zkumavek jsem opatrně v digestoři přepipetoval vodnou fázi do nových zkumavek a do každé zkumavky jsem přidal 500μl chloroformu-IAA. Zkumavky jsem 10 minut intenzivně protřepával. Po uplynutí doby třepání jsem zkumavky centrifugoval 5 minut na 12 000 otáček/min při pokojové teplotě. Ze zkumavek jsem v digestoři přepipetoval vzniklou vodnou fázi do nových zkumavek a přidal 1/5 ze získaného objemu vodné fáze 5% CTAB pufru. Poté jsem zkumavky lehce promíchal. Do zkumavek jsem dále přidal 500μl chloroformu-IAA a poté jsem zase zkumavky 10 minut intenzivně protřepával. Po uplynutí doby jsem zkumavky centrifugoval 5 minut na 14 000 otáček/min při pokojové teplotě. Ze zkumavek jsem v digestoři přepipetoval vzniklou vodnou fázi do nových zkumavek a přidal 2/3 ze získaného objemu vodné fáze vychlazeného isopropanolu. Zkumavky jsem dal inkubovat na 2 dny do mrazícího boxu (-20°C).

Po vyjmutí z mrazícího boxu, jsem zkumavky centrifugoval 5 minut na 14 000 otáček/min a za teploty 4°C. Po centrifugaci jsem odstranil všechnu supernatant a přidal do každé zkumavky 300µl TE pufru a zkumavky jsem nechal inkubovat 45 minut při 37°C. Po uplynutí doby jsem do zkumavek přidal 600µl ledového 96% ethanolu a 3x lehce promíchal. Zkumavky jsem znovu vložil do mrazícího boxu (-20°C) a inkuboval 45 minut. Po uplynutí doby jsem zkumavky centrifugoval 10 minut na 14 000 otáček/min a teplotě 4°C. Ze zkumavek jsem znovu odstranil všechnu supernatant a do zkumavek pipetoval 1ml vychlazeného 70% ethanolu, zkumavky jsem znovu 3x lehce promíchal a centrifugoval 2 minuty na 14 000 otáček/min a za teploty 4°C. Po vyndání jsem okamžitě odstranil všechnu supernatant. Poslední krok jsem opakoval ještě 2x, kvůli co největšímu přečištění DNA. Zkumavky jsem vložil do termobloku předehřátého na 37°C, tím došlo k vysušení peletu. Vysušený pelet jsem rozpustil přidáním 100µl TE pufru a třepáním při 37°C 40 minut. Tím jsem získal 100µl roztoku od každého vzorku s izolovanou DNA. Vzorky jsem skladoval při 4°C v lednici.

4.2.2 Izolace DNA pomocí CTAB-PVP pro rostliny – zkrácená verze

Metoda je založena na schopnosti CTAB vytvářet komplex s nukleovými kyselinami a spolu s PVP lze dosáhnout účinnějšího odstranění kontaminujících látek, což dále přispívá k získání čistší DNA. Tato metoda je modifikovaná tj. zkrácená verze od klasické CTAB-PVP metody.

Použité chemikálie a přístrojové vybavení

- 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky Eppendorf
- Termoblok
- Centrifuga chlazená
- Vortex
- Mikropipety
- Plastové homogenizátory pro použití s mikrozukumavkami Eppendorf
- Mrazící box (-20°C)
- Digestoř
- Analytické váhy
- Extrakční CTAB-PVP pufr
- B-mercaptoethanol
- Chloroform-IAA

- Isopropanol
- 70% ethanol
- TE pufr

4.2.2.1 Příprava vzorků pro izolaci

Navážil jsem si 100mg od každého vzorku do zkumavek. Ke každému vzorku jsem přidal v digestoři 450 μ l přehřátého (65°C) CTAB-PVP pufru a 5 μ l β -mercaptoethanolu. Pomocí plastových homogenizátorů jsem všechny vzorky důkladně zhomogenizoval. Po homogenizaci jsem vzorky vložil do termobloku a inkuboval 10 minut při 65°C. Během inkubace jsem vzorky jednou lehce promíchal. Po inkubaci jsem zkumavky centrifugoval 5 minut na 14 000 otáček/min.

4.2.2.2 Vlastní izolace DNA

Ze zkumavek jsem opatrně v digestoři přepipetoval vodnou fázi do nových zkumavek a do každé zkumavky jsem přidal 500 μ l chloroformu-IAA. Zkumavky jsem 5 minut intenzivně protřepával. Po uplynutí doby třepání jsem zkumavky centrifugoval 5 minut na 14 000 otáček/min při pokojové teplotě. Ze zkumavek jsem v digestoři přepipetoval vzniklou vodnou fázi do nových zkumavek a přidal 2/3 ze získaného objemu vodné fáze izopropanolu. Poté jsem 3x zkumavku lehce promíchal. Zkumavky jsem dal inkubovat na 10 minut do mrazícího boxu (-20°C). Po vyjmutí z mrazícího boxu jsem zkumavky centrifugoval 5 minut na 14 000 otáček/min a za teploty 4°C. Po centrifugaci jsem odstranil všechnen supernatant a přidal do každé zkumavky 1ml vychlazeného 70% ethanolu. Zkumavky jsem znovu centrifugoval 5 minut na 14 000 otáček/min a teplotě 4°C. Ze zkumavek jsem znovu odstranil všechnen supernatan a zkumavky jsem vložil do termobloku přehřátého na 37°C, tím došlo k vysušení peletu. Vysušený pelet jsem rozpustil přidáním 200 μ l TE pufru. Tím jsem získal 200 μ l roztoku od každého vzorku s izolovanou DNA. Vzorky jsem skladoval při 4°C v lednici.

4.2.3 Izolace DNA pomocí kitu NucleoSpin® Plant II od firmy Macherey-Nagel (D)

Kit je vhodný pro získání DNA z rostlinných buněk a tkání, či DNA z hub. Použitá technologie izolace je adsorpce DNA na speciálních silikátových membránách.

Použité chemikálie a přístrojové vybavení

- 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky Eppendorf
- Termoblok

- Centrifuga
- Vortex
- Analytické váhy
- Mikropipety
- Plastové homogenizátory pro použití s mikrozkušavkami Eppendorf
- Souprava NucleoSpin® Plant II od firmy Macherey-Nagel (D) (eluční pufr PE, PL1 pufr, PC pufr, PW2 pufr, sběrné zkumavky, fialové a zelené filtrační kolonky)

4.2.3.1 Příprava vzorků pro izolaci

Navážil jsem si 100mg od každého vzorku do zkumavek. Ke každému vzorku jsem přidal 400µl PL1 pufru a pomocí plastových homogenizátorů jsem všechny vzorky důkladně zhomogenizoval. Po homogenizaci jsem každý vzorek zvortexoval a dal na 10 minut do termobloku předehřátého na 65°C.

4.2.3.2 Vlastní izolace DNA

Z přiložených zkumavek v balení jsem si vzal osm sběrných zkumavek a osm fialových kolonek, které jsem umístil na sběrné zkumavky. Lyzát ze všech vzorků jsem přemístil na kolonky a dal centrifugovat na 2 minuty na 11 000 otáček/min. Po vyjmutí z centrifugy jsem odstranil kolonky a do supernatantu ve sběrných zkumavkách jsem přidal 450µl PC pufru a důkladně promíchal pipetou. Připravil jsem si dalších osm sběrných zkumavek teď se zelenými kolonkami a připravené supernatanty s PC pufrém jsem přemístil na kolonky a dal centrifugovat na 1 minutu na 11 000 otáček/min. Supernatant ze sběrných kolonek jsem odstranil a do každé kolonky přidal 700µl PW2 pufru a zase centrifugoval 1 minutu na 11 000 otáček/min. Supernatant jsem znovu odstranil a do kolonek přidal 200µl PW2 pufru a centrifugoval 2 minuty na 11 000 otáček/min. Supernatant jsem znovu odstranil a znovu centrifugoval 1 minutu na 11 000 otáček/min, čímž došlo k vysušení kolonek. Kolonky jsem umístil do nových 1,5ml zkumavek a do každé kolonky přidal 50µl předem nahřátého PE pufru na 65°C. Kolonky jsem dal do termobloku na 5 minut při 65°C a poté centrifugoval 1 minutu na 11 000 otáček/min. Tento krok s PE pufrém jsem opakoval ještě jednou a tím jsem získal 100µl roztoku od každého vzorku s izolovanou DNA. Vzorky jsem skladoval při 4°C v lednici.

