



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**VYUŽITÍ MAGNETICKÝCH ČÁSTIC PŘI IZOLACI
DNA Z VÝROBKŮ Z OBILOVIN**

THE APPLICATION OF MAGNETIC PARTICLES FOR DNA ISOLATION FROM CEREAL
PRODUCTS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Anastasiia Starenkova

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc

BRNO 2018

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1232/2017
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Anastasia Starenkova**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.**
Akademický rok: 2017/18

Název diplomové práce:

Využití magnetických částic při izolaci DNA z výrobků z obilovin

Zadání diplomové práce:

1. Vyhledání a kritické zpracování dostupné literatury k dané problematice.
2. Izolace DNA z obilovin a výrobků z obilovin.
3. Ověření kvality izolované DNA pomocí PCR
4. Zpracování získaných experimentálních výsledků.
5. Vyhodnocení experimentů formou diskuse.

Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Anastasia Starenkova
student(ka)

doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Diplomová práce byla zaměřena na testování mikroizolace DNA za pomoci magnetických částic z cereálních výrobků v kvalitě vhodné pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Pro analýzu byly vybrány cereální sušenky a výrobky pro děti. Vzorby byly homogenizovány s použitím plastového kopistu v lyzačním roztoku s cetyltrimetylammonium bromidem (CTAB). Homogenáty byly purifikovány směsí chloroform-oktanol. Při přípravě homogenátu byl také testován vliv isopropanolu. Homogenáty byly použity pro izolaci DNA magnetickými částicemi. Byly testovány dva způsoby separace magnetických částic s navázanou DNA (magnetický separátor a magnetická jehla). Izolovaná DNA byla analyzována spektrofotometricky - byla zjišťována její koncentrace a čistota. Poté byla ověřována amplifikovatelnost DNA v PCR. Pro amplifikaci byly použity dvě sady primerů specifických pro rostlinnou ribosomální DNA. Produkty PCR s očekávanou délkou 700 a 220 bp byly detegovány agarózovou gelovou elektroforézou. Bylo zjištěno, že DNA izolovaná ze zrn cereálií, nakličených zrn a cereálních výrobků pomocí testovaných magnetických nosičů byla v kvalitě vhodné pro PCR.

ABSTRACT

The thesis has been focused on micro method for isolation of PCR-ready DNA using magnetic particles from cereal products. Cereal biscuits and cereal products for babies were selected for the analysis. These were homogenized using plastic copist in lysis buffer with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). The homogenates were purified using chloroform-octanol mixture. The effect of isopropanol in the preparation of homogenates was tested, too. Homogenates were used for DNA isolation by magnetic particles. Two ways to isolate magnetic particles with bounded DNA (magnetic separator and magnetic needle have been tested. Isolated DNA was analyzed spectrophotometrically – its concentration and purity were assessed. . After that, amplification of the DNA was tested in PCR. Two sets of primers specific for plant ribosomal DNA were used for their amplification. PCR products of expected length 700 bp and 220 bp were detected by agarose gel electrophoresis. It was shown that DNA isolated from seeds and cereal products using magnetic particles was in PCR-ready quality.

KLÍČOVÁ SLOVA

Cereální výrobky, izolace DNA, magnetické částice, magnetický separátor, magnetická jehla, polymerázová řetězová reakce, polymerázová řetězová reakce v reálném čase

KEYWORDS

Cereal products, isolation of DNA, magnetic particles, magnetic separator, magnetic needle, polymerase chain reaction, real-time polymerase chain reaction

STARENKOVA, A. *Využití magnetických částic při izolaci DNA z výrobků z obilovin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 65 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

*Rád bych touto formou poděkovala panu doc. Ing. Bohuslavu Rittichovi, CSc., za ochotu, laskavost, odborné a cenné rady při zpracování této diplomové práce.
Zvláštní poděkování patří také mé rodině a kamarádům za podporu a trpělivost během mého studia.*

1 ÚVOD	8
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1. Falšování potravin	9
2.2. Cereálie a výrobky z nich.....	9
2.2.1. Charakteristika	9
2.2.2. Význam pro zdraví člověka	10
2.2.3. Výrobky z cereálií.....	12
2.3. Izolace DNA z rostlinného materiálu (cereálií).....	12
2.4. Magnetické částice	13
2.4.1. Vlastnosti.....	13
2.4.2. Princip izolace DNA magnetickými částicemi.....	14
2.5. Polymerázová řetězová reakce.....	15
2.5.1. Princip polymerázové řetězové reakce (PCR)	15
2.5.2. Vyhody PCR.....	17
2.6. Detekce produktů PCR pomocí agarózové gelové elektroforézy.....	18
2.7. Polymerázová řetězová reakce v reálném čase.....	18
3 CÍL PRÁCE	20
4 EXPERIMENTALNÍ ČÁST	21
4.1. Materiál.....	21
4.1.1. Chemikálie.....	21
4.1.2. Magnetické nosiče.....	21
4.1.3 Použitý rostlinný materiál a výrobky.....	22
4.1.4. Přístroje a pomůcky.....	25
4.1.5. Roztoky pro izolaci DNA	26
4.1.6. Komponenty pro PCR a qPCR.....	26
4.1.7. Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu.....	27
4.2. Metody.....	27
4.2.1. Příprava homogenátu buněk.....	27
4.2.2. Izolace DNA pomocí magnetických nosičů v magnetickém separátoru.....	28
4.2.3. Izolace DNA pomocí magnetických nosičů magnetickou jehlou.....	29
4.2.4. Srážení DNA isopropanolem.....	29
4.2.5. Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA.....	30
4.2.6. Ověření kvality izolované DNA pomocí PCR.....	30
4.2.7. Detekce specifických produktů PCR agarózovou gelovou elektroforézou.....	31
4.2.8. Ověření kvality izolované DNA amplifikací pomocí qPCR.....	32
5 VÝSLEDKY.....	33
5.1. Metoda mikroizolace DNA z různých druhů zrn cereálií	33
5.1.1. Homogenizace vzorků a izolace DNA.....	33
5.1.2. Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA.....	34
5.1.3. Amplifikovatelnost DNA izolované ze zrn cereálií.....	34

5.2. Mikroizolace DNA z naklíčených zrn cereálií.....	35
5.2.1. Homogenizace vrorků a izolace DNA.....	35
5.2.2. Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA.....	35
5.2.3. Amplifikovatelnost DNA izolované z naklíčených zrn cereálií.....	37
5.3. Metoda mikroizolace DNA pomocí magnetické jehly.....	39
5.3.1. Homogenizace vzorků a izolace DNA.....	39
5.3.2. Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA izolované pomocí magnetické jehly.....	39
5.3.3. Amplifikovatelnost DNA izolované ze zrn cereálií pomocí magnetické jehly.....	41
5.3.4. Amplifikovatelnost DNA izolované z naklíčených cereálií pomocí magnetické jehly.....	42
5.4. Metoda mikroizolace DNA z cereálních výrobků.....	43
5.4.1. Homogenizace vzorků a izolace DNA z cereálních výrobků.....	43
5.4.2. Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA izolované z cereálních výrobků.....	43
5.4.3. Amplifikovatelnost DNA izolované z cereálních výrobků.....	47
5.4.4. Amplifikovatelnost DNA izolované z cereálních výrobků 220 bp.....	48
5.5. Amplifikovatelnost DNA izolované z cereálních výrobků pomocí qPCR.....	49
6 DISKUZE.....	53
6.1. Testování metody mikro izolace DNA pomocí magnetického separátoru ze zrn cereálií a z naklíčených zrn cereálií.....	53
6.1.1. Testování izolace a amplifikace DNA ze zrn cereálií pomocí magnetického separátoru.....	53
6.1.2. Testování izolace a amplifikace DNA z klíčků cereálií pomocí magnetického separátoru.....	54
6.2. Testování izolace a amplifikace DNA z naklíčených zrn cereálií pomocí magneticky jehly.....	54
6.3. Testování izolace a amplifikace DNA z výrobků.....	55
6.4. Amplifikace DNA izolované z cereálních výrobků pomocí qPCR.....	56
7 ZÁVĚR.....	57
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	58
9 POUŽITÉ ZKRATKY.....	64

1 ÚVOD

Pro zdraví člověka je důležitá autenticita a správně označení potravin. Autenticita potravin je také důležitá pro ochranu tradičních výrobků. K falšování potravin dochází kvůli ekonomickému zisku, kdy se drahá složka potravin nahradí levnější. Takovou náhradou se klame spotřebitel a může mít nevhodné účinky na jeho zdraví. Dodržování správného složení a označování potravin se kontroluje s pomocí legislativy a koncepcí systému analýzy rizika a stanovení kritických kontrolních bodů (HACCP), mezinárodních standardů (IFS Food). Často se kontroluje mikrobiologická kontaminace výrobků patogenními mikroorganismy a imunologickými testy přítomnosti alergenů a toxinů. Metody založené na genetické analýze se v poslední době používají i pro identifikaci falšovaných potravin. [1,2]

Izolace DNA v množství a kvalitě vhodné pro PCR jsou důležité u metod, které se založené na genetické analýze. Existuje množství metod založených na izolaci DNA z rostlinného materiálu. Žádnou z nich však nelze používat jako univerzální pro všechny rostliny. Pro různé druhy rostlin je nutné metodu izolace DNA modifikovat. Klasická je metoda izolace DNA pomocí směsi s CTAB. Často se provádí modifikace složek lyzačního roztoku a jejich koncentrací. Izolace DNA z cereálií a z cereálních výrobků je velmi komplikovaný proces. Hlavním problémem při izolaci DNA je skutečnost, že zrno obsahuje velké množství polysacharidů, polyfenolů a proteinů. Těto látky ovlivňují koncentraci DNA a její amplifikovatelnost, neboť jsou inhibitory PCR. Aplikace PCR se specifickými priméry umožnila identifikaci pšenice, jačmene a rýže v bezpečnostních potravinách [3]. Velmi důležité při izolaci DNA je uvedené látky odstranit nebo alespoň snížit jejich koncentraci. Další problémem při izolaci DNA z výrobků je její degradace při tepelném zpracování. [4,5].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Falšování potravin

Problém falšování potravinářských výrobků přišlapal objevil před 300 lety během Velké průmyslové revoluce v Evropě. Vzhledem ke značné koncentraci pracovníků v průmyslových podnicích ve Velké Británii, Německu, Belgii a dalších zemích západní Evropy se v důsledku zvýšené spotřeby některých potravin rozšířilo jejich záměrné falšování. Potravinové produkty byly falšovány např. přidáváním mouky k pepři, popele do čaje, pilin ze stříbra do kávy, mědi do marinád, octanu olovnatého a kyseliny skořicové – do vína a pod. [6]. Během devatenáctého století, hlavně v Německu, byl prováděn intenzivní výzkum, který odhalil falšování potravin. Byla vyvinuta řada fyzikálně-chemických metod a byly navrženy potřebné přístroje.

V současné době problém odborných znalostí o potravinách již překonal zájmy jednotlivých laboratoří, vědeckých institucí a dokonce i států. Nyní je v centru mezinárodních organizací: Světová zdravotnická organizace (WHO), Organizace pro výživu a zemědělství (FAO), Program OSN pro životní prostředí (UNEP), Mezinárodní organizace pro normalizaci (ISO).

V dnešním světě se požadavky na kvalitu potravin staly přísnějšími. Je důležité, aby kvalita potravinářských výrobků byla shodná s požadavky stanovenými ve státních normách a technických podmínkách jejich výroby.

Identifikací potravinářských výrobků je zjištění shody jejich vlastností, vyznačených v průvodních dokladech nebo v jiných informačních prostředcích, s požadavky, které byly výrobci předloženy. Jako prostředek identifikace potravinářských výrobků se používají normativní technické dokumenty a označení [5,7-10].

2.2. Cereálie a výrobky z nich

2.2.1. Charakteristika

Všechny známé obiloviny patří do stejné čeledi *Poaceae* (lipnicovité), pro kterou se v některých zemích (např. USA) užívá starší označení *Graminae* (trávy), další botanická taxonomie je ale rozlišuje. S tím částečně souvisí odlišné složení obilného zrna a případně i poněkud odlišné fyziologické působení, včetně alergenní aktivity [11].

Pšenice je nejstarší plodinou, protože její historie sahá asi 13 000 lety. Původně rostoucí, s největší pravděpodobností ve střední Asii, se tato kultura zrnina se rozšířila po celém světě. Lidé používají mouku získanou z pšenice pro výrobu chleba a pečiva, protože ve srovnání s ostatními zrninami má nejlepší vlastnosti při pečení. Jsou spojeny s vyváženým poměrem škrobu, bílkovin a lepku (glutenu), což je proteinová látka, která váže těsto. Pšeničné otruby, které se skládají ze slupek a klíčků, jsou bohaté na minerály, stopové prvky, bílkoviny a tuky. Velkou část otrub tvoří vláknina (cca 43 %), která se skládá z celulózy, hemicelulózy a ligninu. Často jsou součástí smíšených produktů z různých obilovin a snídaňových cereálií [11-12].

Pšeničné zrno obsahuje průměrně 13% bílkovin, 1,9% tuku a vlákniny, 1,8% minerálních látek, mikroprvky jako je železo a vitamíny. Největší podíl tvoří sacharidy a polysacharidy, které tvoří 68% obsahu zrna [12].

Ječmen pochází z Mezopotámie. Jedná se o travnatou rostlinu citlivou na světlo, která mezi všemi zrny vyžaduje nejkratší čas od výsevu až po dozrání zrna. Většina ječmene se používá pro přípravu sladu v pivovarech.

Oves se pochází z Asie. Ve svých semenech je koncentrováno největší množství rostlinného tuku. Navíc je to obilná kultura s největším množstvím živin. Spolu s vysokou koncentrací tuků (7%) obsahují vysoce kvalitní bílkoviny, vitamíny rozpustné v tucích a stopové prvky, jako je železo. Zřídka se používá jako potravina celné zrna. Oves se často používá k jídlu ve formě ovesných vloček, které jsou např. základem müsli.

Pohanka, připomíná cereální zrno, ale patří do čeledi rdesnovitých (*Polygonaceae*) rodu *Fagopyrum*. Trojúhelníkové, lesklé hnědé plody obsahují bílkoviny. Pohanka je používána jako potravina ve formě celých loupáných obilovin, mouky nebo obilovin. Používá se při přípravě chleba, polévek, knedlíků, některých druhů klobás a palačinek. V některých zemích je oblíbená pohanková kaše [12-13].

2.2.2. Význam pro zdraví člověka

Obiloviny tvoří základ jídelníčku člověka již po dobu delší než je dvanáct tisíc let a jsou hlavní složkou potravy lidí dožívajících se vysokého věku. Obiloviny průměrně obsahují 60 - 70 % polysacharidů, 8 - 13 % bílkovin a 1 - 5 % tuků. Jsou zdrojem vitamínů skupiny B a vitamínu E, dále vápníku, železa, hořčíku, mědi, zinku a fosforu [12].

Cereálie obsahují mnoho vlákniny. Vlákna, která je obsažená v celozrnných výrobcích, má nezastupitelný význam pro zdraví člověka. Má totiž příznivý vliv na celou řadu nemocí, především nemocí týkajících se srdce a cév, cukrovky a prevence rakoviny tlustého střeva. Strava bohatá na vlákninu upravuje zažívání a má pozitivní vliv na střevní mikroflóru. Váže na sebe žlučové kyseliny a cholesterol. Vlákna omezuje vstřebávání cholesterolu ze stravy živočišného původu, zachytává molekuly cholesterolu, váže je a následně odvádí stolicí ven. A takto vázaná molekula cholesterolu již nemůže přejít do krve a odtud do jater. V jaterních buňkách se cholesterol mění na žlučové kyseliny, žlučovodem putují tyto kyseliny do střeva. Část jich odchází stolicí, ale část se vstřebává do krve a odtud zpět do jater [14].

Z nutričního hlediska, tj. podle využitelnosti (stravitelnosti) sacharidů v lidském organismu, rozlišujeme sacharidy využitelné (glukosa, fruktosa, sacharosa, maltosa, laktosa, škrob), špatně využitelné (xylosa, arabinosa, rafinosa, stachyosa) a nevyužitelné (mannosa, celulosa, β-glukany, hemicelulosa, pektiny, rezistentní škrob, rostlinné gummy a slizy). V řadě obilovin se navíc vyskytují biologicky aktivní látky sacharidové povahy jako, jsou galaktooligosacharidy, fruktooligosacharidy, které mohou vykazovat pozitivní prebiotické účinky. Z obilovin jsou nejvýznamnějším zdrojem proteinů pro výživu člověka v našich podmínkách v první řadě pšenice a žito. Obsah proteinů vnějších (subaleuronových) částí obilného zrna je výrazně vyšší než u vnitřních částí. Proto obsah proteinů v mouce značně závisí nejen na druhu a odrůdě rostliny, ale velmi významně i na stupni vymletí mouky a dalších faktorech. Tmavé celozrnné mouky mají vyšší obsah proteinů než bílé, rozdíl bývá až 4 % [14]. Obsah proteinů ve vybraných cereálních výrobcích je uveden v Tabulce 1.

Tabulka 1 Obsah proteinů ve výrobcích z cereálií [15]

Potravina	Obsah proteinu (%) rozmezí	Obsah proteinu (%) průměr
Pšeničná mouka	8,1 – 12,8	10,1
Žitná mouka	5,1 – 12,0	9,6
Chléb žitno-pšeničný	4,7 – 11,6	6,7
Světlé (běžné) pečivo	7,3 – 9,7	8,5
Cukrářské výrobky	3,5 – 7,8	5,6
Těstoviny	9,8 – 12,5	11,8
Rýže bílá (loupaná)	-	7,5
Rýže hnědá (pololoupaná, natural)	-	7,6

2.2.3. Výrobky z cereálií

Jedná o všechny výrobky, které jsou vyrobeny z obilovin. Mouky, které se vyrábí z celého zrna obsahují vlákninu, vitamíny, minerální látky a antioxidanty ve větším množství než ty, u kterých se odstraní klíček a obalové vrstvy obilí. Potraviny připravené z celozrné mouky jsou považovány za zdravější variantu výrobků.

2.3. Izolace DNA z rostlinného materiálu (cereálií)

Izolace čisté, neporušené a vysoce kvalitní DNA je pro všechny molekulární studie velmi důležitá. Cílem práce je získání vysoce kvalitní DNA s vysokou molekulovou hmotností z rostlinných tkání. Proto bude v dalším textu věnována pozornost této problematice. Biochemické složení rostlinné tkáně u různých rostlinných druhů se výrazně liší. Při použití jedineho způsobu izolace DNA z různých druhů rostlin izolace může mít neuspěšné výsledky. Postup izolace musí být speciálně upraveny pro každý rostlinný druh a dokonce i pro každou rostlinou tkáň. Proto že řada rostlinných druhů využívaných v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu obsahuje vysoké množství polysacharidů, polyfenolů, pigmentů, taninů, alkaloidů, terpenů, flavonoidů a chinonů. Vzhledem k přítomnosti endonukleas může docházet k degradaci DNA [16,17]. Největší podíl na složitosti izolace DNA z rostlin mají polysacharidy, polyfenoly a proteiny [20]. Po rozrušení buněk může dojít k adsorpci těchto látek na DNA [18,23]. Odstranění těchto látek hraje důležitou roli při izolaci vysoce kvalitní DNA z rostlinných tkání. Přítomnost polysacharidů ve vzorku nese sebou několik problémů. Polysacharidy inhibují enzymovou aktivitu Taq DNA polymerasy při amplifikaci v PCR a také snižují aktivitu ligas a restričních endonukleas [19]. Přítomnost polysacharidů ve vzorku DNA je charakteristická vznikem velmi viskózních roztoků, které se špatně pipetují [21,22].