4.2.4 Izolace DNA pomocí kitu NucleoSpin® Food od firmy Macherey-Nagel (D)

Kit je vhodný díky své robustní pufovací chemii a speciální silikátové membráně pro izolaci DNA ze zpracovaných potravin. Použitá technologie izolace je adsorpce na speciální silikátovou membránu.

Použité chemikálie a přístrojové vybavení

- 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky Eppendorf
- Ethanol absolutní p.a.
- Termoblok
- Centrifuga
- Vortex
- Analytické váhy
- Mikropipety
- Plastové homogenizátory pro použití s mikrozkušavkami Eppendorf
- Souprava NucleoSpin® Food od firmy Macherey-Nagel (D) (pufr C4, promývací pufr CQW, promývací pufr C5, eluční pufr CE, pufr CF, Nucleospin® Food filtrační kolonky se sběrnou zkumavkou, proteinázu K,)

4.2.4.1 Příprava vzorků pro izolaci

Navážil jsem si 200mg od každého vzorku do zkumavek. Ke každému vzorku jsem přidal 550µl CF pufru předehřátého na 65°C a 10µl proteinázy K, pomocí plastových homogenizátorů jsem všechny vzorky důkladně zhomogenizoval. Po homogenizaci jsem každý vzorek zvortexoval a dal na 30 minut do termobloku předehřátého na 65°C. Po inkubaci jsem zkumavky centrifugoval 10 minut na 11 000 otáček/min.

4.2.4.2 Vlastní izolace DNA

Ze supernatantů, které jsem získal, jsem odebral 300µl do nových zkumavek. Do každé jsem dále přidal 300µl ethanolu absolutního p.a. a 300µl pufru C4. Každý vzorek jsem vortexoval 30s. Ze získaných směsí jsem odebral 700µl a přemístil do předem připravených filtračních kolonek Nucleospin® Food nasazených na sběrných zkumavkách. Filtrační kolonky jsem centrifugoval 1 minutu na 11 000 otáček/min. Po centrifugaci jsem odstranil všechny supernatanty a znovu centrifugoval 1 minutu na 11 000 otáček/min. Do každé kolonky jsem pipetoval 400µl pufru CQW a centrifugoval 1 minutu na 11 000 otáček/min. Supernatant ze sběrných zkumavek jsem odstranil a do

každé kolonky pipetoval 700 μ l pufru C5 a centrifugoval 1 minutu na 11 000 otáček/min. Supernatant ze sběrných zkumavek jsem znovu odstranil a do kolonek jsem pipetoval dalších 200 μ l pufru C5 a centrifugoval 2 minuty na 11 000 otáček/min. Po vyjmutí z centrifugy jsem filtrační kolonky přemístil na nové 1,5ml zkumavky a do každé kolonky jsem pipetoval 100 μ l elučního pufru CE předehřátého na 70°C. Kolonky jsem inkuboval 5 minut při pokojové teplotě a poté centrifugoval 1 minutu na 11 000 otáček/min. Tím jsem získal 100 μ l roztoku od každého vzorku s izolovanou DNA. Vzorky jsem skladoval při 4°C v lednici.

4.2.5 Izolace DNA pomocí přístroje MagCore® Automated Nucleic Acid Extractor HF16Plus

Přístroj MagCore® HF16Plus má velmi široké využití a dle použitého kitu lze izolovat DNA prakticky z každého materiálu. Izolace je umožněna vazbou DNA na speciální „magnetické kuličky“.

Použité chemikálie a přístrojové vybavení

- Proteináza K
- Mikropipety
- 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky Eppendorf
- Termoblok
- Centrifuga
- Analytické váhy
- Vortex
- Plastové homogenizátory pro použití s mikrozkuškami Eppendorf
- Přístroj MagCore® HF16Plus
- Kit 401

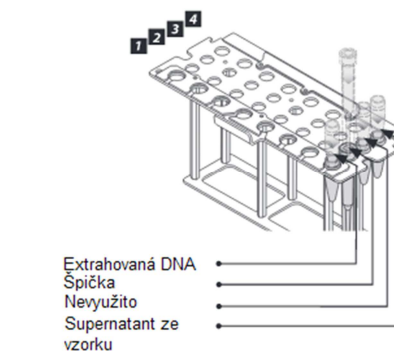
4.2.5.1 Příprava vzorků pro instrumentální extrakci

Navážil jsem si přibližně 30-40mg od každého vzorku do zkumavek. Do každé zkumavky jsem přidal 20 μ l Proteinázy K a 500 μ l GT pufru. Pokračoval jsem homogenizací vzorku pomocí plastových homogenizátorů do zkumavek. Po homogenizaci jsem každý vzorek zvortexoval a dal inkubovat do termobloku na 56°C po dobu 15 minut. Každé 3 minuty jsem opatrně promíchal obsah zkumavek. Po uplynutí 15 minut jsem zkumavky vložil do centrifugy a stáčet po dobu 3 minut na

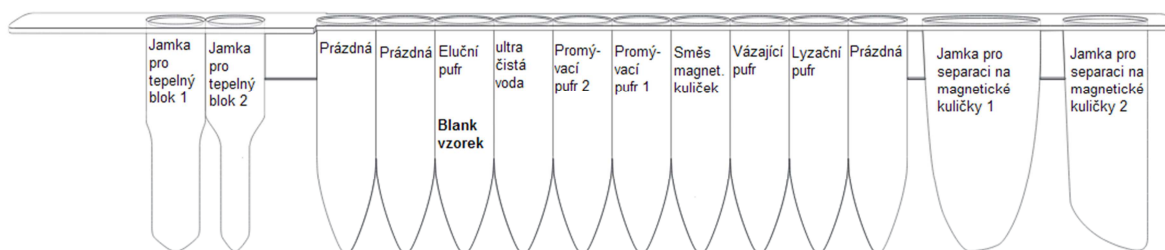
14 000 otáček/min. Tímto postupem jsem získal supernatant potřebný pro instrumentální extrakci DNA.

4.2.5.2 Automatická extrakce

Extrakce probíhala na přístroji MagCore® HF16Plus. Nejdříve bylo nutné připravit zkumavky a špičky pro přístroj do nosiče (Obrázek 21). Do čtvrté zkumavky v nosiči jsem napipetoval 400µl supernatantu ze vzorků. Při pipetování bylo důležité nenasát nečistoty ze dna, které by mohly přístroj ucpat. Připravený nosič jsem vložil do přístroje spolu s Kitem 401 (Obrázek 22). Na přístroji jsem nastavil program pro kit 401, objem vzorku 400µl a jako eluční pufr Tris. Po skončení extrakčního programu jsem vzorky DNA vyjmul z přístroje a skladoval při 4°C v lednici.



Obrázek 21 - T-blok (nosič)



Obrázek 22 - Schéma kitu 401

4.3 Spektrofotometrické stanovení množství a kvality vyzolované DNA

Každý vzorek jsem po izolaci podrobil testování na přístroji Shimadzu BioSpec-nano UV-VIS spektrofotometru, který dokáže změřit koncentraci DNA ve vzorku a vypočítat OD 260/280 a OD 260/230, což vypovídá o výskytu znečišťujících látek, či degradaci získané DNA.

4.3.1 Vlastní měření

Před každým měřením jsem musel do přístroje vložit negativní (blank) vzorek, podle metody (Tabulka 1), kterou jsem zkoumaný vzorek DNA získal. Po správném nastavení přístroje na blank vzorek jsem pipetoval 1µl, každého vzorku na příslušné vyznačené místo v přístroji. Po každém vzorku si přístroj sám otřel čidlo a mohl měřit další vzorek, problémy s kontaminací jsou v rámci přístroje teoreticky nulové.

Tabulka 1 - Použité negativní vzorky pro následné měření získané koncentrace DNA dle použitých metod

Metoda	CTAB-PVP	CTAB-PVP (zkrácená verze)	NucleoSpin® Plant II	NucleoSpin® Food	MagCore® kit 401
Blank vzorek	TE pufr	TE pufr	PE pufr	CE pufr	Eluční pufr z kitu 401

4.4 Polymerázová řetězová reakce

Po vyzolování jsem sadu vzorků DNA získanou jednotlivými metody izolace podrobil PCR. Při PCR reakci jsem amplifikoval specifickou mikrosatelitní sekvenci DNA máku, pomocí specifických primerů PSOM17 (Mičianová et al., 2017). Pro PCR jsem potřeboval následující chemikálie a přístrojové vybavení:

- Master mix
- PCR Ultra H₂O
- Forward primer PSOM17 (GTAGTGGGTTTTAGGAGTTT)
- Reverse primer PSOM17 (CTTGAAAAATATCAGTGAGC)
- Mikropipety
- Termocycler
- Vyzolovanou DNA
- Vortex

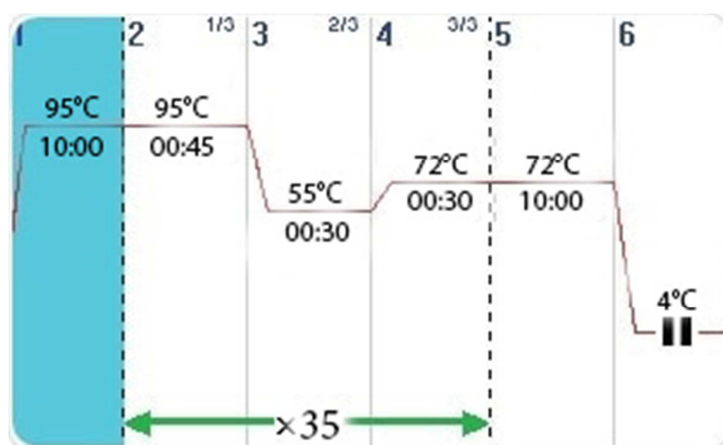
Připravil jsem si celkem 99 μ l základního roztoku pro PCR (Tabulka 2). Směs jsem důkladně zvortexoval. Ze směsi jsem odebral 9 μ l do devíti mikrozkušavek pro PCR. Do každé zkumavky jsem přidal vzorek vyzolované DNA o objemu 1 μ l. Do deváté mikrozkušavky jsem žádnou DNA nepřidal, slouží jako blank vzorek v případě kontaminace směsi pro PCR. Mikrozkušavky jsem důkladně zvortexoval a vložil do thermocycleru na specifický program.

Tabulka 2 - Schéma složení základního roztoku pro PCR reakci

Počet vzorků	Master mix	PCR Ultra H ₂ O	Forward primer PSOM17	Reverse primer PSOM17
8 + 1 negativní	55μl	33μl	5,5μl	5,5μl

Program pro amplifikaci DNA

PCR reakce proběhla podle specifického programu pro primery PSOM17 (Obrázek 23).



Obrázek 23 - Grafické znázornění PCR programu pro primery PSOM17

4.5 Elektroforéza

Po provedení PCR reakce byla vždy sada 8 vzorků a negativní kontrola (reakční směs bez DNA) použity pro elektroforézu. Díky tomu jsem zjistil, zda vzorek obsahuje DNA máku a nejedná se o jinou kontaminující DNA například kvasinek, pšenice, krávy, slepice aj. Dále jsem zjistil, zda je vzorek dostatečně kvalitní pro PCR reakci.

4.5.1 Příprava agarosového gelu

Na elektroforézu jsem použil 1,5% agarosový gel, který obsahoval Ethidium bromid, který obarvil PCR produkty. Pro přípravu jsem potřeboval následující suroviny a zařízení.

- Formičku do elektroforézy, ve které bude elektroforéza probíhat, příslušné hřebínky, které vytvořily jamky pro vlastní vzorky a těsnění k formičce
- Agarózu
- TBE pufr
- Ethidium bromid

- Mikropipetu
- Analytické váhy
- Digestoř
- Odměrný válec
- Mikrovlnou troubu
- Erlenmeyerovu baňku o objemu 250ml

Pro přípravu 1,5% gelu jsem si do erlenmeyerovy baňky navážil přesně 1,5g agarózy a pomocí odměrného válce smíchal s 100ml TBE pufru. Při nalévání pufru jsem se snažil spláchnout všechnu případnou agarózu ze stěn baňky. Baňku jsem vložil do mikrovlné trouby a za použití 100% výkonu rozehtřival, dokud se všechna agaróza nerozpustila. Při ohřívání jsem baňku neustále kontroloval a několikrát promíchal, aby nedošlo ke zbytečnému varu gelu a případnému vytečení z baňky. Po dokonalém rozpuštění jsem baňku ochladil pod tekoucí studenou vodou přibližně na 60°C. Do takto zchlazeného gelu jsem pipetoval 6 μ l ethidium bromidu a důkladně, ale lehce promíchal. Připravený gel jsem nalil do formičky. Po vyplnění celé formičky bylo nutné zkontrolovat bubliny, které mohly při přelívání vzniknout. Všechny případné bubliny jsem odstranil špičkou k mikropipetě. Bylo důležité odstranit opravdu všechny bubliny i u hřebínků, případný výskyt by mohl negativně ovlivnit průběh celé elektroforézy.

4.5.2 Vlastní provedení elektroforézy

Do vany pro elektroforézu jsem umístil formu již bez těsnění s připraveným gelem. Zkontroloval jsem hladinu TBE pufru a případně doplnil tak, aby byl gel zcela potopený. Pro pipetování vzorků jsem použil mikropipetu s objemem 7,0 μ l. Do první jamky jsem vždy pipetoval hmotnostní standard 100bp DNA Ladder. Do dalších osmi jamek jsem pipetoval celou sadu vzorků z PCR z jedné metody a jako poslední jsem pipetoval negativní vzorek. Při pipetování bylo důležité nepoškodit gel, či nekontaminovat vzorky mezi sebou. Na elektrickém zdroji k elektroforéze jsem nastavil 120V po dobu 45 minut. Vizualizaci jsem provedl pomocí přístroje Syngene InGenius3.

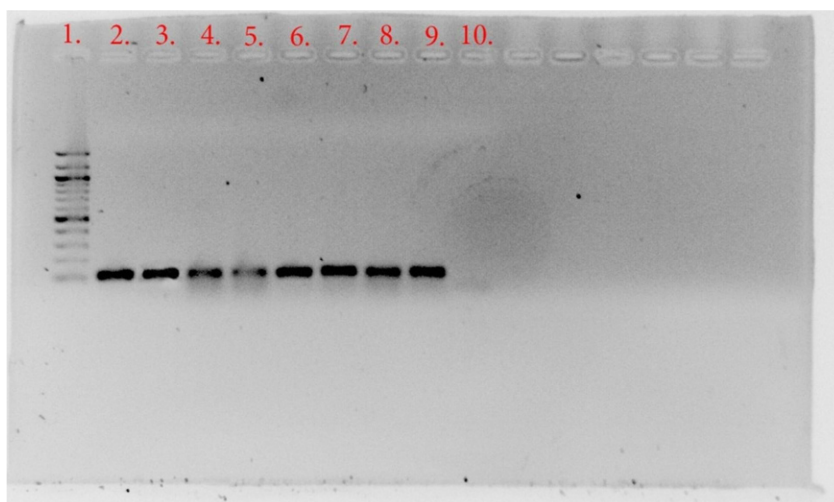
5 Výsledky

Pro zpracování konečných výsledků byly důležité dvě analytické metody. Ze spektrofotometrického měření DNA jsem orientačně zjistil vyizolované množství a hlavně kvalitu získané DNA pomocí poměrů A260/A280 a A260/A230 (2.4.1) Jako další kritérium při hodnocení byly použity údaje z elektroforéz, zda se ve vzorku vyskytuje maková DNA a zda je kvalita dostatečná pro PCR reakci.