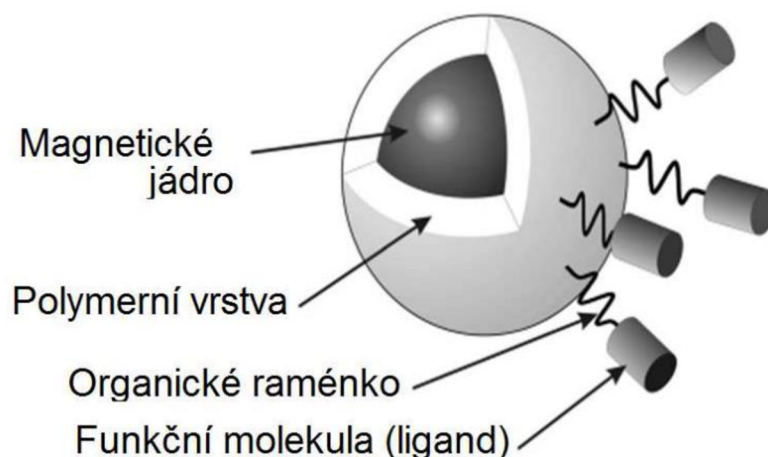
Pro snížení negativního vlivu uvedených látek na kvalitu a kvantitu izolované DNA se používá řada látek: polyvinylpyrrolidon (PVP) a β -mercaptoethanol, isopropanol, manitol, vyšší koncentrace NaCl a proteinasa K.

2.4. Magnetické částice

V roce 1970 bylo poprvé popsáno použití magnetických částic pro transport léčiva do cílové bunky. V posledních letech byl zaznamenán rozvoj použití separačních technik využívajících magnetické částice v biomedicině. Magnetické separační techniky jsou využívány zejména v biochemii, molekulární a buněčné biologii, (nano)biotechnologiích, a (nano)medicině především pro jejich rychlost, cenu a vysokou účinnost separačního procesu [25-28].

2.4.1. Vlastnosti

Magnetické částice se skládají z magnetického jádra, ochranného obalu a funkčního povrchu (Obrázek 1). Magnetické jádro je většinou vyrobeno z oxidů železa a je zodpovědné za interakci s vnějším magnetickým polem. Aby došlo k ochraně analytu před stykem s kovem, je jádro obaleno tenkou ochrannou vrstvou, kterou nejčastěji tvoří polymery (polystyren, polyakrylové deriváty), organické kyseliny, přírodní sacharidy či různé anorganické matrice. Tato složka je diamagnetická a její výhodou je, že může být funkcionalizována.



Obrázek 1: Stavba magnetické částice

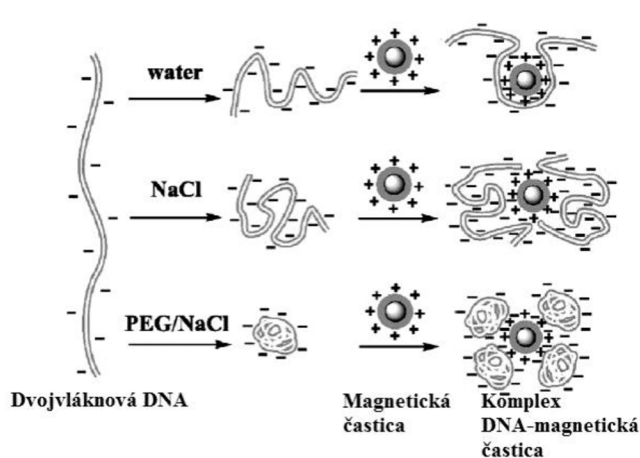
Průměr částic je obvykle v rozmezí 0,5–10 μm . Mezi základní vlastnosti patří velikost, tvar a polydisperzita částic [28]. Nosiče musí být stabilní v roztocích a biokompatibilní,

obsahovat vhodné funkční skupiny, minimálně adsorbovat nespecifické látky, nepodléhat nežádoucím chemickým přeměnám a současně mít vysoký obsah magnetického plniva, aby separace v magnetickém poli byla dostatečně rychlá a účinná [29,30].

2.4.2. Princep izolace DNA magnetickými částicemi

K izolaci DNA se využívají magnetické nosiče s různými funkčními skupinami na povrchu polymeru, které vykazují afinitu k cílové nukleové kyselině. Zvláště vhodné jsou částice, které jsou vyrobeny ze superparamagnetického materiálu. Tyto částice neinteragují mezi sebou v nepřítomnosti magnetického pole a jsou dobře dispergovány v médiu bez přítomnosti magnetického pole, aniž by docházelo k jejich shlukování.

Neselektivní adsorpce DNA na magnetické nosiče funkcionalizované karboxylovými skupinami byla s úspěchem použita k izolaci DNA. Tyto nosiče reverzibilně váží DNA v přítomnosti poly(ethylenglykolu) 6000 (PEG 6000) a chloridu sodného (Obrázek 2). Množství adsorbované DNA na nosič se mění v závislosti na koncentraci obou těchto látek. Změna koncentrace PEG000 a NaCl vede ke snížení aktivity vody a tím dochází ke kondenzaci dvoušroubovice DNA. Vyvolání kondenzace DNA působením vnější síly může být dosaženo pomocí osmotického tlaku, který je vyvolán neutrálním polymerem a monovalentní solí. Pro navození tohoto stavu lze použít poly(ethylenglykol 6000 (PEG 6000) a chlorid sodný. Při adsorpci DNA na povrch nosiče nedochází k interakci mezi karboxylovými a fosfátovými skupinami, ale k interakci dusíkatých bazí DNA s povrchovými karboxylovými skupinami magnetických nosičů. DNA lze tímto způsobem izolovat z komplexních vzorků obsahující inhibitory PCR v kvalitě vhodné pro PCR a restrikční analýzu.



Obrázek 2: Princíp izolace DNA pomocí magnetických částic [31]

2.5. Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) se stala jednou z nejdůležitějších metod v molekulární biologii. Jedná se o enzymatickou amplifikaci DNA *in vitro* o syntézu mnoha kopií vybrané sekvence templátové DNA v cyklické reakci s využitím termostabilní DNA polymerázy. Umožňuje až 10^6 násobné pomnožení fragmentu DNA během 2-3 hodin. Pro klasickou PCR je nutné znát nukleotidovou sekvenci fragmentu amplifikované DNA. Na základě této informace je možné chemicky nasynthetizovat primery, které jsou komplementární k 3' a k 5'-koncovým sekvencím úseku DNA, který má být zmnožen [32]. Od 3' konců těchto dvou primerů, pak dochází k syntéze nových vláken DNA [34]. Jednotlivé kroky amplifikace zahrnují denaturaci DNA, nasednutí (hybridizaci) primerů a syntézu nových komplementárních vláken DNA polymerázou. Opakování těchto kroků vede k syntéze PCR produktů (fragmentů DNA) s konci definovanými primery, které tvoří hlavní produkt reakce (amplikon). Dochází k syntéze i jiných fragmentů, ale jejich množství se v průběhu reakce snižuje a v konečném produktu tvoří zanedbatelné množství [35].

Vzhledem k vysoké citlivosti detekce je možné metodu PCR použít pro zjištění přítomnosti velmi malého množství nukleové kyseliny (buněk) ve vzorku. Základem úspěšné reakce je kvalitní templátová DNA, t.j. neporušený úsek DNA, který má být amplifikován. Dále je velice důležitým předpokladem navržení vhodných primerů tak, aby byla zajištěna specifita reakce. Pomocí PCR je možné detegovat specifické sekvence DNA v přítomnosti cizorodé DNA [33-36].

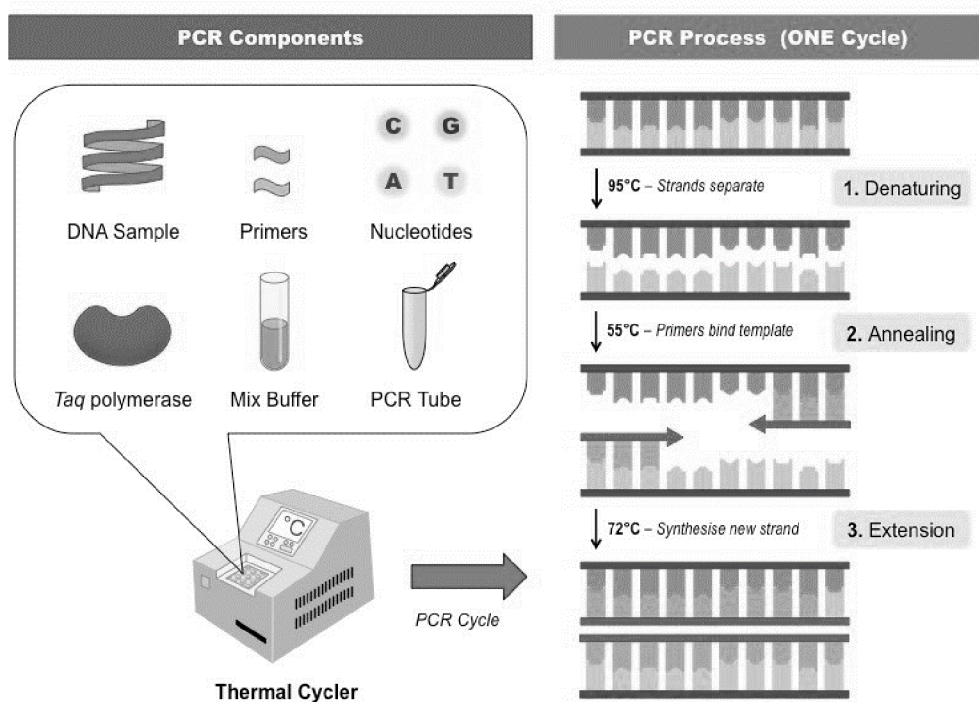
2.5.1. Princip polymerázové řetězové reakce (PCR)

Tvorba nukleotidů řetězce se provádí pomocí DNA polymerázy. K zahájení syntézy jsou potřebné primery. Primery jsou syntetické oligonukleotidy o délce 15-20 nukleotidů. Primery (zpravidla dva -přímý a reverzní) a jsou komplementární k části DNA matrice a úsek DNA omezený primery bude opakovaně kopírován DNA polymerázou. Cíl polymerázy spočívá v postupném přidávání nukleotidů, komplementární DNA matrice. V jednom teplotním cyklu jsou syntetizovány dva nové fragmenty DNA. Během 25 až 35 cyklů ve zkumavce se hromadí miliarda kopií cílové DNA [37-39].

Prvním krokem je denaturace templátové DNA. Při vysokých teplotách (90–97 °C) dochází k rozvolnění dvoušroubovice a vznikají dvě jednořetězcové molekuly DNA, na které mohou v dalším kroku nasedat primery.

K vazbě (hybridizaci) primerů na specifické cílové sekvence dochází při 50-60°C. Teplota vhodná k připojení primerů závisí především na délce primerů a na zastoupení A-T a G-C párů.

Posledním krokem je syntéza nových řetězců. Čas syntézy závisí na délce syntetizovaného fragmentu. V této fázi jsou připojovány jednotlivé deoxynukleotidy ve směru 5' → 3'. Teplota syntézy nových řetězců DNA probíhá v rozmezí 65–75 °C (Obrázek 3) [39-40].



Obrázek 3: Princip PCR.

Komponenty pro PCR

Reakční směs (obvykle v rozmezí 25 – 100 µL) se skládá z následujících složek:

- Matrice DNA (DNA templát) – makromolekula DNA, podle které se komplementárně syntetizují nové řetězce DNA. Obsahuje cílová místa pro primery.
- Oligonukleotidové primery – bývají synteticky připravené a jsou komplementární k templátové DNA, která má být amplifikována. Primery jsou sekvencně specifické.
- DNA polymerasa – katalyzuje syntézu nové DNA ve směru 5' → 3' podle sekvence nukleotidů v komplementárním řetězci DNA od 5' konce primeru. Ke katalýze se používají termostabilní polymerasy.

- 3'-deoxynukleotid-5-trifosfáty (dNTP) – (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) – stavební kameny pro syntézu nové DNA. Optimální koncentrace je 200 μM , toleranční rozpětí je 20 - 400 μM . Vysoká koncentrace dNTP (od 4 mM a výše) působí inhibičně, protože vyvazuje hořčnaté ionty.
- Mg^{2+} ionty – jsou nezbytné pro aktivitu DNA polymerasy. Koncentrace Mg^{2+} musí být optimalizována pro každou kombinaci primerů a DNA templátu. Obvykle se používá koncentrace 1,5 mM Mg^{2+} . Toleranční rozpětí je 0,5-0,8 mM. Vyšší koncentrace iontů snižuje specifitu PCR.
- Pufr pro PCR – vytváří optimální prostředí pro DNA polymerasu. Standardní reakční pufr obsahuje 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 - 8,8), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl_2 . případně může ještě obsahovat acetamid, albumin, želatinu nebo Tween 20.
- Voda pro PCR – používá se k doplnění směsi pro PCR na požadovaný objem. Nejvhodnější je voda o odporu 18 m Ω nebo voda pro injekce ČSL 4 [32,41].

2.5.2. Vyhody PCR

- Vysoká citlivost

Citlivost metody spočívá v tom, že může být amplifikována v PCR a cílová sekvence může být detekována, i když se objeví jednou ve vzorku za 105 buněk.

- Specifita analýzy

Pomocí PCR možné detekovat specifické infekční DNA v přítomnosti DNA jiných mikroorganismů a DNA hostitelského organismu. Možné současně detekovat DNA mikroorganismů stejného řadu.

- Univerzálnost metody PCR

Pro PCR diagnostiku infekčních onemocnění nebo dědičné onemocnění člověka lze použít stejné zařízení, postupovat podle všeobecných postupů pro přípravu a analýzu vzorků [42-45].

2.6. Detekce produktů PCR pomocí agarózové gelové elektroforézy

Existuje několik způsobů jak detegovat produkty PCR. Nejjednodušší a stále hojně používanou metodou je gelová elektroforéza. Elektroforéza se provádí na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. K identifikaci ampikonů lze použít ethidiumbromid. Někdy se místo ethidiumbromidu používají ionty stříbra.

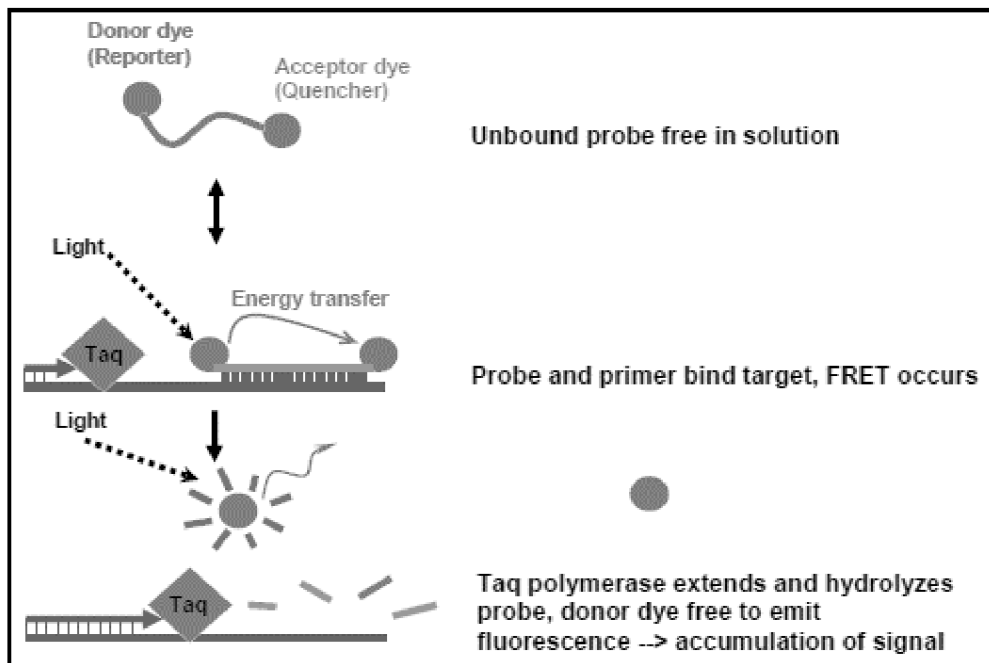
Agarózová gelovou elektroforézou lze použít k separaci DNA fragmentů podle velikosti. Metoda gelové elektroforézy je široce používána pro separaci nukleových kyselin: chromosomální a plazmidové DNA a RNA. Záporně nabitě molekuly DNA migrují v elektrickém poli od záporného pólu ke kladnému. Sacharido-fosfátová páteř nukleových kyselin je příčinou rovnoměrného rozložení negativních nábojů v molekulách DNA a RNA. Protože se zvyšujícím se počtem nukleotidů v molekule DNA (RNA) úměrně roste i náboj molekuly, poměr mezi molekulovou hmotností a nábojem je konstantní [45].

2.7. Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Metoda PCR v reálném čase (qPCR) je založena na monitorování a kvantitativní analýze akumulace produktů polymerázové řetězové reakce a na automatickém zaznamenávání a interpretaci získaných výsledků. Tato metoda nevyžaduje elektroforetickou fázi. PCR v reálném čase používají k detekci DNA během amplifikace fluorescenční barviva, fluorescenčně značené primery a oligonukleotidové sondy.

System detekce produktu v polymerázové řetězové reakci "v reálném čase" umožňuje cyklus po cyklu sledovat akumulaci amplifikované DNA. PCR v reálném čase umožňuje kompletní analýzu vzorku v rozmezí 30 až 120 minut [46-47].

V následujícím textu je jako příklad uvedeno použití fluorescenčně značené sondy. Oligonukleotidová sonda je schopna se připojit k vnitřnímu segmentu cílové DNA. Na 5'-konci je sonda značena reporterovým barvivem a na 3'-konci blokujícím činidlem. Vzhledem k tomu, že se produkt PCR akumuluje, sonda hybridizuje s ním. Vzhledem k blízkosti reportéru a blokátoru nedochází k žádné fluorescenci. Výsledkem kopírování sekvence je, že polymeráza dosáhne 5'-konce sondy; 5'-3'-exonukleasová aktivita polymerázy odpojí fluorescenční značku od 3' konce vzorku čímž uvolňuje fluorescenční reportér z jeho spojení se signálním blokátorem, což vede ke zvýšení fluorescence. Úroveň fluorescence je proporcionalní specifického reakčního produktu (Obrázek 4) [46-50].



Obrázek 4: Princip PCR "v reálném čase"

CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce byla izolace DNA za pomoci magnetických částic z potravinových výrobků z cerealií v kvalitě vhodné pro PCR. Pro analýzu byly vybrány celnozrný výrobky.