5.1 Modifikovaná metoda pomocí CTAB-PVP pro rostliny

Tabulka 3 - Výsledky ze spektrofotometru pro metodu CTAB-PVP

Číslo	Druh vzorku	Koncentrace DNA [ng/μl]	260/280	260/230
1.	ONYX listí	26,93	2,70	2,98
2.	OREL listí	84,02	2,07	1,89
3.	ONYX semena	348,59	2,13	1,78
4.	OREL semena	381,39	2,12	1,61
5.	ONYX buхта	175,99	2,02	1,20
6.	OREL buхта	257,64	2,00	1,25
7.	ONYX nádivka	303,57	2,05	1,46
8.	OREL nádivka	196,62	1,98	1,26



Obrázek 24 - Výsledky z elektroforézy pro metodu CTAB-PVP s pořadím vzorků: 1. 100bp ladder, 2. ONYX listí, 3. OREL listí, 4. ONYX semena, 5. OREL semena, 6. ONYX buхта, 7. OREL buхта, 8. ONYX nádivka, 9. OREL nádivka, 10. negativní (blank) vzorek

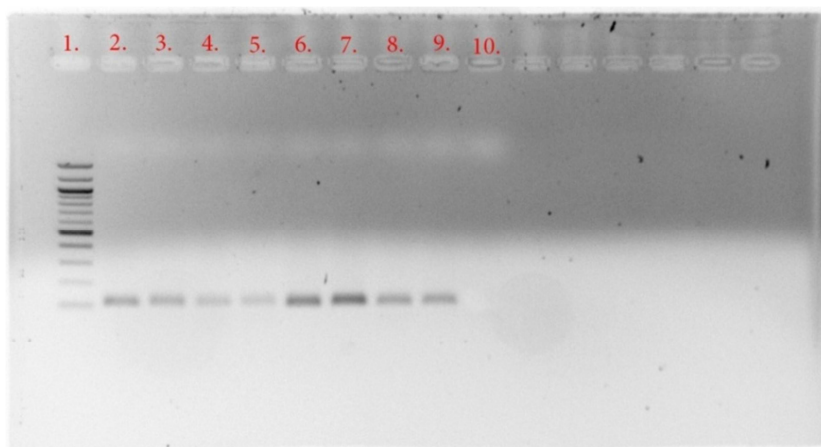
Z tabulky výsledků (Tabulka 3) je zřejmé, že pomocí metody CTAB-PVP modifikované pro rostliny se nejvíce DNA podařilo vyizolovat ze vzorků semen (3. a 4.) a nejméně DNA ze vzorků listů (1. a 2.) Z poměru absorbancí je zřejmé, že nejvíce vhodné vzorky pro amplifikaci DNA, by mohly být vzorky listů a částečně vzorky semen, méně vhodné

vzorky potravin (poměr 260/230 příliš nízký). Z elektroforetického snímku (Obrázek 24) je zřejmé, že PCR reakce proběhla úspěšně u všech vzorků DNA izolovaných pomocí metody CTAB-PVP modifikované pro rostliny. Délka fragmentů na gelu odpovídá předpokládané délce fragmentů ohraničených použitými primery. Ze všech vzorků jsou velmi výrazné fragmenty. Na fragmentech pro vzorky semen (sloupce 4. a 5.) je vidět určité „rozmazání“ fragmentů. Negativní kontrola ve sloupci 10 vyšla podle očekávání negativně.

5.2 Metoda pomocí CTAB-PVP modifikovaná pro rostliny – zkrácená verze

Tabulka 4 - Výsledky ze spektrofotometru pro metodu CTAB-PVP modifikovaná pro rostliny - zkrácená verze

Číslo	Druh vzorku	Koncentrace DNA [ng/μl]	260/280	260/230
1.	ONYX listí	59,54	2,31	1,98
2.	OREL listí	21,53	2,43	1,96
3.	ONYX semena	133,87	2,06	1,25
4.	OREL semena	117,79	2,17	1,60
5.	ONYX buхта	88,3	2,12	2,68
6.	OREL buхта	27,37	2,33	1,51
7.	ONYX nádivka	132,29	1,98	1,26
8.	OREL nádivka	64,09	2,04	1,21



Obrázek 25 - Výsledky z elektroforézy pro metodu CTAB-PVP modifikovaná pro rostliny - zkrácená verze s pořadím vzorků: 1. 100bp ladder, 2. ONYX listí, 3. OREL listí, 4. ONYX semena, 5. OREL semena, 6. ONYX buхта, 7. OREL buхта, 8. ONYX nádivka, 9. OREL nádivka, 10. negativní (blank) vzorek

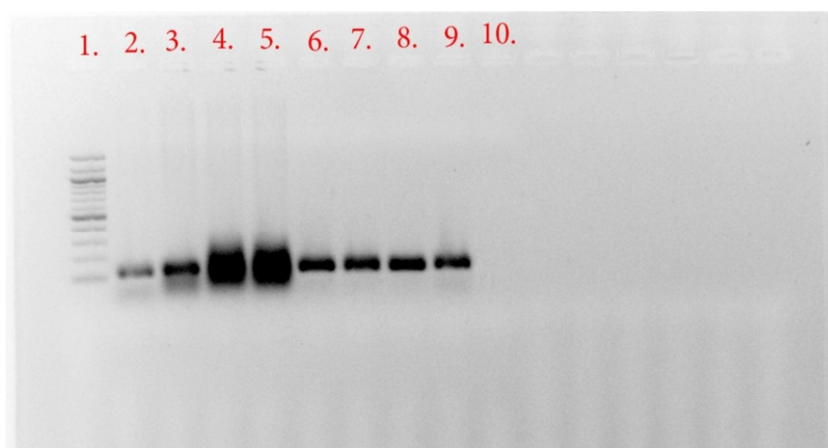
Z tabulky výsledků (Tabulka 4) je zřejmé, že metoda CTAB-PVP modifikované pro rostliny – zkrácená verze ze žádného vzorku nedokázala vyizolovat poměrně velké množství DNA. Nejvíce DNA se podařilo vyizolovat ze vzorků semen (3. a 4.) a nejméně DNA ze vzorků listů (1. a 2.) Z poměru absorbancí je zřejmé, že nejvíce

vhodné vzorky pro amplifikaci DNA, by mohly být vzorky listů a buchy (5. a 6.). Nejméně vhodné vzorky semen (3. a 4.) Z elektroforetického snímku (Obrázek 25), je zřejmé, že PCR reakce proběhla úspěšně u všech vzorků DNA izolovaných pomocí metody CTAB-PVP modifikované pro rostliny – zkrácená verze. Délka fragmentů na gelu odpovídá předpokládané délce fragmentů ohraničených použitými primery. Ze vzorků 6. a 7. jsou nejvýraznější fragmenty. Na fragmentech pro vzorky semen (sloupce 4. a 5.) je vidět, že fragmenty jsou oproti ostatním fragmentům na gelu nejméně zřetelné, ale stále dostačující. Negativní kontrola ve sloupci 10 vyšla podle očekávání negativně.

5.3 Metoda pomocí Izolačního kitu NucleoSpin® Plant II od firmy Macherey-Nagel (D)

Tabulka 5 - Výsledky ze spektrofotometru pro izolační kit NucleoSpin® Plant II od firmy Macherey-Nagel (D)

Číslo	Druh vzorku	Koncentrace DNA [ng/μl]	260/280	260/230
1.	ONYX listí	333,26	2,24	2,29
2.	OREL listí	566,74	2,20	2,36
3.	ONYX semena	1 176,32	2,21	2,23
4.	OREL semena	1 216,87	2,19	2,13
5.	ONYX bucha	146,18	2,18	1,55
6.	OREL bucha	70,81	2,32	1,75
7.	ONYX nádivka	152,87	2,20	1,50
8.	OREL nádivka	225,9	2,17	1,70



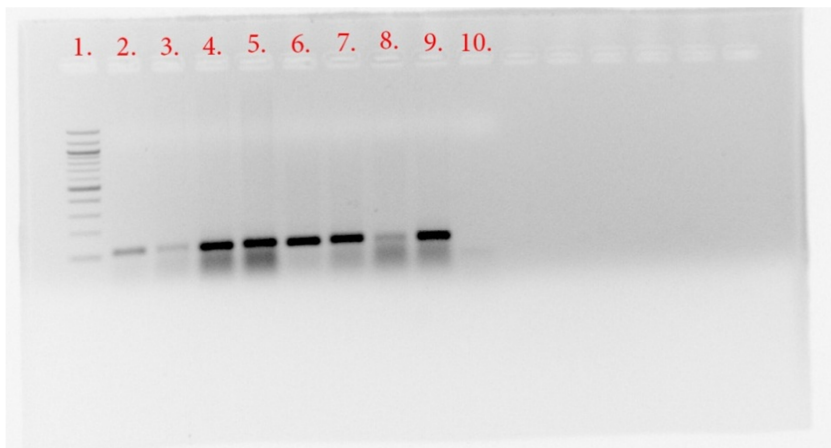
Obrázek 26 - Výsledky z elektroforézy pro izolační kit NucleoSpin® Plant II od firmy Macherey-Nagel (D) s pořadím vzorků: 1. 100bp ladder, 2. ONYX listí, 3. OREL listí, 4. ONYX semena, 5. OREL semena, 6. ONYX bucha, 7. OREL bucha, 8. ONYX nádivka, 9. OREL nádivka, 10. negativní (blank) vzorek

Podle koncentrace (Tabulka 5) je zřejmé, že izolačním kitem NucleoSpin® Plant II od firmy Macherey-Nagel (D) se nejvíce DNA podařilo vyizolovat ze vzorků semen (3. a 4.) a nejméně DNA ze vzorků bučty (5. a 6.) Z poměru absorbancí je zřejmé, že nejvíce vhodné vzorky pro amplifikaci DNA, by mohly být vzorky semen a bučty a nejméně vhodné vzorky listů (1. a 2.) (vyšší oba poměry). Z elektroforetického snímku (Obrázek 26), je zřejmé, že PCR reakce proběhla úspěšně u všech vzorků DNA izolovaných pomocí izolačního kitu NucleoSpin® Plant II od firmy Macherey-Nagel (D). Délka fragmentů na gelu odpovídá předpokládané délce fragmentů ohraničených použitými primery. Fragmenty pro vzorky potravin (sloupce 6. - 9.) jsou výrazné, ohraničené a ostré, přičemž podle spektrofotometru se jedná o „nekvalitní“ DNA. Fragmenty u vzorků semen (sloupce 4. a 5.) jsou velmi rozmazané, stejně tak u vzorků listů (sloupce 1. a 2.) se nejedná o ohraničené fragmenty. Negativní kontrola ve sloupci 10 vyšla podle očekávání negativně.

5.4 Metoda pomocí Izolačního kitu NucleoSpin® Food od firmy Macherey-Nagel (D)

Tabulka 6 - Výsledky ze spektrofotometru pro izolační kit NucleoSpin® Food od firmy Macherey-Nagel (D)

Číslo	Druh vzorku	Koncentrace DNA [ng/μl]	260/280	260/230
1.	ONYX listí	59,32	2,12	3,27
2.	OREL listí	160,67	2,18	2,49
3.	ONYX semena	655,12	2,19	2,42
4.	OREL semena	638,21	2,16	2,27
5.	ONYX bučta	163,47	2,13	2,50
6.	OREL bučta	258,04	2,15	2,44
7.	ONYX nádivka	407,88	2,18	2,42
8.	OREL nádivka	334,15	2,18	2,41



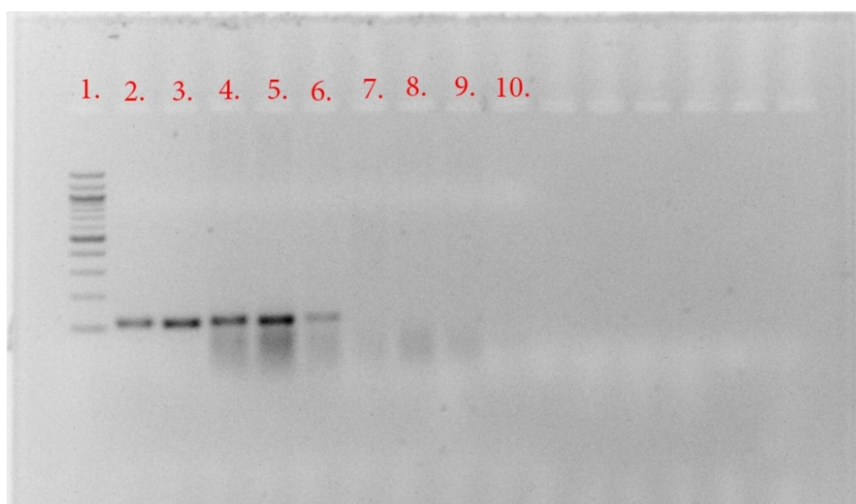
Obrázek 27 - Výsledky z elektroforézy pro izolační kit NucleoSpin® Food od firmy Macherey-Nagel (D) s pořadím vzorků: 1. 100bp ladder, 2. ONYX listí, 3. OREL listí, 4. ONYX semena, 5. OREL semena, 6. ONYX buхта, 7. OREL buхта, 8. ONYX nádivka, 9. OREL nádivka, 10. negativní (blank) vzorek

Podle koncentrace (Tabulka 6) je zřejmé, že izolačním kitem NucleoSpin® Food od firmy Macherey-Nagel (D), se nejvíce DNA podařilo vyizolovat ze vzorků semen (2. a 3.) a nejméně DNA ze vzorků listů (1. a 2.). Z poměru absorbancí je zřejmé, že nejvíce vhodné vzorky pro amplifikaci DNA, by mohly být vzorky semen a nejméně vhodné vzorky listů (vyšší poměr 260/230). Z elektroforetického snímku (Obrázek 27), je zřejmé, že PCR reakce proběhla úspěšně u všech vzorků DNA izolovaných pomocí izolačního kitu NucleoSpin® Food od firmy Macherey-Nagel (D). Délka fragmentů na gelu odpovídá předpokládané délce fragmentů ohraničených použitými primery. Fragmenty pro vzorky semen, buchtů a jednoho vzorku nádivky (sloupce 4. – 7. a 9.) jsou nejvýraznější, avšak u vzorků semen (sloupce 4. a 5.), nejsou fragmenty dostatečně ohraničeny a vytvářejí příliš tmavý „stín“ dále do gelu. Fragmenty pro listí (sloupce 2. a 3.) jsou téměř nezatelné, stejně tak pro vzorek nádivky z odrůdy máku ONYX (sloupec 8.) Negativní kontrola ve sloupci 10 vyšla podle očekávání negativně.