V práci byly řešeny jednotlivé dílčí úkoly:

- homogenizace za využití plastového kopistu a příprava lyzátu buněk pro izolaci DNA, izolace DNA za využití magnetických částic.
- spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA a zjištění kontaminace látkami inhibujícími PCR (polyfenoly a proteiny a polysacharidy), overení amplifikovatelnosti DNA pomocí PCR.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Materiál

4.1.1. Chemikálie

- agaróza pro elektroforézu DNA (Serva, Heidelberg, SRN)
- cetyltrimethylammonium bromid – CTAB (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- ethanol pro UV spektrofotometrii (Merck, Darmstadt, SRN)
- ethidium bromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- ethylendiaminotetraoctová kyselina – EDTA (Serva, Heidelberg, SRN)
- fluorescenční barvivo GoldView (Ecoli, Bratislava, SR)
- hydroxid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- isopropanol (PENTA, Praha, ČR)
- chlorid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- chloroform (PENTA, Praha, ČR)
- kyselina boritá (PENTA, Praha, ČR)
- kyselina chlorovodíková (PENTA, Praha, ČR)
- oktanol (PENTA, Praha, ČR)
- β -merkptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- polyethylenglykol 6000 – PEG 6000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Tris-báze (Amresco, Solon, USA)

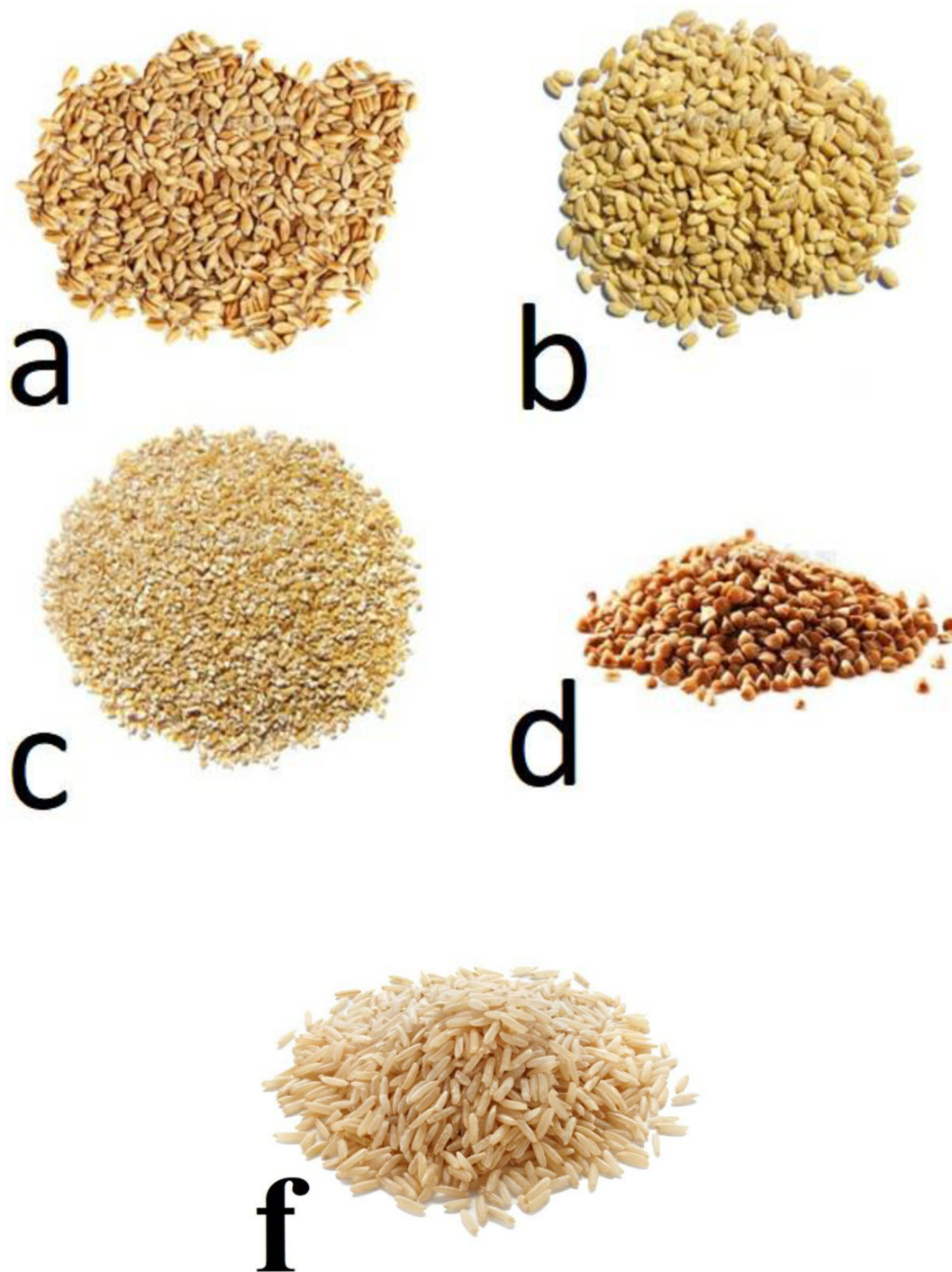
4.1.2 Magnetické nosiče

- magnetické mikročástice poly (2- hydroxyethylmethakrylát- co- glycidylmethakrylát) - P(HEMA-*co*-GMA)

Částice byly syntetizovány na ÚMCH AV ČR v Praze, Ing. D. Horákem, CSc.

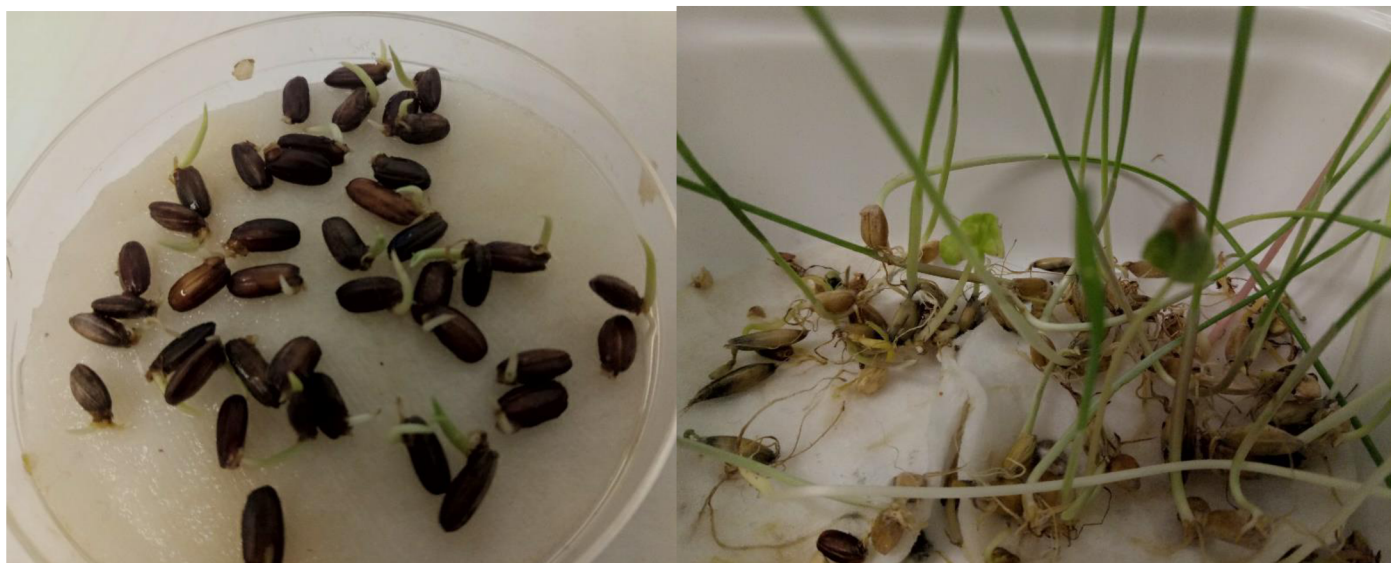
4.1.3. Použitý rostlinný materiál a výrobky

Rostlinný materiál: a) oves (*Avena sativa*), b) ječmen (*Hordeum vulgare L.*), c) pšenice (*Triticum spp.*), d) pohanka (*Paspalum dimidiatum L.*) f) Rýže (*Oryza L.*) (Obrázek 5), byl získán od sukromného farmaře na Ukrajině.



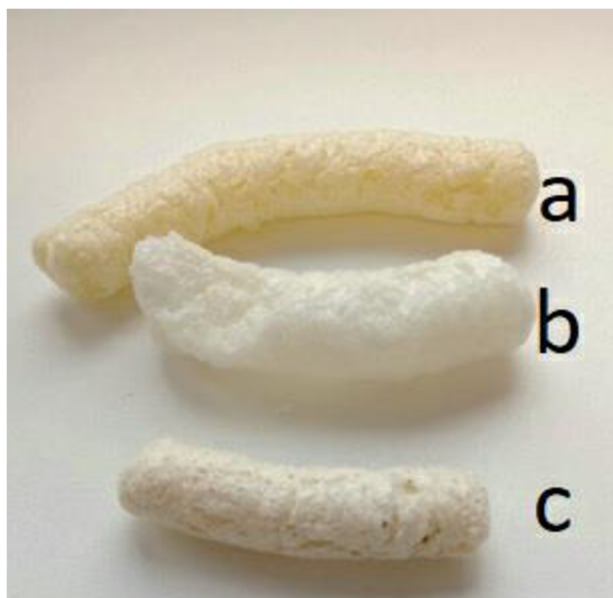
Obrázek 5: Rostlinný materiál použitý pro analýzu.

Nakličené zrna rostlin ovsa, pšenice, ječmenu, pohanky, ryže (Obrázek 6).



Obrázek 6: Nakličené rostliný ovsa, pšenice, ječmene, pohanky, rýže .

- Výrobky (8 různých) byly získány z obchodní sítě v ČR (Obrázek 3- Obrázek 6).
 - Cereální výrobky pro děti :, křupinky z cereálií (a- kukuřičné, b- rýžové, c- špaldové) (Obrázek 7).



Obrázek 7: Cereální výrobky pro děti, a) křupinky kukuřičné b) křupinky rýžové c) křupinky špaldové

Špadlové křupky: špadlová mouka 50%, kukuřičná krupice 50%.

Rýžové křupky: extrudovaná rýžová krupice.

Kukuřičné křupky: extrudovaná kukuřičná krupice.

- Hami nemléčná kaše krupicová s ovocem (Obrázek 8):



Obrázek 8: Cereální kaše Hami pro děti a tyčinka HIPP

Složení výrobku

Tyčinka HIPP: obilí 39 % (celozrnná ovesná mouka, mleté pšeničné vločky, rýžová mouka, kukuřičné lupínky), jablečný koncentrát 20 %, banánové vločky 19 %, koncentrát broskvové šťávy 8 %, rostlinný olej, jablečný prášek 5 % (sušené jablečné pyré 80 %, škrob).

Cereální kaše Hami: Pšeničná krupice (75,9 %), cukr, maltodextrin, jahodový prášek (0,4 %), banánový prášek (0,3%), broskvový prášek (0,2%) uhličitan vápenatý, směs vitamínů: (C, niacin, E, D-pantothenát vápenatý, B1, B6, A, kyselina pteroylmonoglutamová (kyselina listová), D3, biotin), difosforečnan železitý, síran zinečnatý, přírodní jahodové aroma, přírodní banánové aroma, přírodní broskvové aroma.

- Cereální sušenky (2 druhy) (Obrázek 9):
 - BeBe dobré ráno extracereální
 - BeBe rodinné cereální

Složení výrobku

BeBe dobré ráno extracereální: 1) cereálie 69,8 % [celozrnné cereálie 42,7 % (žitné vločky 17,5 %, ovesné vločky 15,3 %, celozrnná drcená pohanka 6,7 %, celozrnná mouka z pšenice špaldy 1%, celozrnná ječná mouka 1%, celozrnná pšeničná mouka 1%) pšeničná mouka 27,1%], cukr, řepkový olej, třtinový cukr, kypřicí látky, jedlá sůl, směs minerálních látek,

ječný sladový sirup, siup z invertního cukru, směs vitaminů (vitamin E, vitamin B₁), sušené odstředěné mléko, (e 500, e 503), emulgátory (sójový lecitin), aromat.

BeBe rodinné cereální: Cereálie 61,6 % (celozrnná pšeničná mouka 41,2 %, pšeničná mouka 20,4 %), cukr, rostlinný tuk a olej (palmový, řepkový), pšeničný škrob, sušené odstředěné mléko, kypřicí látky (e 500, e 503), jedlá sůl, emulgátory (e 472e, sójový lecitin), aromat.



Obrázek 9: Cereální výrobky BeBe dobré ráno extracereální a BeBe rodinné cereální

- RACIO Chlebičky (Obrázek 10):

Složení: celá pšeničná zrna 100%. Může obsahovat stopy sóji.



Obrázek 10: Cereální výrobky RACIO Chlebičky.

4.1.4 Přístroje a pomůcky

- centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, SRN)
- centrifuga MINI (Labnet, New Jersey, USA)
- NanoDrop 2 000 (Termo Scientific, Wilmington, USA)
- mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Polsko)

- mini inkubátor (Labnet, New Jersey, USA)
- thermo cykler Bio-Rad PTC 200 (Bio-Rad Lab., USA)
- thermo shaker TS-100C (Biosan, Riga, LV)
- zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet, USA)
- Thermocycler Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Austrálie)
- běžné laboratorní sklo, materiál a pomůcky
- transiluminátor TVR- 3121 (Spectroline, Albany, USA)
- zařízení pro elektroforézu (OWL Buffer Puffer, Loughborough, UK)
- magnetický separátor Invitrogen Dynal AS (DynalBiotech, Oslo, Nórsko) (kontrola)
- mikrovlnná trouba PROLINE SM1 17 (SENCOR, ČR)
- k izolaci magnetických částic byla použita magnetická jehla se souvisejícím zařízením, která byla navržena a zkonstruována ing. M. Němečkem (Fakulta Chemická, VUT Brno)

4.1.5 Roztoky pro izolaci DNA

- ethanol (70%)
Bylo smícháno 70 ml 96% ethanolu s 26 mL destilované vody.
- lyzační roztok s CTAB
1 g CTAB byl rozpuštěn v 10 mL 0,5 M Tris-HCl, 16 mL 5 M NaCl, 2 mL 0,5 M EDTA a 42 mL destilované vody.
- roztok chloridu sodného (5 M)
Navážka 87,66 g NaCl byla rozpuštěna v 300 mL destilované vody.
- roztok 40% poly(ethylenglykolu) 6 000 (PEG 6000)
Bylo naváženo 40 g PEG 6 000. Tato navážka byla rozpuštěna v 60 mL destilované vody a objem byl destilovanou vodou doplněn do 100 mL.
- směs chloroform-oktanol
Chloroform a oktanol byly smíchány v poměru 24:1.
- TE pufr
1 l 1 M Tris-HCl (pH 8,0) byl smíchán s 0,2 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0). Roztok byl doplněn do 100 mL destilovanou vodou. Výsledný roztok byl rozdělen do alikvotních podílů.

4.1.6 Komponenty pro PCR a qPCR

- DNA polymeráza o koncentraci $1 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ (TopBio, Praha, ČR)
- dNTP směs 10 mM (TopBio, Praha, ČR)
- primery 18S_for a 5,8S_rev ($10 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$) (GENERI BIOTECH, Hradec Králové, ČR)
- reakční pufr kompletní ($10\times$ koncentrovaný) (TopBio, Praha, ČR)

Složení: 750 mM Tris-HCl (pH 8,8 při $25 \text{ }^\circ\text{C}$), 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1% Tween 20, 25 mM MgCl_2 .

- voda pro PCR (voda pro injekce, Braun, Melsungen, Německo)
- qPCR $2\times$ SYTO-9 Master Mix (TopBio, Praha, ČR)

Složení: $2\times$ koncentrovaný 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C), 40 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 mM MgCl_2 , $400 \mu\text{M}$ dATP, $400 \mu\text{M}$ dCTP, $400 \mu\text{M}$ dGTP, $400 \mu\text{M}$ dTTP, Taq DNA polymeráza (50 U/ml), monoklonální protilátka anti-Taq, SYTO-9, stabilizátory a aditiva.

4.1.7 Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu

- agarózový gel ($1,2\%$)

$0,6 \text{ g}$ agarózy bylo rozpuštěno v 50 mL $0,5\times$ TBE pufru.

- DNA standard 100 bp žebříček (Malamité, Moravské Prusy, ČR)

Obsahuje fragmenty DNA délky $100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1\ 000, 1\ 200$ a $1\ 400 \text{ bp}$.

- ethidium bromid $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$

$50 \mu\text{L}$ ethidium bromidu ($10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) bylo smícháno s 1 L destilované vody.

- TBE pufr ($5\times$)

Navážka 54 g Tris-báze a $27,5 \text{ g}$ kyseliny borité byla rozpuštěna v 20 mL EDTA (pH 8,0). Roztok byl následně doplněn do 1 L destilovanou vodou. Před použitím byl pufr zředěn destilovanou vodou $10\times$.

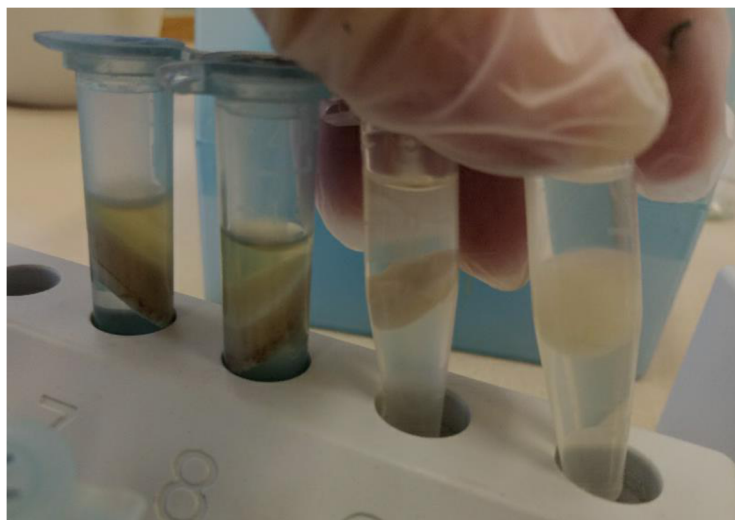
- PCR vkladací pufr Yellow load (TopBio, Praha, ČR)

4. 2. Metody

4.2.1. Příprava homogenátu buněk

Jako vzorky rostlinného materiálu pro přípravu homogenátu byly použité cereálie (pohanka, ječmen, oves a pšenice), banán a jablko. Jako výrobky použité pro přípravu homogenátu byly tyčinka HIPP a křupinky (špaldové, rýžové, kukuřičné).

Přibližně 0,3 g vzorků (vážené na převážkách) bylo přeneseno do 1,5 mL Eppendorfovy zkumavky a bylo přidáno 500 μ L lyzačního činidla s CTAB a 1 μ L merkptoetanolu. Směs byla mechanicky homogenizována kopistem za snížené teploty ve vymražených termoblocích. Takto upravené vzorky byly inkubovány v termostatu při teplotě 60 °C po dobu 30 minut. Po ukončení inkubace bylo přidáno 500 μ L směsi chloroform-oktanol, směs promíchána (asi 2-5 min.) a centrifugována při 14500 ot/10 minut. Supernatant byl odpipetován do čistých Eppendorfových zkumavek pro další izolaci DNA magnetickými částicemi. Obrázku 11 je uvedeno rozdělení fází po centrifugaci.



Obrázek 11: Rozdělení fází po centrifugaci homogenátů v CTAB s přidavkem chloroform-oktanolu.