5.5 Instrumentální metoda na přístroji MagCore pomocí kitu 401

Tabulka 7 - Výsledky ze spektrofotometru pro instrumentální metodu na přístroji MagCore s kitem 401

Číslo	Druh vzorku	Koncentrace DNA [ng/μl]	260/280	260/230
1.	ONYX listí	117,79	2,31	1,99
2.	OREL listí	93,99	2,47	2,01
3.	ONYX semena	456,92	2,12	1,86
4.	OREL semena	656,65	2,15	2,07
5.	ONYX buхта	268,81	1,97	1,41
6.	OREL buхта	234,76	1,99	1,27
7.	ONYX nádivka	267,00	1,88	1,2
8.	OREL nádivka	234,23	1,77	0,93



Obrázek 28 - Výsledky z elektroforézy pro instrumentální metodu na přístroji MagCore s kitem 401 s pořadím vzorků: 1. 100bp ladder, 2. ONYX listí, 3. OREL listí, 4. ONYX semena, 5. OREL semena, 6. ONYX buхта, 7. OREL buхта, 8. ONYX nádivka, 9. OREL nádivka, 10. negativní (blank) vzorek

Z tabulky (Tabulka 7) je zřejmé, že instrumentální metodou na přístroji MagCore pomocí kitu 401, se nejvíce DNA podařilo vyizolovat ze vzorků semen (3. a 4.) a nejméně ze vzorků listů (1. a 2.) Z poměru absorbancí je zřejmé, že nejvíce vhodné vzorky pro amplifikaci DNA, by mohly být vzorky semen a listů, nejméně vhodné vzorky nádivky (7. a 8.). Z elektroforetického snímku (Obrázek 28), je zřejmé, že PCR reakce proběhla úspěšně pouze u několika vzorků DNA (sloupce 2. – 6.) izolovaných pomocí přístroje MagCore s použitým kitem 401. U vzorků (sloupce 7. – 9.) PCR reakce neproběhla úspěšně. Délka fragmentů na gelu odpovídá předpokládané délce fragmentů ohraničených použitými primery. Fragmenty pro vzorky semen (sloupce 4. a 5.) jsou nejvýraznější, avšak fragmenty nejsou dostatečně ohraničeny a vytvářejí „stín“

dále do gelu. Fragmenty pro vzorky listů (sloupce 2. a 3.) jsou znatelné, ohraničené a ostré. Negativní kontrola ve sloupci 10 vyšla podle očekávání negativně.

6 Diskuze

Dle Fleischmanna a Heubla (2009), není kit NucleoSpin® Plant od firmy Macherey-Nagel (D) zcela vhodný pro izolaci ze vzorků typu listů a neposkytuje dostatečně kvalitní DNA pro PCR reakci, což odpovídá i mým výsledkům. Fragmenty na elektroforetickém snímku nejsou ostré a dostatečně ohraničené, což se velmi podobá fragmentům v publikaci. V publikaci Isabel Mafry (Mafra I., 2008), která porovnávala izolaci pomocí několika kitů a metodou CTAB-PVP na vzorcích sójové omáčky a tepelně opracovaných potravin, autorka uvádí jako metodu první volby izolaci pomocí CTAB-PVP, což odpovídá i mým výsledkům. Pokud porovnáám obě mnou použité metody CTAB-PVP s ostatními použitými metodami, je zřejmé, že jsem s jejich pomocí vyizoloval ze všech mých vzorků dostatečně kvalitní DNA pro PCR reakci. Částečný rozpor přichází u izolačního kitu NucleoSpin® Plant II od firmy Macherey-Nagel (D), pomocí kterého jsem vyizoloval dostatečně kvalitní a čistou DNA ze všech vzorků, stejně jako CTAB-PVP metody, což podle mě dělá z tohoto izolačního kitu také metodu první volby. A pokud vezmeme v úvahu i časovou náročnost a nutnost určité zručnosti při použití CTAB-PVP metod, doporučil bych určitě jako metodu první volby izolační kit NucleoSpin® Plant II od firmy Macherey-Nagel (D). Pokud se zaměříme na vzorky semen, vědci z Pákistánu Shahzadi, I. et al., (2010) zkoušeli několik metod izolace na rostlinný materiál, který obsahoval velké množství olejnatých látek. Jako nejlépe vyhovující metoda pro jejich izolaci, byla modifikovaná metoda CTAB-PVP pro rostliny, což odpovídá i mým výsledkům. Pokud porovnáme všechny moje elektroforetické snímky, zjistíme, že pouze pomocí metod izolace DNA s použitím CTAB-PVP, bylo možné ze vzorků semen, které obsahují velké množství olejnatých látek, získat dostatečně kvalitní DNA, která po PCR reakci tvořila zřetelné, ostré a ohraničené fragmenty na gelu. V další studii (Morisset D., et al., 2013) se můžeme dočíst o použití izolačního kitu NucleoSpin® Food od firmy Macherey-Nagel (D) a CTAB-PVP metody. Jako materiál ve studii byl použit certifikovaný materiál potravin poskytnutý EU Joint Research Centre s určitým obsahem geneticky modifikovaných plodin pro prokázání. Studie prokázala využitelnost izolačního kitu NucleoSpin® Food i metody CTAB-PVP, což odpovídá pouze částečně mým výsledkům. Elektroforetický snímek potvrzuje využitelnost CTAB-PVP metod pro mnou testované vzorky potravin, bohužel elektroforetický snímek z izolace pomocí izolačního kitu NucleoSpin® Food od firmy Macherey-Nagel (D) je v rozporu s publikací. Na snímku vidíme pouze

částečnou schopnost izolovat dostatečně kvalitní DNA pro PCR reakci z potravinových vzorků. Jedna z novějších prací (Abdel-Latif A., Osman G., 2017), je zaměřena na optimalizaci izolace DNA z obilí (vzorky listů a semen), s cílem najít nejvhodnější metodu, která by dokázala vyizolovat dostatečně kvalitní DNA pro PCR reakci. Jedna z metod použitých v publikaci byla CTAB-PVP modifikovaná verze pro rostliny. Dle jejich výsledků se tato metoda bohužel neosvědčila a nebyla doporučena, což je v rozporu s mými výsledky, kdy pomocí CTAB-PVP modifikovaná verze pro rostliny byla vyizolována kvalitní DNA jak ze vzorků listů, tak i semen, s dostatečně ohraničenými fragmenty na elektroforetickém snímku. Jako jeden z hlavních důvodů rozdílného výsledku oproti mé práci, by mohlo být použití vzorků semen z pšenice. Pšenice na rozdíl od máku, který obsahuje spíše olejnaté látky, obsahuje hlavně škrob, což mohlo vést k vyizolování velmi znečištěné, nedostatečně kvalitní DNA pro PCR reakci. Podobného závěru jako (Abdel-Latif A., Osman G., 2017) dosáhli i čínští vědci, kteří ve své publikaci (Wang X., et al., 2012) srovnávali metodu CTAB-PVP, SDS a komerčně dodaný kit. Jako vzorek sloužily potraviny, s obsahem sóji. Vědci CTAB-PVP metodu nepodpořili hlavně z důvodu časové náročnosti, s čímž musím také souhlasit, kdy izolace touto metodou zabere několik hodin času, s inkubační dobou trvá několik dní. Ale jako hlavní argument byl příliš nízký výtěžek, maximálně do 150ng/mg podle výsledků v publikaci. Toto zjištění je v rozporu s mými výsledky, kdy mé hodnoty se v průměru pohybovaly kolem 200ng/mg a některé se blížily až k 300ng/mg. I přes velikou časovou náročnost, se podle výsledků z elektroforetického snímku, kde vidíme zřetelné a ostré fragmenty, jedná však o nenahraditelnou metodu a v případě nutnosti izolace v referenčních laboratořích například pro soudní spory, tuto metodu doporučuji jako jednu z hlavních metod.