4.2.2. Izolace DNA pomoci magnetických nosičů v magnetickém separátoru

Pro izolaci DNA z homogenátů byly použité magnetické částice o koncentraci 2 mg mL⁻¹. Separační směs byla připravená do čistých Eppendorfových zkumavek. Složení separační směsi je uvedeno v Tabulce2.

Tabulka 2 Složení separační směsi pro izolaci rostlinné DNA z homogenátů v magnetickém separátoru

Složka separační směsí	Objem [μL]
NaCl (5 M)	200
Homogenát	50
40 % PEG 6000	200
Magnetické částice (2 mg/mL^{-1})	50

Takto připravenou směs byla řádně promíchána a inkubována při laboratorní teplotě po dobu 15 minut. Zkumavky se směsí byly následně umístěny do magnetického separátoru. Po 15 minutách v přítomnosti magnetického pásu byl supernatant opatrně odpipetován ze zkumavek tak, aby do pipety nebyly nabrány magnetické částice, které zůstaly na stěně zkumavky.

Zkumavky byly vyjmuty ze separátoru a částice promyty přidáním $500 \mu\text{L}$ 70 % ethanolu a zkumavky byly zpátky umístěny do magnetického separátoru na dobu 2 min. Po uplynutí této doby byl ethanol znovu opatrně odpipetován a postup promyti ethanolom byl zopakován ještě jednou. Po odpipetování ethanolu byly zkumavky nechány dosušit. DNA navázanou na magnetických částicích byla eluována do $100 \mu\text{L}$ TE pufru po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Pomocí magnetického separátoru byly ze směsi odseparovány magnetické částice (po dobu 2 minuty) a eluát s DNA byl převeden do čisté Eppendorfovy zkumavky.

4.2.3. Izolace DNA pomocí magnetických nosičů magnetickou jehlou.

Pro izolaci DNA z homogenátů byly použity magnetické částice o koncentraci 2 mg mL^{-1} . Separační směs byla připravena do čistých Eppendorfových zkumavek. Složení separační směsi je uvedeno v Tabulce 3.

Tabulka 3 Složení separační směsí pro izolaci rostlinné DNA z homogenátů magnetickou jehlou

Složka separační směsí	Objem [μL]
NaCl (5 M)	100
Homogenát	25
40 % PEG 6000	100
Magnetické částice (2 mg mL^{-1})	25

4.2.4. Srážení DNA isopropanolem

Při homogenizaci v pufru s CTAB a přidavku chloroform-oktanolu pro zvýšení čistoty izolované DNA byl přidán krok jejího přesrážení isopropanolem. Po odpipetování supernatantu do čistých Eppendorfových zkumavek bylo přidáno 0,6 objemu isopropanolu a zkumavky byly nechány stát při laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Poté byly zkumavky otočeny, směs byla centrifugována při 13000 ot/5 min. DNA precipitovala na dně zkumavky. Po přečistění byl přidán 1 mL 70% ethanolu, směs byla nechána stát 2 minuty, poté byla směs centrifugována při 13000 ot./5 min. Potom byl supernatant odstraněn a sediment DNA osušen. DNA byla rozpuštěna ve 100 μL TE pufru a použita pro další postup izolace DNA magnetickými částicemi.

Uvedeným postupem byli připravené homogenáty z jablka, banánu a cerealií (pohanka, oves, pšenice, ječmen).

4.2.5. Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA

Čistota a koncentrace izolované DNA byla stanovena na přístroji NanoDrop 2000. Před samotným stanovením byla vyčištěna čočka přístroje, vzorky byly řádně promíchány a jako blank byl použit TE pufr. Absorbance a následné další parametry, byly stanovené spektrofotometricky v rozmezí vlnových délek 230-320 nm. Byly odčteny hodnoty $A_{260\text{nm}}$, $A_{280\text{nm}}$, $A_{230\text{nm}}$ a pomocí hodnot poměrů absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ a $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ stanovena čistota izolované DNA.

4.2.6. Ověření kvality izolované DNA amplifikací pomocí PCR

Jednotlivé vzorky izolované DNA a jejich ředění byly použity jako templát v polymerázové řetězové reakci. Složky směsi pro PCR byly namíchány podle Tabulky 4 a Tabulky 5. Jako pozitivní kontrola byla použita rostlinná DNA izolovaná z *Nicotiana tabacum* o koncentraci 10 ng μL^{-1} .

Tabulka 4 Složení směsi pro PCR pro amplifikaci produktu o velikosti 700pb

	Složka směsi pro PCR	Objem [μL]
1	Voda pro PCR	16,5
2	Pufr pro PCR 10x koncentrovaný 1,5 μM	2,5
3	Primer F 18 S (10 pmol μL^{-1})	1,0
4	Primer R 5,8 S (10 pmol μL^{-1})	1,0
5	Směs dNTP (10 mM)	1,0
6	<i>Taq</i> DNA polymeráza 1.1	1,0
7	DNA matrice	2,0
	Celkem	25,0

Tabulka 5 Složení směsi pro PCR pro amplifikaci produktu o velikosti 220 pb

	Složka směsi pro PCR	Objem [μL]
1	Voda pro PCR	18,25
2	Pufr pro PCR kompletní 10x koncentrovaný 1,5 μM	2,5
3	DMSO	0,5
4	Primer F 26 sf (10 pmol μL^{-1})	0,5
5	Primer R 26 sr (10 pmol μL^{-1})	0,5
6	Směs dNTP (10 mM)	0,5
7	<i>La</i> DNA polymeráza (5 u μL^{-1})	0,25
8	DNA matrice	2,0
	Celkem	25,0

Připravené směsi pro PCR byy dobře promíchány a umístěny do cykleru; PCR přebíhala v 35 cyklech a v třech fázích:

1. Denaturace (95 °C / 40 s, 95 °C / 30 s)
2. Hybridizace primerů (57 °C / 40 s, 52 °C / 30 s)
3. Elongace – syntéza DNA (72 °C / 80 s, 72 °C / 40 s)

Před prvním cyklem byla prodloužena fáze denaturace o 5 minut při 95 °C; na závěr po ukončení 35 cyklu byla syntéza při 72 °C prodloužena o 10 minut. Následně byly vzorky

ochlazeny a udržovány při teplotě 10°C, v případě potřeby zmrazené a uchovávané při teplotě -20 °C pro další analýzu.

Byl použity páry primerů (Tabulka 6) :

Tabulka 6: Primery pro amplifikaci rostlinné DNA [37,38]

Primer	Sekvence primeru	Produkt PCR (bp)
18S for	5'-GCG CTA CAC TGA TGT ATT CAA CGA G-3'	700 ^a
5,8S rev	5'-CGC AAC TTG CGT TCA AAG ACT CGA-3'	
26S for	5'- GAA TTC ACC CAA GTG TTG GGA T-3'	220 ^b
26S rev	5'- AGA GGC GTT CAG TCA TAA TC-3'	

4.2.7. Detekci specifických produktů PCR agarózovou gelovou elektroforézou

Produkty PCR detegovány pomocí elektroforézy na 1,2 % agarózovém gelu (pro specifické PCR produkty). V 100 mL 0,5 % TBE pufru bylo rozvařeno 1,2 g agarózy a po ochlazení bylo přidáno 0,5 µL barviva Goldview. Gel byl nalit do připravené vaničky s hřebínkem a nechán ztuhnout. Množství připraveného gelu záviselo od velikosti vaničky: pro větší vaničky bylo zapotřebí 100 mL gelu; pro menší 70 mL, případně 50 mL, čemuž se přizpůsobila i navážka agarózy.

Po ztuhnutí byl odstraněn hřebínek a na gel byly do jednotlivých jamek nanášeny produkty PCR, které byly předtím smíchané s 5 µL nanášecího pufru (v poměru 5:1), pozitivní a negativní kontrola, připravené stejným způsobem a standard molekulových hmotností (5 µL), který už byl smíchan s nanášecím pufrům. Samotná elektroforéza probíhala při napětí 80 V po dobu 1,5-2 hod, v závislosti od velikosti a hustoty gelu. Po proběhnutí elektroforézy byl gel dobarven v roztoku etidiumu bromidu (0,5 µg mL⁻¹), vyhodnocen pod UV světlem a fotograficky dokumentován.

4.2.8. Ověření kvality izolované DNA amplifikací pomocí qPCR

Jednotlivé vzorky izolované DNA a jejich ředění byly použity jako templát v polymerázové řetězové reakci v reálném čase. Směs pro qPCR o celkovém objemu 25 μl skládá se ze komponentů, které jsou uvedeny v Tabulce 7.

Tabulka 7 Složení směsi pro qPCR pro amplifikaci produktu o velikosti 700 pb

	Složka směsi pro PCR	Objem [μL]
1	Voda pro PCR	9,5
2	qPCR 2 \times SYTO-9 Master Mix (Top-Bio)	12,5
3	Primer 1 (10 pmol/ μl)	1,0
4	Primer 2 (10 pmol/ μl)	1,0
5	Matrice DNA (10 ng/ μl)	1,0

Následně byla desítkovým ředěním připravena kalibrační křivka z kultury *N. Tabacum* v rozsahu 100–0,001 ng/ μl (desítkové ředění).

Připravené směsi pro qPCR byly dobře promíchány a umístěny do cykleru; qPCR přebíhala v 35 cyklech a v třech fázích:

1. Denaturace (95 °C / 30 s)
2. Hybridizace primerů (52 °C / 30 s)
3. Elongace – syntéza DNA (72 °C / 40 s)

Před prvním cyklem byla prodloužena fáze denaturace o 10 minut při 95 °C; na závěr po ukončení 35 cyklu byla syntéza při 72 °C prodloužena o 5 minut.

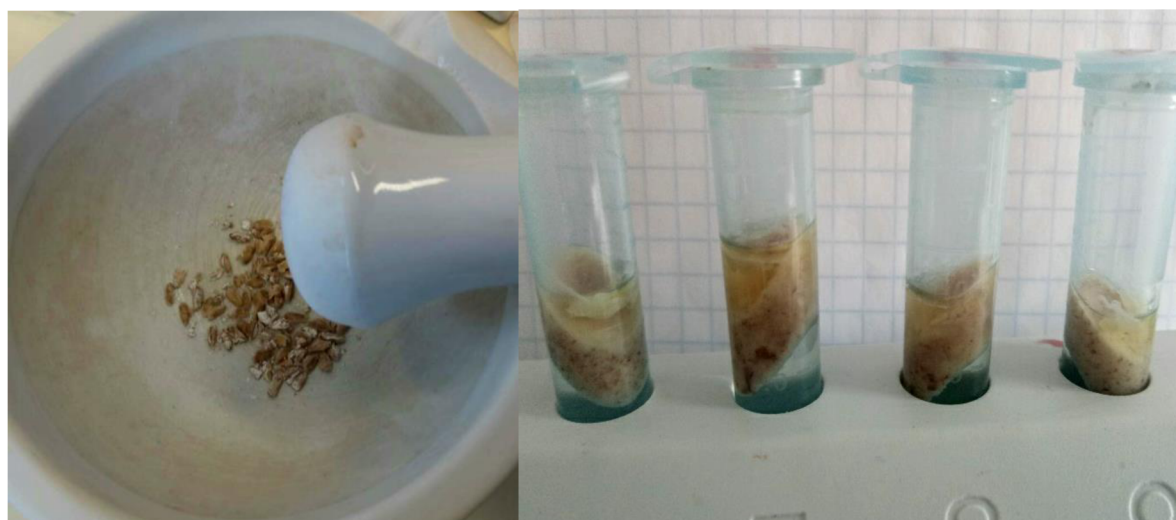
Statistické vyhodnocení výsledků qPCR bylo provedeno pomocí softwaru cykleru Rotor-gene 6000 (verze 1. 7. 87). Pro kvantifikaci byla použita metoda absolutní kvantifikace. Reakční účinnost byla vypočtena ze sklonu amplifikačních křivek (M). Spolehlivost metody byla odhadnuta z korelačního koeficientu lineární regrese (R^2).

5 Výsledky

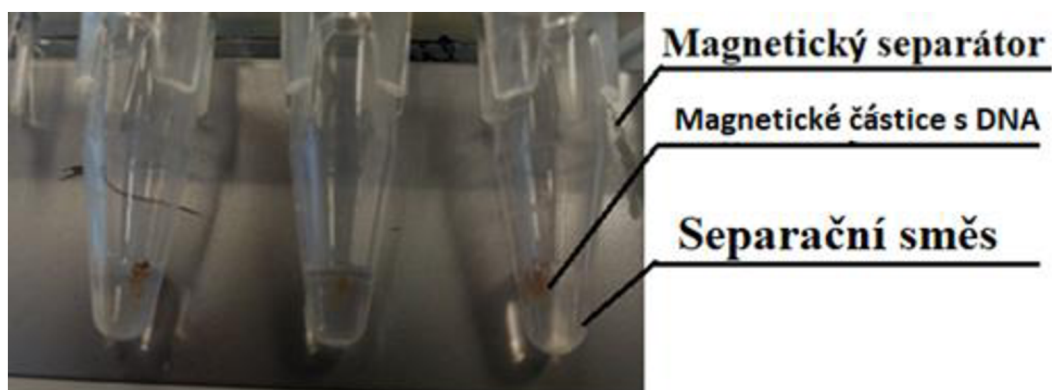
5.1 Testování metody mikroizolací DNA z různých dryhy zrna cerealií

5.1.1 Homogenizace a izolace DNA

Postupem uvedeným v kapitole .. byly připraveny homogenáty z různých rostlinných matric (oves, ječmen, pšenice, pohanka). Přibližně 0,3 g rostlinného materiálu se homogenizovalo za chladu s 500 μ l lysačního roztoku s CTAB. Příprava homogenátů je uvedena na obrázku 12. K izolaci DNA magnetickými částicemi bylo použito 50 μ L homogenátu.. Vybrané kroky izolace DNA magnetickými částicemi ze separační směsi jsou uvedeny na Obrázku 13.



Obrázek 12 Příprava homogenátů z různých rostlinných matric

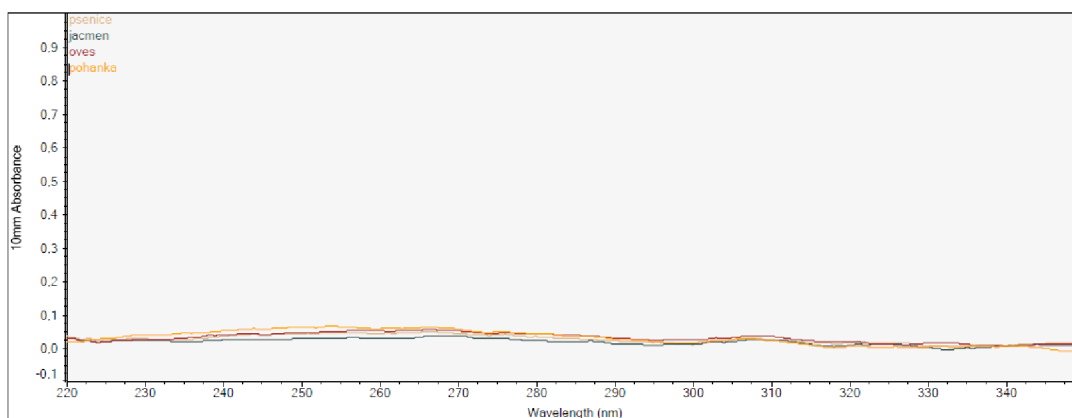


Obrázek 13 Izolace DNA magnetickými částicemi ze separační směsi

5.1.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

Koncentrace DNA byla stanovená spektrofotometricky měřením absorpčního spektra v rozmezí vlnových délek 220–340 nm, uvedeným v kapitole 4.2.5.

Výsledky spektrofotometrického stanovení koncentrace a čistoty DNA jsou uvedené v Tabulce 8. Absorpční spektrum DNA je ukázáno na Obrázku 14.



Obrázek 14 Absorpční spektrum DNA z zrna cereálií

Tabulka 8 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolovaná z cereálií (0,3 g). DNA byla přečištěna přesražením isopropanolem, částice separovány magnetickým separátorem.

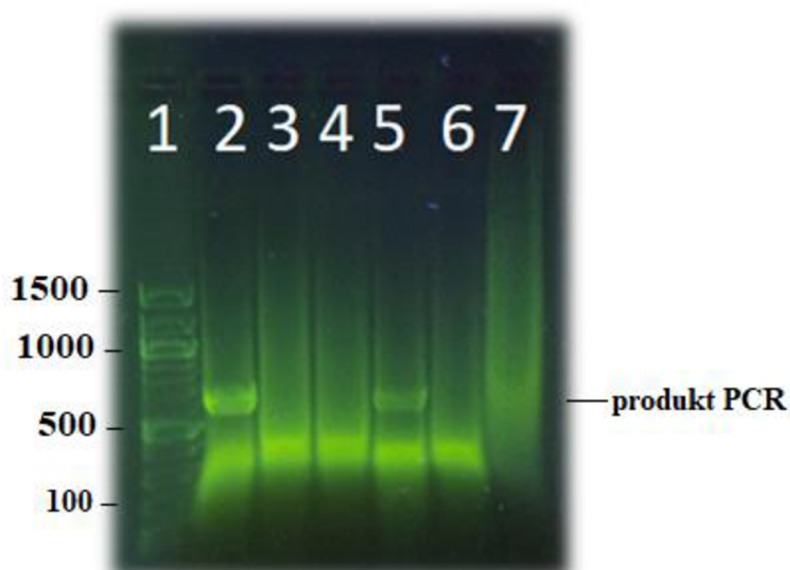
Běh	DNA – zrní (0,3 g)	Koncentrace DNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$)	$A_{260\text{nm}}$	$A_{280\text{nm}}$	$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$	$A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$
1	Pohanka	2,6	0,051	0,038	1,37	1,51
2	Oves	2,3	0,045	0,035	1,29	2,34
3	Ječmen	1,1	0,022	0,016	1,37	1,43
4	Pšenice	1,9	0,037	0,028	1,34	1,68

DNA byla izolována v koncentraci 1,1 – 2,6 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$. DNA byla znečištěna (A_{260}/A_{280} 1,29–1,37).

5.1.3 Amplifikovatelnost DNA izolované ze zrna cerealií

DNA přesrážená isopropanolem byla použita jako templát do směsi pro PCR podle postupu uvedeného v kapitole 4.2.6., Byly použity primery pro amplifikaci úseku o velikosti 700 bp. Výsledky detekce specifických produktů PCR jsou na Obrázku 15.

Běh	DNA zrno (0,3 g)	DNA ve směsi pro PCR(ng)	Detekce produktů PCR
1	DNA standard		+
2	Pozitivní kontrola (DNA z <i>N.tabacum</i>)		++
3	Negativní kontrola (bez DNA)		-
4	Ječmen	2,2	-
5	Pšenice	3,8	+
6	Pohanka	5,2	-
7	Oves	4,6	-



Obrázek 15 Agarózová gelová elektroforéza specifických produktů PCR (700 bp).
Pozn.: +, ++, +++ produkt PCR detegován v různé intenzitě, – produkt PCR nedetegován

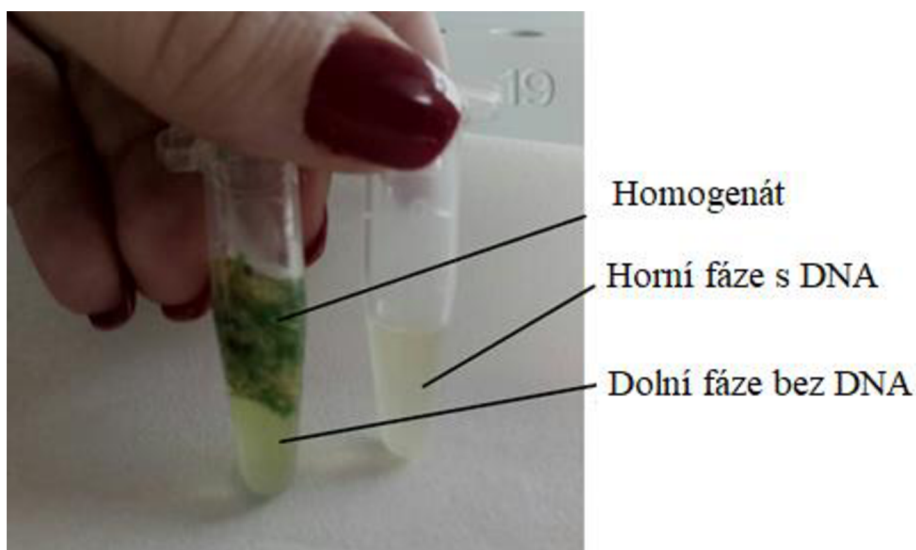
Po amplifikaci DNA byly detegovány produkty PCR u pozitivní kontroly a pšenice. To svědčí o znečištění DNA inhibitory PCR v ostatních vzorcích.

5.2 Testování metody mikroizolace DNA z různých druhů naklíčených cereálií

Zrno ovesa, pšenice, ječmene, rýže a pohanky byly naklíčené. Pro izolaci DNA byly použity zelení klíčky.

5.2.1 Homogenizace klíčků a izolace DNA

Uvedeným postupem (4.2.1 a 4.2.2) byly připravené homogenáty z klíčků různých naklíčených rostlinných matic (oves, ječmen, pšenice, pohanka, rýže). Příprava homogenátů je uvedena na Obrázku 16 po přidavku chloroform-oktanolu a přesražení isopropanolem. Pro izolaci DNA magnetickými částicemi bylo použito 50 μ L homogenátu.



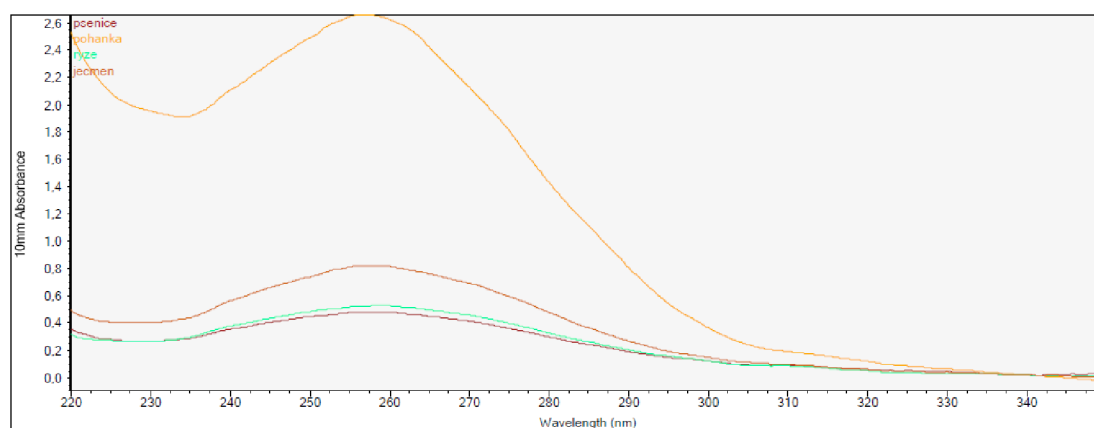
Obrázek 16 Po centrifugaci během přípravy homogenátu z naklíčených zrn.

5.2.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

Koncentrace DNA byla stanovena spektrofotometricky postupem, měřením absorpčního spektra v rozmezí vlnových délek 220–340 nm. Výsledky spektrofotometrického stanovení koncentrace a čistoty DNA jsou uvedené v Tabulce 9. Absorpční spektrum DNA je ukázáno na Obrázku 17.

Tabulka 9 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolovaná z naklíčených cereálií, částice separovány magnetickým separátorem.

Běh	DNA – klíčky (0,3 g)	DNA (ng μL^{-1})	$A_{260\text{nm}}$	$A_{280\text{nm}}$	$A_{260\text{nm}}/$ $A_{280\text{nm}}$	$A_{260\text{nm}}/$ $A_{230\text{nm}}$
1	Ječmen	39,8	0,797	0,462	1,73	2,08
2	Rýže	25,4	0,509	0,309	1,65	2,04
3	Pohanka	130,7	2,613	1,422	1,84	1,35
4	Pšenice	23,1	0,462	0,280	1,65	1,85



Obrázek 17 Absorpční spektrum DNA z naklíčených cereálií (popsat křivky)

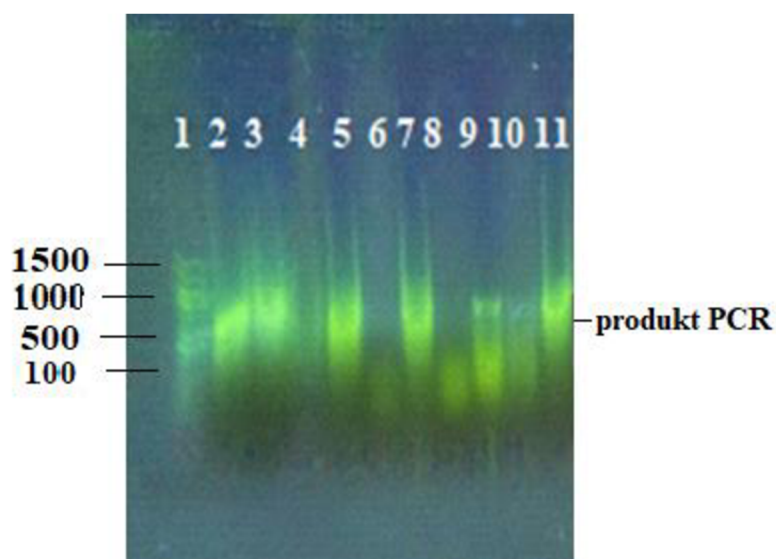
DNA byla izolována v koncentraci 23,1-39,8 ng μL^{-1} z výjimkou pohanky, kde byla koncentrace 130,7 ng μL^{-1} . DNA byla znečištěna (A_{260}/A_{280} 1,65–1,84).

5.2.3 Amplifikovatelnost DNA izolované z naklíčených cereálií

Izolovaná DNA byla použita jako matrice ve směsi pro PCR podle postupu uvedeného v kapitole 4.2.6. s použitím primerů 18S_for a 5,8S_rev. Byl amplifikován produkt o velikosti 700 bp. Výsledky detekce specifických produktů PCR jsou uvedeny na Obrázku 18.

Obrázek 18 Agarózová gelová elektroforéza specifických produktů PCR (700 bp)

Běh	DNA	Množství DNA ve směsi pro PCR (ng)	Detekce produktů PCR
1	DNA standard		-
2	Pozitivní kontrola, (DNA z <i>N. tabacum</i>)	2	+
3	Negativní kontrola, (bez DNA)	0	-
4	Rýže naklíčená	50,8	-
5	ředění 10x		-
6	Pohanka naklíčená	261,4	-
7	ředění 10x		-
8	Ječmen naklíčený	79,6	-
9	ředění 10x		-
10	Pšenice naklíčená	46,1	+
11	ředění 10x		+



Pozn.: +, ++, +++ produkt PCR detegován v různé intenzitě, – produkt PCR nedetegován

Po amplifikácii DNA izolovaných z homogenátů byly detegovány produkty PCR jenom u pozitivní kontroly a z pšenice. To svědčí o přítomnosti inhibitorů PCR v DNA u ostatních vzorků, které zůstávají na stěně zkumavky a dostávají do TE pufru během eluce DNA z částic separovaných pomocí magnetického separátoru.

5.3 Testování metody mikroizolace DNA pomocí magnetické jehly

Magnetická jehla umožňuje vychytání magnetických částic s navazanou DNA a jejich přenesení do čisté eppendorfky.

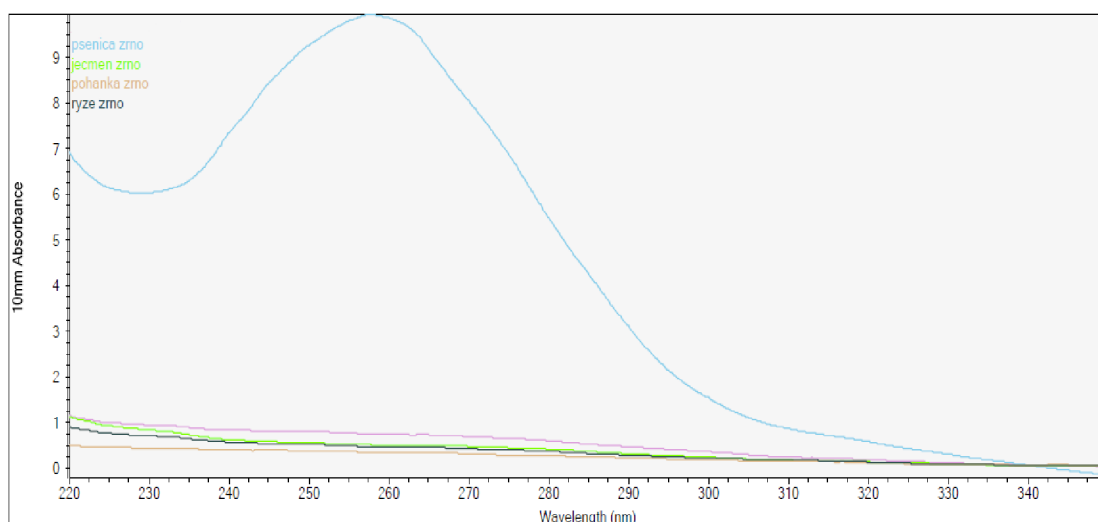
5.3.1 Homogenizace vzorků a izolace DNA

Postupem uvedený v kapitole 4.2.1., 4.2.3. a 4.2.4 byly připraveny homogenáty z naklíčených rostlinných matric a ze zrn cereálií (oves, ječmen, pšenice, pohanka, ryže). Pro izolaci DNA magnetickými částicemi bylo použité 25 μ L homogenátu.

5.3.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA izolované pomocí magnetické jehly

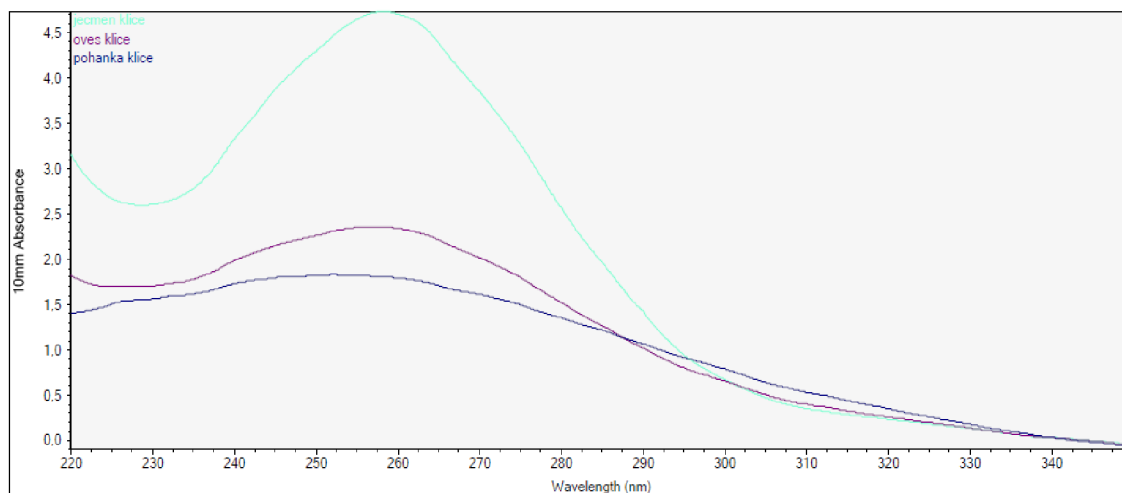
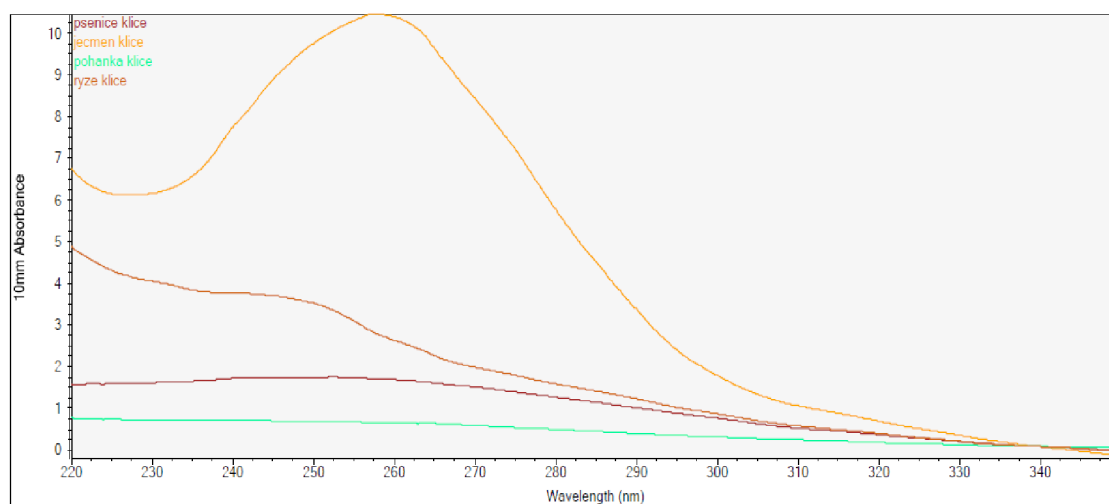
Koncentrace DNA byla stanovena spektrofotometricky změřením absorpčního spektra v rozmezí vlnových délek 220–340 nm. Výsledky spektrofotometrického stanovení koncentrace a čistoty DNA jsou uvedené v Tabulce 10 a Tabulce 11. Absorpční spektrum DNA je ukázáno na Obrázku 19 a Obrázku 20.

Obrázek 19 Absorpční spektrum DNA izolované ze zrna cereálií pomocí magnetické jehly



Tabulka 10 Spektrofotometrického stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované ze zrn cereálií

B ěh	DNA –zrní (0,3 g)	Koncentrace DNA (ng μL^{-1})	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{260nm} /A _{280nm}	A _{260nm} /A _{230nm}
1	Ječmen	21,9	0,437	0,347	1,26	0,57
2	Rýže	19,9	0,396	0,300	1,32	0,62
3	Pohanka	13,9	0,278	0,204	1,36	0,74
4	Pšenice	490,4	9,809	5,448	1,8	1,64



Obrázek 20 Absorpční spektrum DNA izolované z naklíčených cereálií pomocí magnetické jehly

Tabulka 11 Spektrofotometrického stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z naklíčených cereálií pomocí magnetické jehly

Běh	DNA – kličky (0,3 g)-	Koncentrace DNA (ng μL^{-1})	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{260nm} / A _{280nm}	A _{260nm} / A _{230nm}
1	Ječmen	234,1	4,682	2,552	1,83	1,82
2	Rýže	128,2	2,563	1,512	1,69	0,64
3	Pšenice	80,6	1,612	1,192	1,35	1,05
4	Pohanka	88,1	1,763	1,323	1,33	1,15
5	Oves	115,1	2,313	1,495	1,55	1,38

Ze zrn byla magnetickou jehlou izolována DNA o nízké koncentraci (13,9-21,9 ng μL^{-1}) s výjimkou pšenice (490 ng μL^{-1}).

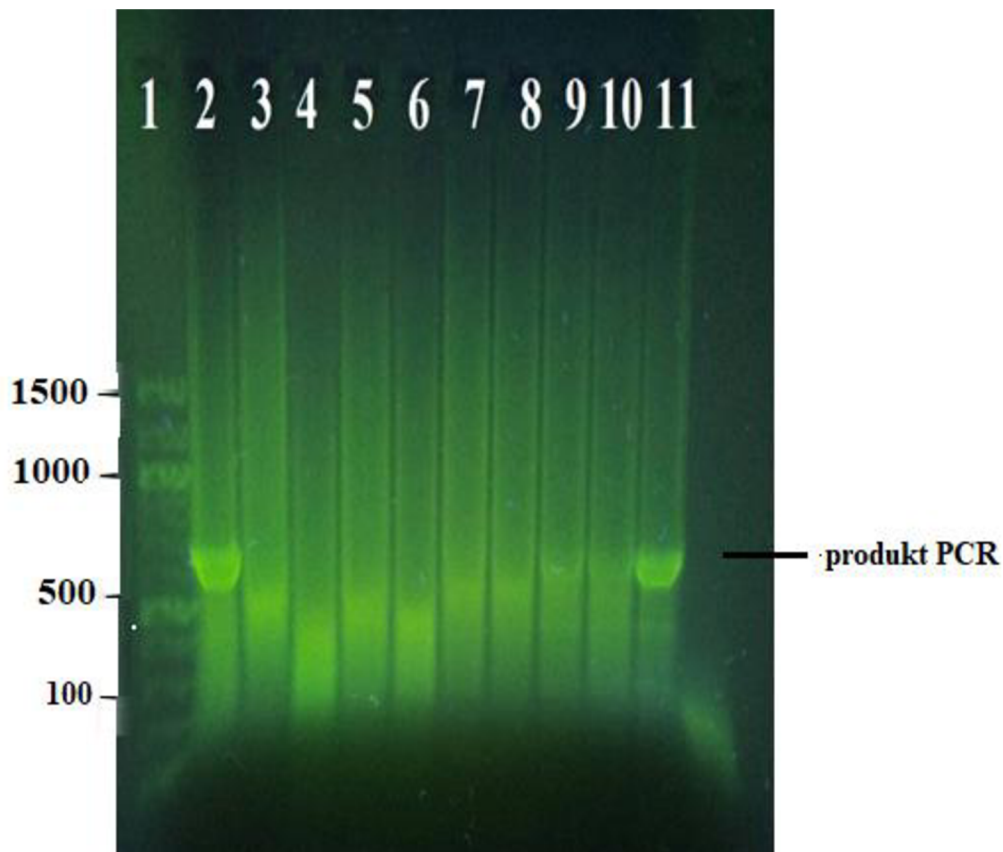
Z kličků bylo izolována DNA ve vyšší koncentraci 80,6 až 517,5 ng μL^{-1} s výjimkou pohanky (28,3 ng μL^{-1}).

5.3.3 Amplifikovatelnost DNA izolované z zrn cereálií pomocí magnetické jehly

Z DNA byla připravena směs pro PCR podle postupu uvedeného, s použitím primerů pro amplifikaci úseku o velikosti 700 bp. Výsledky detekce specifických produktů PCR jsou zobrazeny na Obrázku 21.