Tabulka 8 - Shrnující tabulka podle zjištěných údajů z elektroforetických snímků, která metoda je nevhodnější, pro určitý typ vzorku

Typ vzorku	Metoda první volby	Metody, které lze využít	Nevhodné metody
Listí	CTAB-PVP modifikovaná pro rostliny CTAB-PVP zkrácená verze	NucleoSpin® Plant II MagCore s kitem 401	NucleoSpin® Food
Semena	CTAB-PVP modifikovaná pro rostliny	MagCore s kitem 401 NucleoSpin® Food CTAB-PVP zkrácená verze	NucleoSpin® Plant II
Buchta	CTAB-PVP modifikovaná pro rostliny NucleoSpin® Plant II	NucleoSpin® Food CTAB-PVP zkrácená verze	MagCore s kitem 401
Nádivka	CTAB-PVP modifikovaná pro rostliny NucleoSpin® Plant II	CTAB-PVP zkrácená verze	MagCore s kitem 401 NucleoSpin® Food

7 Závěr

Na základě všech získaných údajů jsem zhodnotil kvalitu DNA izolované pomocí několika metod, zejména podle fragmentů na elektroforetických snímcích. Testované metody jsem podle této kvality přehledně rozřídil (Tabulka 8). Je zřejmé, že nevhodnější metody izolace DNA jsou CTAB-PVP modifikovaná pro rostliny (4.2.1) a CTAB-PVP zkrácená verze (4.2.2). I přes vhodnost metody na všechny testované vzorky, bych ale v případě jiné dostačující možnosti doporučil využít jinou. Obě metody jsou dle mého názoru jak časově náročné, zejména CTAB-PVP modifikovaná pro rostliny, tak je metodou kladen důraz na zručnost a proškolenost laborantů. Metoda je podle mého názoru nevhodná pro plošné zavedení a testování velkého objemu vzorků. Další nevýhoda obou metod, je nutnost vlastní přípravy chemikálií a nutnost drahého vybavení laboratoří, v neposlední řadě i práce s nebezpečnými a toxickými látkami. Jako adekvátní náhrada těchto metod mohou sloužit kity od společnosti Macherey-Nagel (D). Jmenovitě se jedná o kit NucleoSpin® Food (4.2.4), který dle mých výsledků poskytuje dostatečně čistou DNA pro PCR reakci u vzorků typu semen a bucht a kit NucleoSpin® Plant II (4.2.3), který poskytuje dle mých výsledků dostatečně čistou DNA pro PCR reakci u vzorků typu bucht a nádivka, částečně ze vzorků listů, kde by bylo vhodné ještě další přečištění vzorků. Obě metody nejsou časově nijak náročné a pro provedení stačí průměrné laboratorní vybavení, práce s nebezpečnými látkami je zde snížena na minimum, či úplně odstraněna. V soupravě jsou všechny potřebné chemikálie a zkumavky, není potřeba tudíž nic dokupovat, což je podle mě velká výhoda těchto souprav. Zároveň je zde reálná možnost zpracování velkého množství vzorků v krátkém čase, což z těchto dvou kitů podle mě dělá dobré kandidáty pro plošné zavedení v laboratořích. Bohužel zkoumaná metoda na automatickém izolátoru MagCore pomocí kitu 401 (4.2.5), která má největší potenciál pro plošné rozšíření z důvodu svojí automatizace, poskytla dostatečně čistou DNA po PCR reakci pouze ze vzorku listů. Je zde teoretická možnost izolování ze vzorků semen, bylo by ale nutné vzorky dále nějakým způsobem dodatečně přečistit, což by se odrazilo v dalších případných nákladech a časové náročnosti metody, podle mě je tedy tento přístroj zcela nevhodný pro rutinní zavedení v testování pravosti máku.

Seznam použité literatury

1. ABDEL-LATIF, Amani a Gamal OSMAN, 2017. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. In: *Plant Methods* [online]. **13**(1) [cit. 2019-04-24]. DOI: 10.1186/s13007-016-0152-4. ISSN 1746-4811. Dostupné z: <http://plantmethods.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13007-016-0152-4>
2. ADAM, Zdeněk, 2005. *Kostní nádorová choroba*. Praha: Grada. ISBN 80-247-1357-8.
3. ANDERSSON, Kristoffer, c2008. *Ribonucleotide reductase*. New York: Nova Biomedical Books. Molecular anatomy and physiology of proteins. ISBN 978-1-60456-199-9.
4. BATES, Andrew D. a Anthony MAXWELL, 2005. *DNA topology*. 2nd ed. New York: Oxford University Press. ISBN 01-985-0655-4.
5. BAYNES, John W. a Marek H. DOMINICZAK, 2014. *Medical biochemistry*. 4th ed. Edinburgh: Saunders Elsevier. Student consult. ISBN 978-1-4557-4580-7.
6. BERÁNEK, Martin, 2016. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-3224-7.
7. BIRREN, Bruce W. a Eric Hon Cheong LAI, c1993. *Pulsed field gel electrophoresis: a practical guide*. San Diego: Academic Press. ISBN 01-210-1290-5.
8. BLOCK, Richard Joseph, 1955. *A manual of paper chromatography and paper electrophoresis*. [2d ed.]. New York: Academic Press. ISBN 52-9358.
9. BUTLER, John M., c2005. *Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers*. 2nd ed. Boston: Elsevier Academic Press. ISBN 01-214-7952-8.
10. CONN, Michael P., 2012. *Laboratory Methods in Cell Biology: Biochemistry and Cell Culture: Methods in Cell Biology – Svazek 112*. New York: Academic Press. ISBN 0124055494.
11. DE LA BÉDOYÈRE, Camilla, 2006. *The discovery of DNA*. Milwaukee, WI: World Almanac Library. ISBN 9781477718148.
12. DENNISON, Clive, c2003. *A guide to protein isolation*. 2nd ed. Boston: Kluwer Academic Publishers. ISBN 14-020-1224-1.

13. DOLEŽAL, Martin, 2013. *Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém*. Praha: Karolinum. ISBN 978-802-4623-825.
14. FLEISCHMANN, Andreas a Heubl GÜNTHER, 2009. *Anales del Jardín Botánico de Madrid: Overcoming DNA extraction problems from carnivorous plants* [online]. (66) [cit. 2019-04-21]. 209-215. ISSN 1988-3196.
15. GROODY, Wayne W., Robert M. NAKAMURA, Charles M. STROM a Frederick L. KIECHLE, 2010. *Molecular Diagnostics: Techniques and Applications for the Clinical Laboratory*. Cambridge: Elsevier. ISBN 978-0-12-369428-7.
16. HARAGSIM, Oldřich, 2007. *Včelařské byliny*. Praha: Grada. Česká zahrada. ISBN 978-80-247-2157-6.
17. HARVEY, Richard A. a Denise R. FERRIER, 2011. *Lippincott's illustrated reviews: biochemistry*. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer. ISBN 978-1609139988.
18. HASAN, Heather, 2005. *Mendel and the laws of genetics*. New York: Rosen Pub. Group. ISBN 14-042-0309-5.
19. HAVEN, Kendall F., 2007. *100 greatest science discoveries of all time*. Westport, Conn.: Libraries Unlimited. ISBN 978-159-1582-656.
20. CHYBÍK, Josef, 2009. *Přírodní stavební materiály*. Praha: Grada. Stavitel. ISBN 978-802-4725-321.
21. INNIS, Michael A., c1990. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press. ISBN 01-237-2181-4.
22. JENNINGS, W. Bryan, 2017. *Phylogenomic data acquisition: principles and practice*. Boca Raton: Taylor & Francis. ISBN 978-1-4822-3534-0.
23. KOBILINSKY, Lawrence F., Louis LEVINE a Henrietta MARGOLIS-NUNNO, c2007. *Forensic DNA analysis*. New York: Chelsea House. ISBN 0-7910-8923-1.
24. KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM, 2012. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2977-0.
25. LINDSTEN, Jan, 1996. *Physiology Or Medicine, 1922-1941*. Singapore: World Scientific. ISBN 981-02-3410-4.
26. LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Martin WEHLING, 2004. *Farmakologie a toxikologie: překlad 15., zcela přepracovaného vydání*. Vyd. 2. české. Praha: Grada. ISBN 978-802-4708-362.