Obrázek 21 Agarózová gelová elektroforéza specifických produktů PCR (700 bp) – DNA izolovaná pomocí magnetické jehly

Běh	DNA	Množství DNA ve směs pro i PCR (ng)	Detekce produktů PCR
1	DNA standard		+
2	Pozitivní kontrola (DNA z <i>N. tabacum</i>)	2	++
3	Negativní kontrola (bez DNA)	0	-
4	Rýže	39,8	-
5	ředění 10x	3,98	-
6	Pohanka	27,8	-
7	ředění 10x	2,78	-
8	Oves		-
9	ředění 10x		+
10	Ječmen	43,8	+
11	ředění 10x	4,38	++



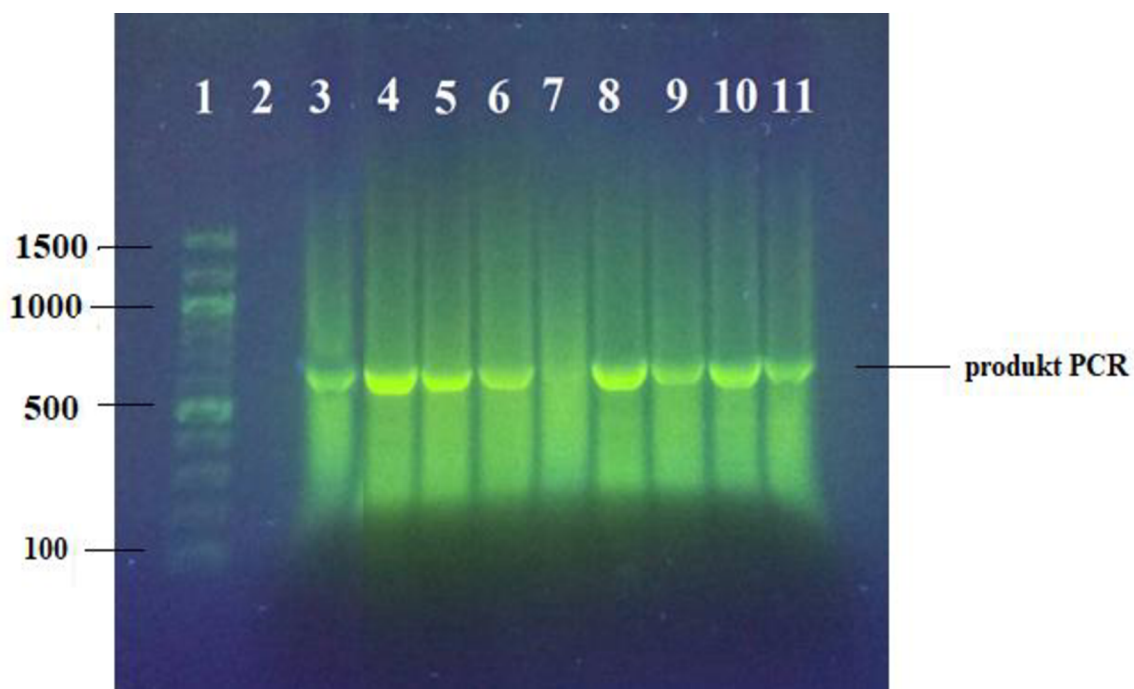
Pozn.: +, ++, +++ produkt PCR detegován v různé intenzitě, – produkt PCR nedetegován

5.3.4 Amplifikovatelnost DNA izolované z naklíčených cerealií pomocí magnetické jehly

Z DNA byla připravena směs pro PCR podle postupu uvedeného v kapitole 4.2.5. s použitím primerů pro amplifikaci úseku o velikosti 700 bp. Výsledky detekce specifických produktů PCR jsou uvedeny na Obrázku 22.

Obrázek 22 Agarózová gelová elektroforéza specifických produktů PCR (700 bp) - DNA izolovaná pomocí magnetické jehly

Běh	DNA	Množství DNA na PCR směs	Detekce produktů PCR
1	DNA standard		+
2	Negativní kontrola (bez DNA)	0	-
3	Pozitivní kontrola (DNA z <i>N. tabacum</i>)	2	+
4	Ječmen (ředění 10x)	103,4	+++
5	ředění 100x		++
6	Oves 10x	23,4	++
7	ředění 100x		+
8	Pšenice 10x	16,12	+++
9	ředění 100x		++
10	Ječmen 10x	46,8	+++
11	ředění 100x		+

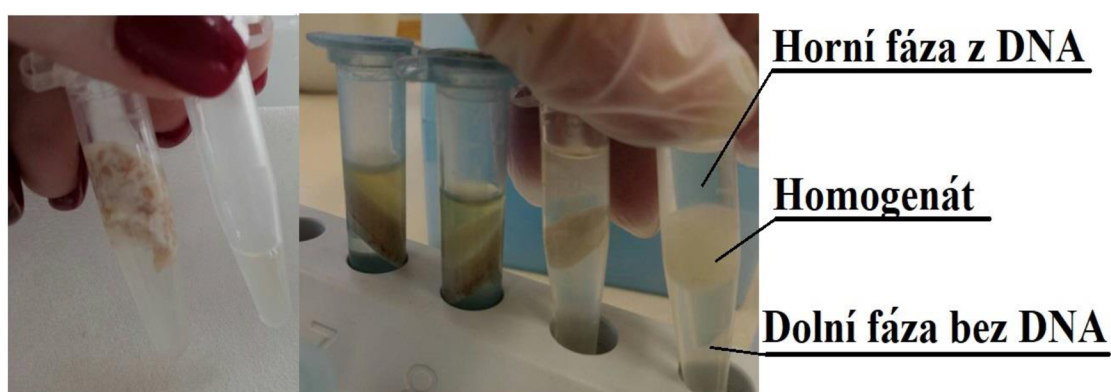


Pozn.: +, ++, +++ produkt PCR detegován v různé intenzitě, – produkt PCR nedetegován

5.4 Testování metody mikroizolace DNA z cereálních výrobků

5.4.1 Homogenizace a izolace DNA z cereálních výrobků

Uvedeným postupem v kapitole 4.2.1. 4.2.4. Bylo použito 50 μL homogenátu pro izolaci DNA magnetickými částicemi postupem uvedeným v kapitole 4.2.2 a 4.2.3 (Obrázek 23).



Obrázek 23 Homogenizace a izolace DNA z cereálních výrobků

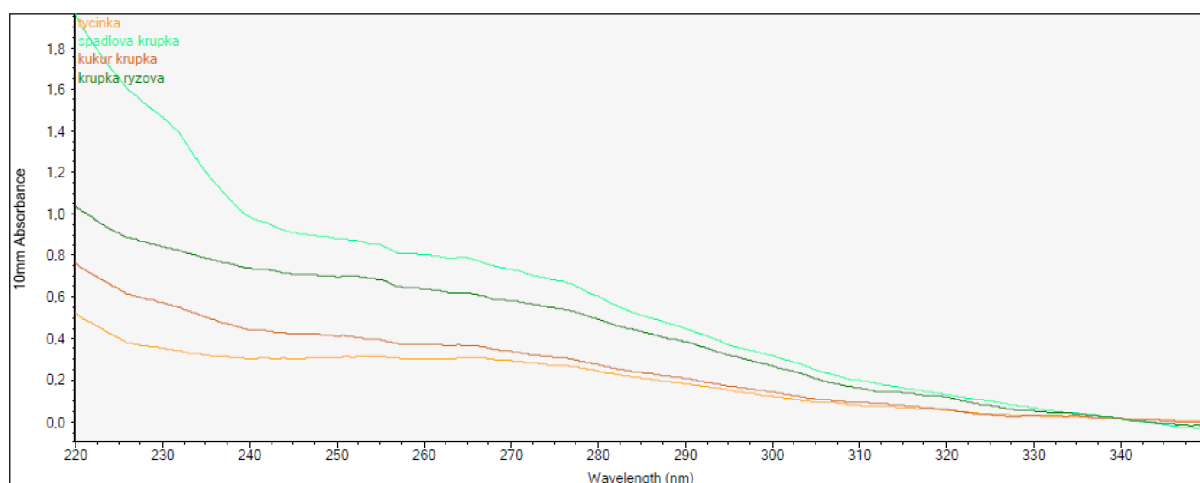
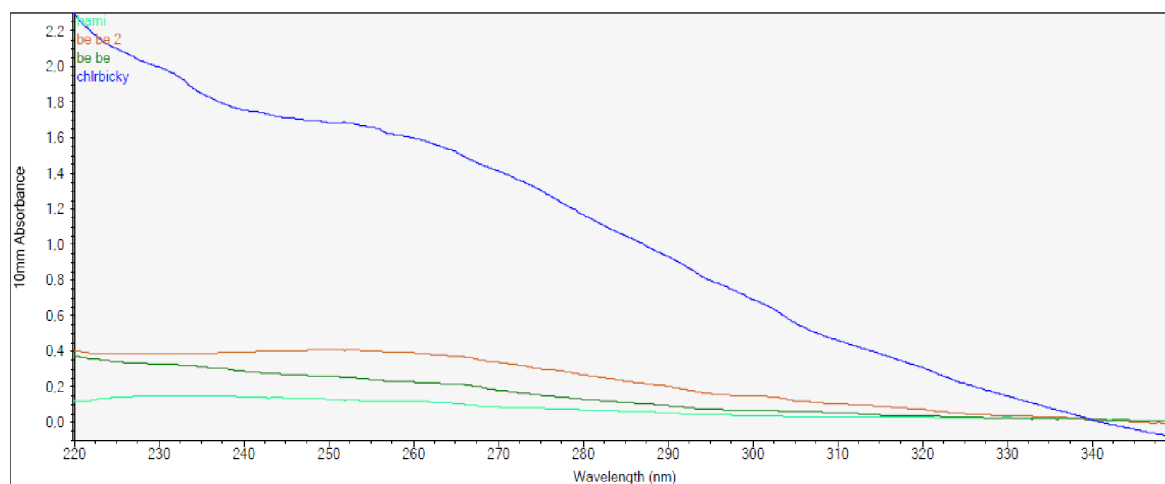
5.4.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA izolované z cereálních výrobků

Po izolaci byla stanovena koncentrace DNA spektrofotometrickým měřením absorpčního spektra v rozmezí vlnových délek 220–340 nm. Výsledky spektrofotometrického stanovení koncentrace a čistoty DNA jsou uvedeny v Tabulce 12. Absorpční spektrum DNA je ukázáno na Obrázku 24.

Tabulka 12 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z cereálních výrobků magnetickým separátorem (MS)

Běh	DNA – výrobku (0,3 g)	Koncentrace DNA (ng μL^{-1})	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{260nm} /A _{280nm}	A _{260nm} /A _{230nm}
1	Chlebičky pšeniční	79,4	1,588	1,156	1,34	0,80
2	BeBe rodinné cereální	10,6	0,212	0,115	1,85	0,67
3	BeBe dobré ráno extracereální	18,7	0,375	0,253	1,48	1,01
4	Hami kaše	5,2	0,103	0,055	1,89	0,77
5	Křupinka ryžová	31,3	0,626	0,480	1,30	0,75
6	Křupinka kukuřičná	17,9	0,359	0,260	1,38	0,64
7	Křupinka špaldová	39,6	0,791	0,590	1,34	0,54
8	Tyčinka HIPP	14,5	0,290	0,230	1,26	0,86

Obrázek 24 Absorpční spektrum DNA izolované z cereálních výrobků pomocí magnetického separátoru

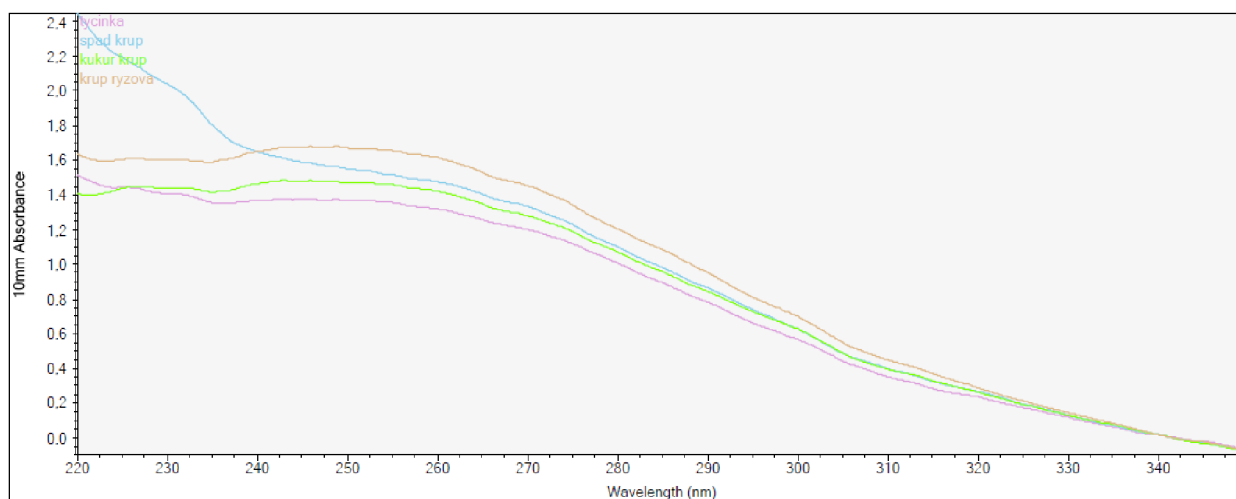
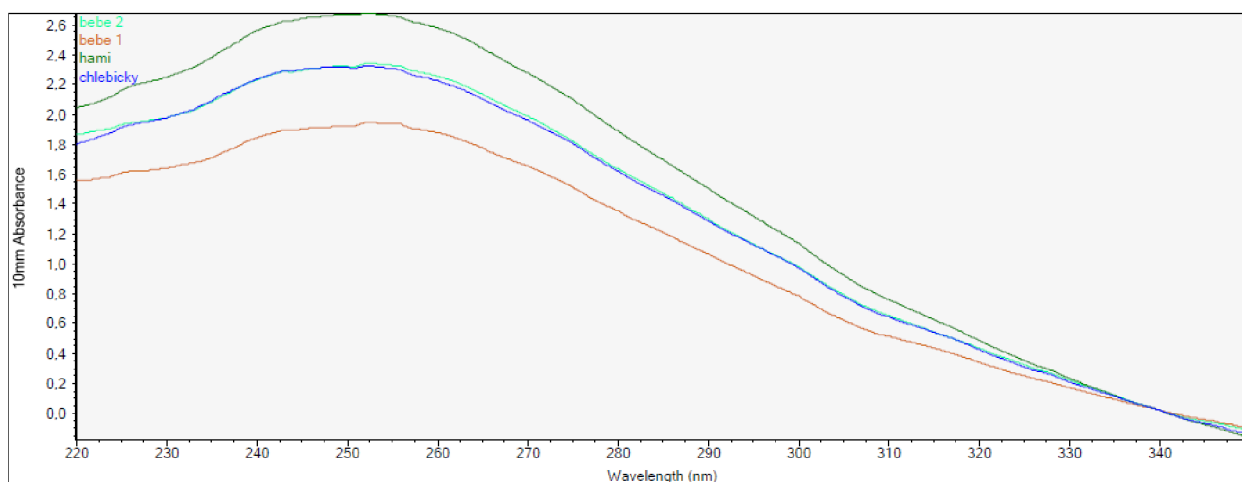


Koncentrace DNA byla stanovena spektrofotometricky měřením absorpčního spektra v rozmezí vlnových délek 220–340 nm. Výsledky spektrofotometrického stanovení koncentrace a čistoty DNA jsou uvedeny v Tabulce 13. Absorpční spektrum DNA je ukázáno na Obrázku 25.

Tabulka 13 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z cereálních výrobků magnetickou jehlou (MJ)

Běh	DNA – výrobku (0,3 g)	Koncentrace DNA (ng μL^{-1})	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{260nm} / A _{280nm}	A _{260nm} / A _{230nm}
1	Chlebičky pšeniční	110,5	2,210	1,606	1,38	1,13
2	BeBe rodinné cereální	93,2	1,865	1,339	1,79	1,15
3	BeBe dobré ráno extracereální	112,2	2,244	1,623	1,38	1,14
4	Hami kaše	128,4	2,569	1,878	1,87	1,15
5	Křupinka ryžová	80,1	1,602	1,192	1,34	1,01
6	Křupinka kukuřičná	70,4	1,407	1,057	1,33	0,99
7	Křupinka špaldová	73,1	1,462	1,088	1,34	0,72
8	Tyčinka HIPP	65,2	1,304	0,994	1,31	0,94

Obrázek 25 Absorpční spektrum DNA izolované z cereálních výrobků pomocí magnetické jehly



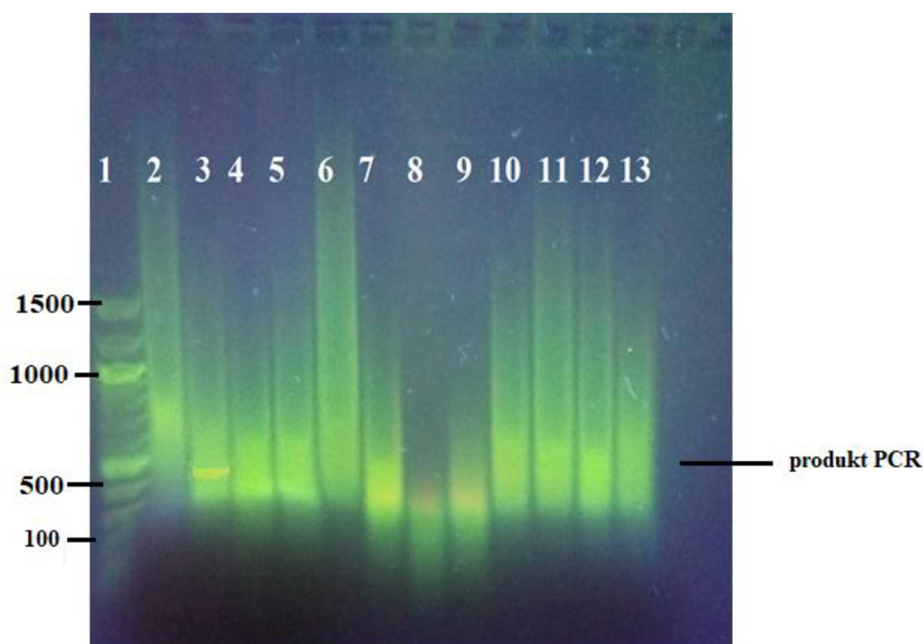
5.4.3 Amplifikovatelnost izolované DNA z cereálních výrobků 700 bp

Z DNA byla připravena směs pro PCR podle postupu uvedeného v kapitole 4.2.6. s použitím primerů pro amplifikaci úseku o velikosti 700 bp. Výsledky detekce specifických produktů PCR jsou uvedeny na Obrázku 26.

Obrázek 26 Agarózová gelová elektroforéza specifických produktů PCR (700 bp)

Běh	DNA – výrobku (0,3 g)	Množství DNA ve směsi pro PCR (ng)	Detekce produktů PCR
1	DNA standard		+
2	Negativní kontrola (bez DNA)	0	-
3	Pozitivní kontrola (DNA z <i>N. tabacum</i>)	2	+
4	Chlebičky	158,8	-
5	ředění 10x		-
6	Bebe rodinné cereální	21,2	-
7	Bebe extracereální	37,4	-
8	ředění 10x		-
9	Hami kaše	10,4	-
10	Křupinka špaldová	79,2	-
11	Tyčinka HIPP	29,0	-
12	Křupinka ryžová	62,6	-
13	Křupinka kukuřičná	35,8	-

Pozn.: +, ++, +++ produkt PCR detegován v různé intenzitě, – produkt PCR nedetegován

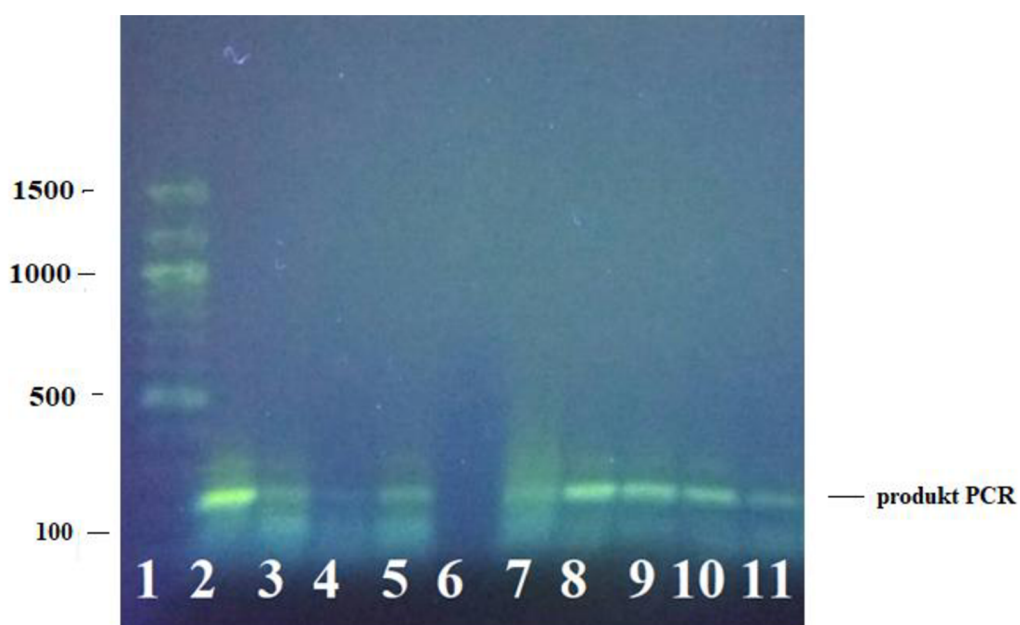


5.4.4 Amplifikovatelnost DNA izolované z cereálních výrobků 220 bp

Z DNA byla připravena směs pro PCR podle postupu uvedeného v kapitole 4.2.6. s použitím primerů pro amplifikaci úseku o velikosti 220 bp. Výsledky detekce specifických produktů PCR jsou uvedeny na Obrázku 27 a Obrázku 28.

Obrázek 27 Agarózová gelová elektroforéza specifických produktů PCR (220 bp)

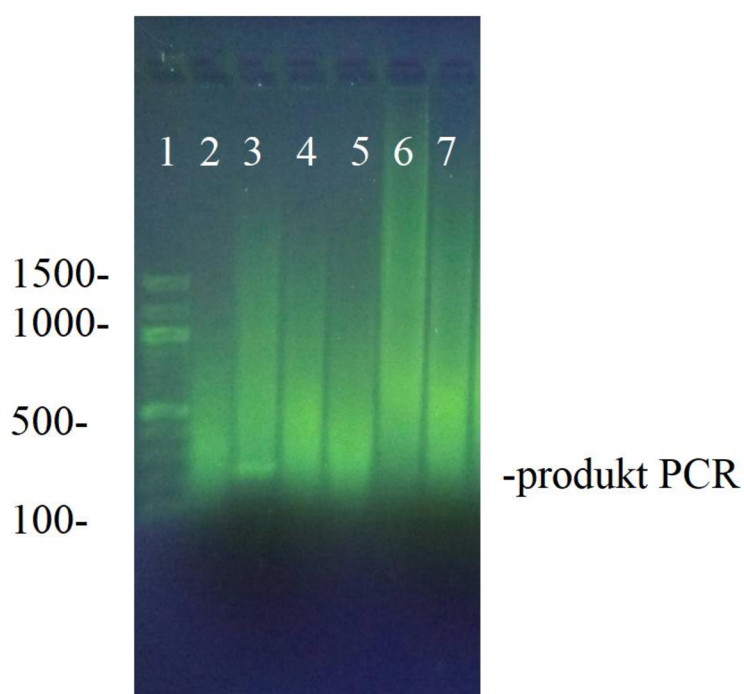
Běh	DNA – výrobku (0,3 g)	Množství DNA ve směsi pro PCR (ng)	Detekce produktů PCR
1	DNA standard		
2	Pozitivní kontrola (DNA z <i>N. tabacum</i>)	2	++
3	Negativní kontrola (bez DNA)	0	-
4	Hami kaše	156,8	+
5	ředění 10x		++
6	Chlebičky	221,0	-
7	ředění 10x		+
8	Bebe rodinné cereální	186,4	++
9	ředění 10x		++
10	Bebe extracereální	224,4	++
11	ředění 10x		++



Pozn.: +, ++, +++ produkt PCR detegován v různé intenzitě, – produkt PCR nedetegován

Obrázek 28 Agarózová gelová elektroforéza specifických produktů PCR (220 bp)

Běh	DNA – výrobku (0,3 g)	Množství DNA ve směsi pro PCR (ng)	Detekce produktů PCR
1	DNA standard		
2	Pozitivní kontrola (DNA z <i>N. tabacum</i>)	2	++
3	Negativní kontrola (bez DNA)	-	-
4	Křupinka špaldová	146,2	-
5	Tyčinka HIPP	130,2	-
6	Křupinka ryžová	160,2	-
7	Křupinka kukuřičná	140,8	-



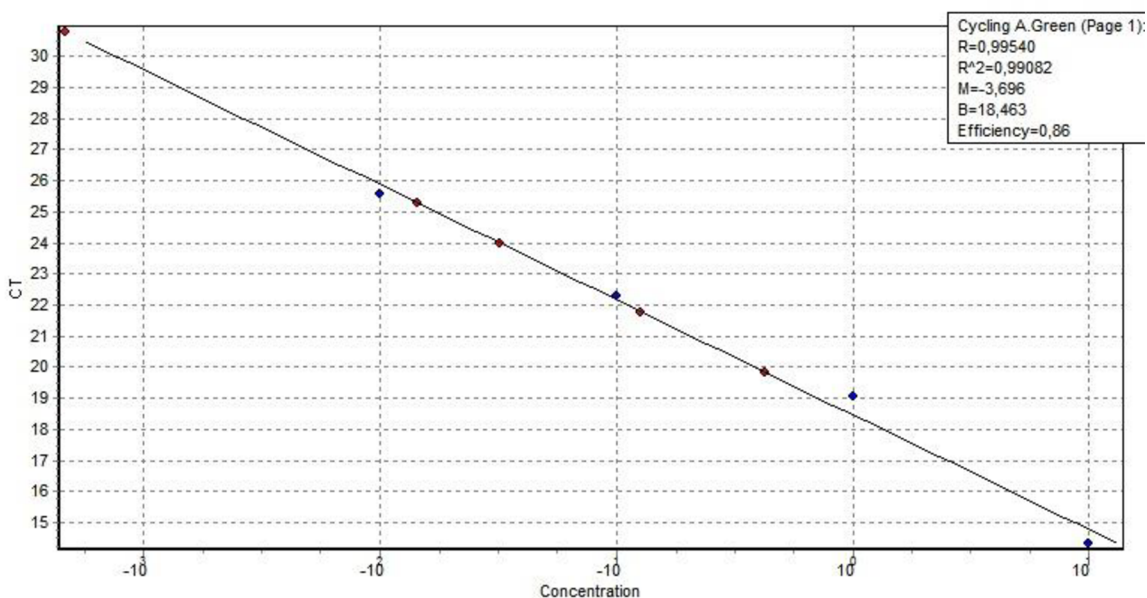
5.5 Amplifikovatelnost DNA izolovane z cereálních výrobků pomoci qPCR

Byla provedena qPCR specifická pro rostlinu DNA pro zjištění přesné koncentrace DNA ve vzorcích cereálního výrobku metodou absolutní kvantifikace.

Ze závislosti hodnoty Ct na koncentraci ve srovnání s kalibrační křivkou (v rozsahu 100 ng μL^{-1} pg μL^{-1}), (bod 1 pg μL^{-1} byl pro výpočet zanedbán) byla pomocí softwaru cykleru Rotor-gene 6000 (verze 1. 7. 87) stanovena koncentrace cílové DNA ve vzorcích v rozmezí 0,0144–0,422 ng μL^{-1} . Dále byla stanovena hodnota reakční účinnosti na 90 %

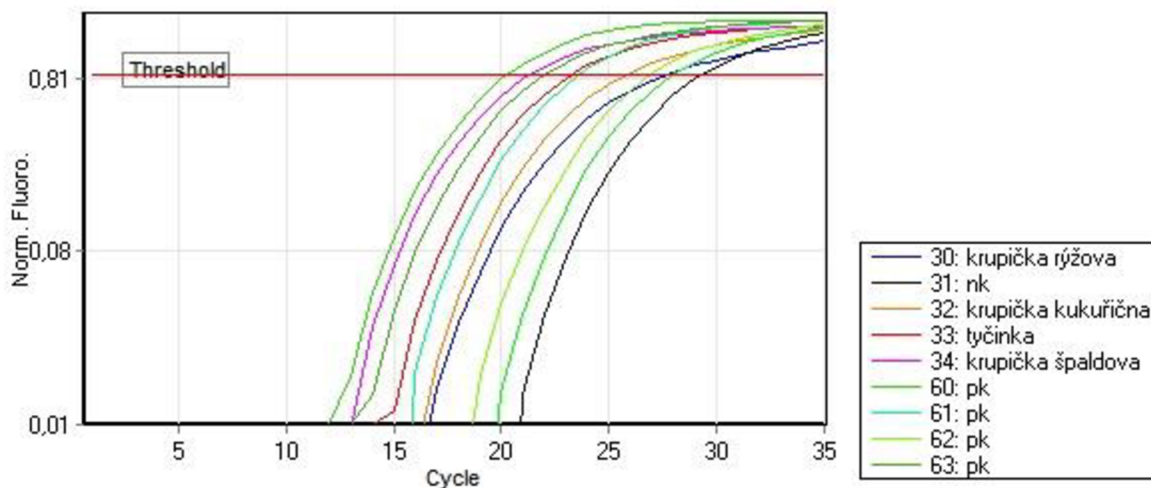
(Efficiency) vypočítaná ze sklonu amplifikačních křivek (M). Spolehlivost reakce byla vypočtena z korelačního koeficientu lineární regrese (R^2) s hodnotou 0,99 (Obrázek 29).

Amplifikační křivky – závislost intenzity fluorescence na cyklu reakce jsou uvedené na Obrázku 30 a Obrázku 31.



Obrázek 29 : Závislost hodnoty Ct na koncentraci.

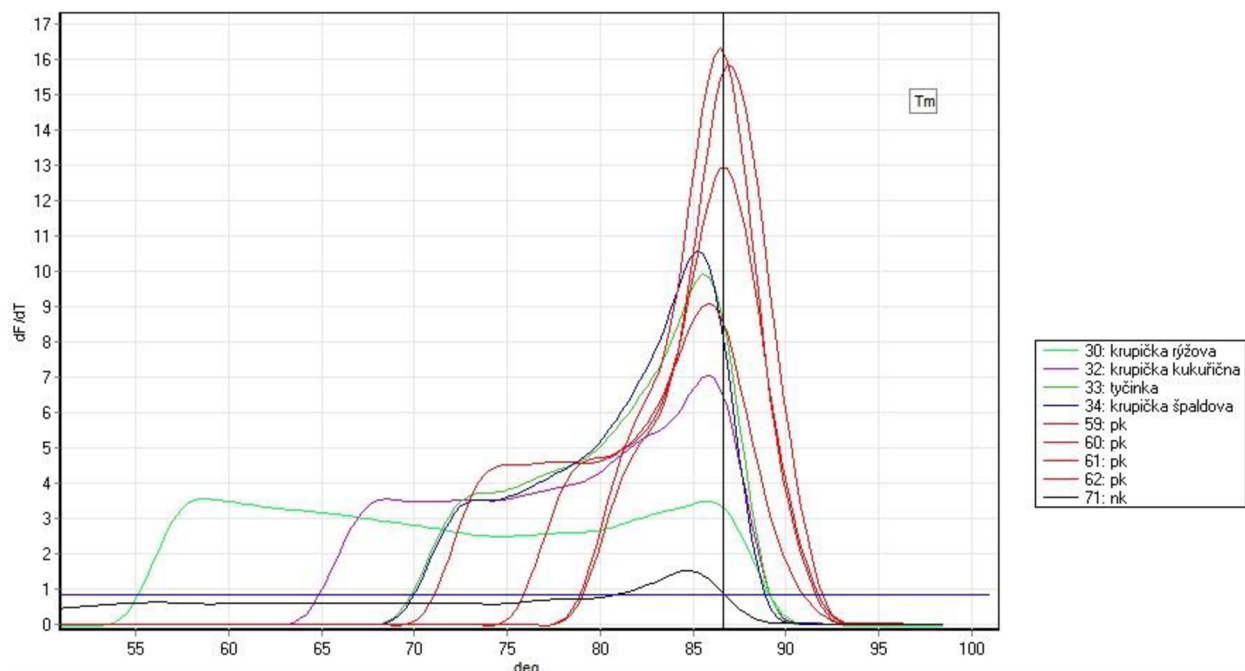
Legenda: červené body – kalibrační křivka, modré body – analyzované vzorky



Obrázek 30: Amplifikační křivky – závislost množství fluorescence na cyklu reakce DNA izolované z cereálních výrobků

Pro ověření přítomnosti specifického produktu PCR byla provedena Melt analýza. Byl detekován jeden vrchol na křivkách tání – PCR produkt o teplotě tání (T_m) 88,3 °C (Obrázek

35 a Obrázek 36). Stejně teploty tání dosahoval vrchol pozitivní kontroly (DNA *N. tabacum*) i série standardů kalibrační křivky. Z výsledků vyplývá, že byla amplifikována specifická rostlina DNA.



Obrázek 31: Melt analýza – závislost množství fluorescence na teplotě DNA izolovane z cereálních výrobků

Veškeré výsledky kvantifikace a Melt analýzy pro testované vzorky jsou uvedeny v Tabulce 14.

Charakteristika vzorku	Ct	c [ng uL ⁻¹]
Křupinka ryžová	25,27	0,0144
Křupinka kukuřičná	23,98	0,0321
Křupinka špaldová	19,85	0,422
Tyčinka HIPP	21,77	0,1273
Pozitivní kontrola	30,78	15,219
Negativní kontrola	4,2	0,0005
Standard 100 ng/μl	25,57	13,119
Standard 10 ng/μl	22,3	0,696
Standard 1 ng/μl	19,05	0,0914
Standard 0,1 ng/μl	14,33	0,012
Standard 0,01 ng/μl	11,8	0,0024

6 DISKUZE

6.1 Testování metody mikro izolace DNA pomoci magnetického separátoru ze zrn cereálií a z nakličených zrn cereálií

6.1.1 Testování izolace a amifikace DNA ze zrn cereálií pomoci magnetického separátoru

Během izolace DNA ze zrn cereálií byla testována modifikovaná metoda pro izolaci rostlinné DNA s CTAB. Rostlinné vzorky obsahují velké množství polysacharidů, polyfenolů a proteinů [51]. Tyto látky během homogenizace se mohou adsorbovat na DNA - proto je důležité jejich odstranění. Pro odstranění polysacharidů se přidává lyzační roztok CTAB s vyšší koncentrací NaCl a merkaptoethanol pro odstranění polyfenolů.

K rozrušení buněk ze zrn během homogenizace vzorku se používá plastový kopist a DNA se uvolňuje do roztoku. Aby se předešlo enzymatické degradaci DNA homogenizace se provádí ve termobloku za chladu [52].

Po homogenizaci se přidá směs chloroform – oktanol a po centrifugaci dojde k rozdělení homogenátu do 3 fází - jednu fází tvoří chloroform-oktanol , druhou - proteiny a nečistoty a zbytky buněčných stěn, třetí – vodná fáze s DNA (Obrázek 12). Odebraná vodná fáze s DNA byla přesrážena isopropanolem a zakoncetrována ethanolem. Bylo zjištěno, že bez tohoto kroku byly změřeny nízké hodnoty koncentraci DNA a DNA byla velmi kontaminována.

Podle naměřených koncentraci DNA a křivek závislosti absorbance DNA na vlnové délce (Tabulka 18; Obrázek 14) lze konstatovat, že DNA byla znečištěna především polyfenoly. (nejvyšší hodnota absorbance byla zaznamenána okolo 250 nm). Nejvyšší koncentrace DNA byla změřena u zrn pohanky. Tento vzorek měl poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 1,37$, což znamená, že obsahoval proteiny. U všech vzorků byla DNA izolována v dostatečném množství pro PCR.

Produkty PCR byly detegovány u pozitivní kontroly a v běhu č.5 (Obrázek 15).

Jiné produkty PCR nebyly detegovány - svědčí to o přítomnosti inhibitorů v ostatních vzorcích izolované DNA.

6.1.2 Testování izolace a amplifikace DNA z klíčků cereálií pomocí magnetického separátoru

Postupem uvedeným v kapitole 4.2.2. bylo izolována DNA z naklíčených zrn cereálií.

Podle změřených křivek závislosti absorbance DNA na vlnové délce (Tabulka 9; Obrázek 17) lze konstatovat, že izolovaná DNA byla kontaminována doprovodnými látkami. Nejvyšší koncentrace DNA byla zjištěna u zrna pohanky.

DNA byla u všech vzorků izolovaná v dostatečném množství pro PCR.

Byla připravena směs pro PCR podle postupu v kapitole 4.2.6. Pro amplifikaci izolované DNA byly použity primery 5.8S a 18S. Produkty PCR byly detegovány u pozitivní kontroly a v běhu č.11 (Obrázek 18).

Tento běh obsahoval ampikon DNA izolované ze naklíčeného zrna pšenice. Jiné produkty PCR nebyly detegovány, to znamená, že v ostatních vzorcích byly přítomny inhibitory PCR.

6.2 Testování izolace a amplifikace DNA z naklíčených zrn cereálií pomocí magneticky jehly

Postupem uvedeným v kapitole 4.2.1 a 4.2.3 bylo izolována DNA z naklíčených zrn cereálií.

Magnetické částice s navázanou DNA byly separovány pomocí magnetické jehly. Izolace pomocí magnetické jehly jsou přesnější, částice s navázanou DNA se váží na jehlu a kontaminující látky zůstávají v roztoku.

Po izolaci byla stanovena koncentrace DNA spektrofotometricky (Obrázek 19, Obrázek 20, Tabulka 10 a Tabulka 11).

Změřená koncentrace DNA byla nejvyšší u naklíčených zrn pšenice. DNA byla u všech vzorků izolovaná v dostatečném množství pro PCR.

Izolovaná DNA byla použita jako templát do směsi pro PCR podle postupu v kapitole 4.2.6. (Obrázek 21). Produkty PCR byli detegováni u pozitivní kontroly a v bězích č. 9-11.

Běh č- 9 obsahoval amplikon z 10x ředěné DNA izolované ze zrn ovsa. I když 10x ředěný vzorek měl nižší koncentraci DNA, tak se amplifikoval neboť obsahoval menší množství inhibitorů PCR.

Běhy č. 10 a 11 obsahovaly amplikony DNA izolované ze zrn ječmene a 10x ředěné DNA ze zrn ječmene. Amplikon v běhu č.10 byl slabě viditelný protože obsahval inhibitory PCR. Amplikon v běhu č.11 měl větší intenzitu protože 10x ředěný vzorek obsahoval menší množství inhibitorů PCR.