27. MARX, Christy, 2005. *Watson and Crick and DNA*. New York: Rosen Central Primary Source. ISBN 978-140-4203-129.
28. MAFRA, Isabel, 2008. *Food Control: Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products*, 19. Elsevier, (12). 1183-1190. ISSN 0956-7135.
29. MCPHERSON, M. J. a S. G. MØLLER, c2006. *PCR*. 2nd ed. New York. Basics (Routledge (Firm)). ISBN 04-153-5547-8.
30. MIČIANOVÁ, V., K. ONDREIČKOVÁ, D. MUCHOVÁ, L. KLČOVÁ, M. HUDCOVICOVÁ, M. HAVRLETOVÁ, D. MIHÁLIK a J. KRAIC. Forensic application of EST-derived STR markers in opium poppy. *Biologia*. 2017, 72(6), 587-594
31. MORISSET, Dany, Dejan ŠTEBIH, Mojca MILAVEC, Kristina GRUDEN, Jana ŽEL a Joshua L. HEAZLEWOOD, 2013. Quantitative Analysis of Food and Feed Samples with Droplet Digital PCR. In: *PLoS ONE* [online]. 8(5) [cit. 2019-04-21]. DOI: 10.1371/journal.pone.0062583. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0062583>
32. NOVÁK, Jan, 2007. *Jedovaté rostliny kolem nás*. Praha: Grada. Svět rostlin. ISBN 978-802-4715-490.
33. RUDIN, Norah a Keith INMAN, c2002. *An introduction to forensic DNA analysis*. 2nd ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press. ISBN 08-493-0233-1.
34. SINDEN, Richard R., 1994. *DNA structure and function*. San Diego: Academic Press. ISBN 978-012-6457-506.
35. SINGLETON, Paul, c2000. *DNA methods in clinical microbiology*. Boston: Kluwer Academic. ISBN 07-923-6307-8.
36. STREBLOVÁ, Eva, 2013. *Souhrnné texty z chemie: pro přípravu k přijímacím zkouškám (přírodovědné obory, lékařství)*. 3., upr. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-2242-2.

37. STREBLOVÁ, Eva, 2013. *Souhrnné texty z chemie: pro přípravu k přijímacím zkouškám (přírodovědné obory, lékařství)*. 3., upr. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-2135-7.
38. SHAHZADI, Irum, Ahmad RAZA, Amjad HASSAN a Mohammad SHAH, 2010. *Genetics and Molecular Research: Optimization of DNA extraction from seeds and fresh leaf tissues of wild marigold (*Tagetes minuta*) for polymerase chain reaction analysis*, (9). 386-93. ISSN 1676-5680.
39. VORLÍČEK, Jiří, Zdeněk ADAM a Yvona POSPÍŠILOVÁ, 2004. *Paliativní medicína, druhé přepracované a doplněné vydání*. 2. Praha: Grada Publishing. ISBN 80-0279-7.
40. WALKER, John M. a Ralph RAPLEY, c2005. *Medical biometrics handbook*. Totowa, N.J.: Humana Press. ISBN 15-882-9334-3.
41. WANG, Xiumin, Da TENG, Fang TIAN, Qingfeng GUAN a Jianhua WANG, 2012. Comparison of Three DNA Extraction Methods for Feed Products and Four Amplification Methods for the 5'-Junction Fragment of Roundup Ready Soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. **60**(18), 4586-4595 [cit. 2019-04-25]. DOI: 10.1021/jf300827q. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf300827q>
42. WEISING, Kurt, 2005. *DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications*. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press. ISBN 08-493-1488-7.
43. WHITTEN, Kenneth W., Raymond E. DAVIS, M. Larry PECK a G. G. STANLEY, [2014]. *Chemistry*. Tenth edition. Belmont, CA: Brooks/Cole Cengage Learning. ISBN 978-1-133-61066-3.
44. XU, Wentao, 2016. *Functional nucleic acids detection in food safety: theories and applications*. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg. ISBN 978-981-1016-172.

Seznam obrázků

Obrázek 1 - Původní model DNA (Marx Ch. 2005).....	10
Obrázek 2–Purin (Sinden R. 1994)	11
Obrázek 3–Adenin (Sinden R. 1994)	11
Obrázek 4–Guanin (Sinden R. 1994).....	11
Obrázek 5 – Pyrimidin (Sinden R. 1994)	12
Obrázek 6 – Thymin (Sinden R. 1994).....	12
Obrázek 7 – Cytosin (Sinden R. 1994)	12
Obrázek 8 – Uracil (Sinden R. 1994)	12
Obrázek 9 - β -D-ribóza (Sinden R. 1994)	13
Obrázek 10 - β -D-2-deoxyribóza (Sinden R. 1994)	13
Obrázek 11 - Fosfodiesterová vazba mezi nukleotidy (Streblová E. 2012)	14
Obrázek 12 - Cytosin-Guanin pár (Sinder R. 1994)	15
Obrázek 13 - Adenin-Thymin pár (Sinder R. 1994).....	15
Obrázek 14 - Ukázka tzv. major groove na B-formě (Baynes J., Dominiczak M. 2014)	16
Obrázek 15 - B-forma (Bates A., Maxwell A. 2005)	16
Obrázek 16 - A-forma (Bates A., Maxwell A. 2005)	16
Obrázek 17 - Z-forma (Bates A., Maxwell A. 2005)	16
Obrázek 18 - Ukázka výsledku při použití metody NanoDrop (Conn P. 2012).....	20
Obrázek 19 - Schéma jednoduché elektroforézy (Butler J., 2005).....	25
Obrázek 20 - Schéma papírové elektroforézy (Block R., 1955).....	26
Obrázek 21 - T-blok (nosič).....	37
Obrázek 22 - Schéma kitu 401	37
Obrázek 23 - Grafické znázornění PCR programu pro primery PSOM17	39
Obrázek 24 - Výsledky z elektroforézy pro metodu CTAB-PVP	41
Obrázek 25 - Výsledky z elektroforézy pro metodu CTAB-PVP modifikovaná pro rostliny - zkrácená verze	42
Obrázek 26 - Výsledky z elektroforézy pro izolační kit NucleoSpin® Plant II od firmy Macherey-Nagel (D)	43
Obrázek 27 - Výsledky z elektroforézy pro izolační kit NucleoSpin® Food od firmy Macherey-Nagel (D) s pořadím vzorků:	45

Obrázek 28 - Výsledky z elektroforézy pro instrumentální metodu na přístroji MagCore s kitem 401.....	46
---	----

Seznam tabulek

Tabulka 1 - Použité negativní vzorky pro následné měření získané koncentrace DNA dle použitých metod.....	38
Tabulka 2 - Schéma složení základního roztoku pro PCR reakci.....	39
Tabulka 3 - Výsledky ze spektrofotometru pro metodu CTAB-PVP.....	41
Tabulka 4 - Výsledky ze spektrofotometru pro metodu CTAB-PVP modifikovaná pro rostliny - zkrácená verze	42
Tabulka 5 - Výsledky ze spektrofotometru pro izolační kit NucleoSpin® Plant II od firmy Macherey-Nagel (D)	43
Tabulka 6 - Výsledky ze spektrofotometru pro izolační kit NucleoSpin® Food od firmy Macherey-Nagel (D).....	44
Tabulka 7 - Výsledky ze spektrofotometru pro instrumentální metodu na přístroji MagCore s kitem 401.....	46
Tabulka 8 - Shrnující tabulka podle zjištěných údajů z elektroforetických snímků, která metoda je nejvhodnější, pro určitý typ vzorku	50

Seznam použitých zkratk

DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	nukleosid trifosfát
dsDNA	dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina
p.a.	pro analýzu
PCR	polymerázová řetězová reakce
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
RNA	ribonukleová kyselina
UV	ultrafialové záření
ssDNA	jednovláknová deoxyribonukleová kyselina