Výsledky amplifikace DNA izolované ze naklíčených zrn cereálií jsou zobrazeny na Obrázku 22. Produkty PCR byly detegovány u všech vzorků DNA při ředění 10x a 100x. To znamená, že byla izolována DNA v kvalitě vhodné pro PCR a neobsahovala inhibitory. Obdobných výsledků bylo také dosaženo v publikaci [53], kde nejvyšší čistotu měla DNA, která byla izolovaná z ovocných listů.

6.3 Testování izolace a amplifikace DNA z výrobků

Pro analýzu byli vybráni cereální výrobky pro děti - kaše krupicová značky Hami, cereálně-ovocná tyčinka značky HIPP a křupky kukuřičné, špaldové a rýžové, běžné cereální a extracereální sušenky značky BeBe a chlebičky značky Racio. Magnetické částice s navázanou DNA byly separovány magnetickou jehlou.

Z výsledků spektrometrických měření je patrné, že všechny vzorky (částice) izolované pomocí magnetického separátoru absorbovaly při 240-250 nm, což znamená, že vzorky byly znečištěny zřejmě polyfenoly. Amplifikace se těchto vzorků byla neúspěšně, protože obsahovaly inhibitory PCR.

Z výsledků uvedených v kapitolách 6.1-6.2 vyplývá, že separace magnetických částic s navázanou DNA pomocí magnetické jehly byla úspěšná. Z tohoto důvodu byl tento postup použit i při izolaci DNA z cereálních výrobků (Tabulka 13 a Obrázek 25).

Nejvyšší koncentraci měla DNA izolovaná z kaše Hami a Chlebičku maximum absorbance bylo při 260 nm, což znamená že DNA byla čistá. Hodnoty $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$

se pohybovaly kolem hodnoty 1,8. DNA izolovaná ze vzorků výrobků BeBe rodinné cereální a kaši Hami byly bez kontaminantů. Všechny ostatní vzorky absorbovaly kolem 250-260 nm. což znamená že byly znečištěny zřejmě polyfenoly.

Z izolované DNA byla připravena směs na PCR a její amplifikaci byly použity primery 18S_for a 5,8S_rev. Po amplifikaci nebyl detegován žádný produkt PCR. V toho to lze vyvodit, že DNA izolovaná z tepelně ošetřených výrobků je částečně degradována. Amplifikace byla tedy provedena za použití primerů pro kratší úseky DNA.

Pro amplifikace krátkých úseků DNA byly použity primery 26S_f a 26S_r, pomocí kterých lze syntetizovat amplikon o velikosti 220 bp.

Po amplifikaci byl detegován produkt PCR v bžích 2, 4, 5, 7-11. (Obrázek 27). V bžích 4 a 5 byly amplikony DNA izolované z dětského výrobku- kaše krupičkové Hami. V běhu č. 7 je slabě viditelný amplikon 10x ředěné DNA izolované ze Chlebičků Racio (vzorek zřejmě obsahoval inhibitory PCR). V bžích 8 a 9 jsou amplikony DNA izolované z sušenek BeBe rodinné cereální. V bžích 10 a 11 jsou amplikony DNA izolované ze sušenek BeBe extracereální. U dalších produktů nebyly amplikony detegovány. DNA z tepelně zpracovaných výrobků byla zřejmě degradována.

6.4 Amplifikace DNA izolované z cereálních výrobků pomocí qPCR

Na Obrázku 30 jsou uvedeny amplifikační křivky DNA izolované z cereálních výrobků pomocí magnetické jehly - všechny vzorky DNA se amplifikovaly. Na Obrázku 31 jsou uvedeny křivky tání produktů PCR. Pomocí inflexních bodů byly stanoveny hodnoty $T_m = 88,3$ °C, které jsou hodnoty specifické pro analyzované amplikony. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 14.

7 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo izolovat DNA v kvalitě vhodné pro PCR. z cereálií a cereálních výrobků pomocí magnetických částic. Bylo zjištěno, že použitou mikrometodou lze izolovat DNA z vybraných cereálií a výrobků, odpovídající čistoty, která je vhodná pro genetickou analýzu pomocí PCR.

Bylo zjištěno, že krok předsražení DNA isopropanolem je důležitý.

Vyšší koncentrace DNA bylo dosaženo při izolaci magnetickými částicemi a jejich separaci pomocí magnetické jehly. Nejvhodnější postup je následující:

Homogenizace rostlinného materiálu kopisem z přídavkem CTAB a merkaptoethanolu, inkubace 30 min, a centrifugace z přídavkem směsi chloroform-oktanol. Po centrifugaci odebraná fáze byla přesrážena isopropanolem. DNA byla sorbována na povrch magnetických částic v prostředí PEG 6000 a NaCl při laboratorní teplotě po dobu 15 minut. Pomocí magnetické jehly byla provedena separace, a přenos magnetických částic z navázanou DNA do čistých Eppendorffových zkumavek s ethanolem. Promyté magnetické částice s DNA byly přeneseny pomocí magnetické jehly do Eppendorffových zkumavek. DNA byla eluována 50 μ L TE pufru při teplotě 25°C po dobu 15 minut. Izolovaná DNA byla v různých ředěních použita jako templát v PCR za použití primerů 18S_for a 5,8S_rev, a 26S_for a 26S_rev.. Produkty PCR byly detegovány agarózovou gelevou elektroforézou na 1,2% gelu.

U tepelně zpracovaných výrobků docházelo k částečné degradaci DNA, což ovlivnilo amplifikovatelnost DNA v PCR.

8 LITERATURA

- [1] ČÍŽKOVÁ, H., ŠEVČÍK, R., RAJCHL, A., PIVOŇKA, J., VOLDŇICH, M. Trendy v autenticitě potravin a v přístupech k detekci falšování. *Chemické Listy*. 2012, (106), 903-910.
- [2] LOHUMI, S., LEE, S., LEE, H., CHO, B-K. A review of vibrational spectroscopic techniques for the detection of food authenticity and adulteration. *Trends in Food Science & Technology*. 2015, 46(1), 85-98. DOI: 10.1016/j.tifs.2015.08.003. ISBN 10.1016/j.tifs.2015.08.003. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092422441500196X>
- [3] MADESIS, P., et al. Advances of DNA-based methods for tracing the botanical origin of food products. *Food Research International* [online]. Elsevier Ltd, 1406, 60, 163-172 [cit. 2017-04-03]. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.10.042.
- [4] MADESIS, P., GANOPOULOS, I., SAKARIDIS, I., ARGIRIOU, A., TSAFTARIS, A. Advances of DNA-based methods for tracing the botanical origin of food products. *Food Research International*. 2014, (60), 163-172. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.10.042. ISBN 10.1016/j.foodres.2013.10.042. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996913005905>
- [5] POREBSKI, S., BAILEY, L. G., BAUM, B. R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*. 15(1), 8-15. DOI: 10.1007/BF02772108. ISBN 10.1007/BF02772108. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02772108>
- [6] SMOLYAR, V., Modern problems of identification and falsification of foodstuffs, *Problems of nutrition*. 2007, 22-29. Dostupné také z: http://elartu.tntu.edu.ua/bitstream/123456789/11874/2/Conf_2010v2_Ribun_Kh-Problemy_identyfikatsii_i_falsyfikatsii_252.pdf
- [7] CUHRA, P. Zkušenosti s prokazováním falšování potravin v uplynulých letech. ČÍŽKOVÁ, H. *Metody a kriteria pro ověřování autenticity potravin a potravinářských surovin*. Ostrava: Key Publishing, 2011, s. 8-15. ISBN 978-80-7418-124-5.
- [8] COLEY, N. The fight against food adulteration. *Royal Society of Chemistry* [online]. 2005 [cit. 2017-04-05]. Dostupné z: <https://eic.rsc.org/section/feature/the-fight-againstfood-adulteration/2020253.article>

- [9] CORRADO, G. Advances in DNA typing in the agro-food supply chain. *Trends in Food Science & Technology*. 2016, (52), 80-89. DOI: 10.1016/j.tifs.2016.04.003. ISBN 10.1016/j.tifs.2016.04.003. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224415300972>
- [10] WOOLFE, M., GURUNG, T., a WALKER, M. J. Can analytical chemists do molecular biology? A survey of the up-skilling of the UK official food control system in DNA food authenticity techniques. *Food Control*. 2013, 33(2), 385–392. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.03.015. ISBN 10.1016/j.foodcont.2013.03.015. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713513001370>
- [11] RUDNEV S.D., PAKUL V.N. On the technological properties of wheat breeding the kemerovo scientific-research institute of agriculture. *Institut of genofond and plant breeding*. Kemerovo 2015, 23 p.
- [12] LEONOVA, I.N., Molecular markers: implementation in crop plant breeding for identification, introgression, and gene pyramiding. *Institut of cytology and Genetics*. Moscow 2007, 15 p.
- [13] BLASZCZYK L., CHELKOWSKI J., KORZUN V. et al. Verification of STS markers for leaf rust resistance genes of wheat by seven European laboratories // *Cell Mol. Biol. Lett.* 2004. V. 9. P. 805–817
- [14] GABROVSKÁ, D., HÁLOVÁ, I., CHRPOVÁ, D. *Obiloviny v lidské výživě Stručné shrnutí poznatků se zvýšeným zaměřením na problematiku lepku*. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, 2015. 52 s.
- [15] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin. Rozš. a přeprac. 3. vyd.* Tábor: OSSIS, 2009, 2 sv. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [16] KHANUJA, S. P. S., A. K. SHASANY, M. P. DAROKAR a S. KUMAR. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1999, roč. 17, č. 1, s.74-74. ISSN 07359640. DOI: 10.1023/A:1007528101452. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1007528101452>
- [17] SAHU, S. K., M. THANGARAJ a K. KATHIRESAN. DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. *ISRN Molecular Biology*. 2012, roč. 2012, s. 1-6. ISSN 2090-7907. DOI: 10.5402/2012/205049. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/isrn/mb/2012/205049/>

- [18] WARUDE, D., P. CHAVAN, K. JOSHI a B. PATWARDHAN. DNA isolation from fresh, dry plant samples with highly acidic tissue extracts. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2003, roč. 21, č. 4, s. 467-467. ISSN 0735-9640. DOI: 10.1007/BF02772600. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02772600>
- [19] DEHESTANI, A. a S. K. KAZEMI TABAR. A rapid efficient Metod for DNA islotaiion from plants with high levels of secondary metabolites. *Asian Journal of Plant Sciences*. 2007, roč. 6, s. 977-981. ISSN 1682-3974
- [20] ZHANG, L., B. WANG, L. PAN a J. PENG. Recycling isolation of plant DNA, a novel method. *Journal of Genetics and Genomics*. 2013, roč. 40, č. 1, s. 45-54. ISSN 16738527. DOI: 10.1016/j.jgg.2012.10.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1673852712001920>
- [21] GUILLEMAUT, P. a L. MARÉCHAL-DROUARD. Isolation of plant DNA: A fast, inexpensive, and reliable method. *Plant molecular biology reporter*. 1992, roč. 10, č. 1, s. 60-65. ISSN 1572-9818. DOI: 10.1007/BF02669265. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02669265>
- [22] POREBSKI, S., L. G. BAILEY a B. R. BAUM. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1997, roč. 15, č. 1, s. 8-15. ISSN 0735-9640. DOI: 10.1007/BF02772108. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02772108>
- [23] ADAMS, R. P. a N. DO. A simple technique for removing plant polysaccharide contaminants from DNA. *BioTechniques*. 1991, roč. 10, č. 2.
- [24] KUMAR MISHRA, M., N. S. RANI, A. S. RAM, H.L. SREENATH a JAYARAMA. A simple method of DNA extraction from coffee seeds suitable for PCR analysis. *Africanjournal of biotechnology*. 2008, roč. 7, č. 4, s. 409-413. ISSN 1684-5315
- [25] SAIYED, Z. M., C. BOCHIWAL, H. GORASIA, S. D. TELANG a C. N. RAMCHAND. Application of magnetic particles (Fe₃O₄) for isolation of genomic DNA from mammalian cells. *Analytical Biochemistry*. 2006, roč. 356, č. 2, s. 306-308. ISSN 00032697. DOI: 10.1016/j.ab.2006.06.027. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269706004519>
- [26] AGUILAR-ARTEAGA, K., J. A. RODRIGUEZ a E. BARRADO. Magnetic solids in analytical chemistry: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2010, roč. 674, č. 2, s. 157-165. ISSN 00032670. DOI: 10.1016/j.aca.2010.06.043. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267010008366>

- [27] BERGEMANN, C., D. MÜLLER-SCHULTE, J. OSTER, L. BRASSARD a A. S LÜBBE. Magnetic ion-exchange nano- and microparticles for medical, biochemical and molecular biological applications. DOI: 10.1016/S0304-8853(98)00554-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030488539800554X>
- [28] HORÁK, D., M. BABIČ, H. MACKOVÁ a M. J. BENEŠ. Preparation and properties of magnetic nano- and micro-sized particles for biological and environmental separations. *Journal of Separation Science*. 2007, roč. 30, č. 11, s. 1751-1772. ISSN 16159306. DOI: 10.1002/jssc.200700088. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200700088>
- [29] ŠÁLEK, P.. Příprava a charakterizace magnetických nosičů z hypersíťovaných polystyrenových mikročástic a jejich použití v biosenzoru. Praha, 2012. 39 s. Zkrácená verze dizertační práce na Fakultě chemické VUT Brno na Ústavu materiálů. Vedoucí práce Ing. Daniel Horák, CSc.
- [30] TARTAJ, P., M. P. MORALES, T. GONZÁLEZ-CARREÑO, S. VEINTEMILLASVERDAGUER a C. J. SERNA. Advances in magnetic nanoparticles for biotechnology applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2005, 290-291, s. 28-34. ISSN 03048853. DOI: 10.1016/j.jmmm.2004.11.155.
- [31] HORÁK, D., RITTICH, B., ŠPANOVÁ, A., BENEŠ, M. J. Magnetic microparticulate carriers with immobilized selective ligands in DNA diagnostics. *Polymer*. 2005, (46), 1245-1255. DOI: 10.1016/j.polymer.2004.11.049. ISBN 10.1016/j.polymer.2004.11.049. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386104011553>
- [32] ŠPANOVÁ, A. a B. RITTICH. Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie. 1. vyd. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 86 s. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [33] ŠMARDA, J., J. DOŠKAŘ, R. PANTŮČEK, V. RŮŽIČKOVÁ a J. KOPTÍKOVÁ. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 194 s. ISBN 80-210-3841-1.
- [34] KRÁLOVÁ, B., L. FUKAL, P. RAUCH a T. RUMML. *Bioanalytické metody*. 3. přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2001. 254 s. ISBN 80-708-0449-1.
- [35] Trojánek Z., Kovařík A., Španová A., Marošiová K., Horák D., Rittich, B. Application of magnetic polymethacrylate-based microspheres for the isolation of DNA from raw vegetables and processed foods of plant origin. *J. Food Process. Pres.* 42 (2018) e13384

- [36] RUMML T., RUMLOVÁ M., PAČES V. Genové inženýrství. 1.vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2002. 270 s. ISBN 80-7080-499-8..
- [37] Kovařík, A., - Pires, J. C., Leitch, A. R., Lim, K. Y., Sherwood, A. M., Matyášek, R., Rocca, J., Soltis, D. E., Soltis, P. S. Rapid Concerted Evolution of Nuclear Ribosomal DNA in Two Tragopogon Allopolyploids of Recent and Recurrent Origin. *Genetics*. 2005, roč. 169, s. 931-944. DOI: 10.1534/genetics.104.032839. Dostupné z: <http://www.genetics.org/cgi/doi/10.1534/genetics.104.032839>
- [38] YOONG LIM, K., A. KOVARIK, R. MATYÁSEK, M. BEZDĚK, C. P. LICHTENSTEIN a A. R. LEITCH. Gene conversion of ribosomal DNA in *Nicotiana tabacum* is associated with undermethylated, decondensed and probably active gene units. *Chromosoma*. 2000, roč. 109, č. 3, s. 161-172. ISSN 1432-0886. DOI: 10.1007/s004120050424. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s004120050424>
- [39] JOSHI, M., DESHPANDE, J.D. POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION. *International Journal of Biomedical Research*. 2010, , 81-97. DOI: 10.7439/ijbr.v2i1.83. ISBN 10.7439/ijbr.v2i1.83. Dostupné také z: <http://ssjournals.com/index.php/ijbr/article/view/640>
- [40] Principles and Medical Applications of the Polymerase Chain Reaction. *Molecular biometrics handbook*. 2nd ed. / Totowa, NJ: Humana Press, c2008, s. 29-40. ISBN 978-1-60327-374-9.
- [41]. [43] GARIBYAN, L., AVASHIA, N. Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Invest Dermatol*. 2013, **133**(3), 1-4. DOI: 10.1038/jid.2013.1. ISBN 10.1038/jid.2013.1. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X1536139X>
- [42] SCHRADER, C., SCHIELKE, A., ELLERBROEK, L., JOHNE, R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*. 2012, 113(5), 1014-1026. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x. ISBN 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- [43] ZHANG, L., WANG, B., PAN, L., PENG, J. Recycling Isolation of Plant DNA, A Novel Method. *Journal of Genetics and Genomics*. 2013, 40(1), 45-54. DOI: 10.1016/j.jgg.2012.10.001. ISSN 16738527. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1673852712001920>
- [44] KOVARIK, A. a spol. Rapid Concerted Evolution of Nuclear Ribosomal DNA in Two Tragopogon Allopolyploids of Recent and Recurrent Origin. *Genetics*. 2005, 169(2), 931-944. DOI: 10.1534/genetics. Dostupné také z: <http://www.genetics.org/cgi/doi/10.1534/genetics.104.032839>
- [45] LEE, P. Y., COSTUMBRADO, J., HSU, Ch., KIM, Y. H. Agarose Gel

Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*. 2012, (62). DOI: 10.3791/3923. ISBN 10.3791/3923. Dostupné také z: <http://www.jove.com/video/3923/>

- [46] TROJÁNEK, Z. *Izolace DNA z rostlinných tkání pro použití v polymerázové řetězové reakci*. Brno: Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2013, 84 s. Vedúcí diplomové práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.
- [47] ŠMARDA, J.. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2010, 188 s. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [48] RUMML, T.. *Genové inženýrství*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002, 270 s. ISBN 80-7080-499-8.
- [49] KRÁLOVÁ, B., L. FUKAL, P. RAUCH a T. RUMML. *Bioanalytické metody*. 3. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, 254 s. ISBN 80-708-0449-1.
- [50] KUBISTA, M., J. M. ANDRADE, M. BENGTSSON, A. FOROOTAN, J. JONÁK, K. LIND, R. SINDELKA, R. SJÖBACK, B. SJÖGREEN, L. STRÖMBOM, A. STÅHLBERG a N. ZORIC. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006, roč. 27, č. 2-3, s. 95-125. ISSN 00982997. DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098299705000907>
- [51] ZHANG, L., WANG, B., PAN, L., PENG, J. Recycling Isolation of Plant DNA, A Novel Method. *Journal of Genetics and Genomics*. 2013, 40(1), 45-54. DOI: 10.1016/j.jgg.2012.10.001. ISSN 16738527. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1673852712001920>
- [52] VINOD, K.K. Total genomic DNA extraction, quality check and quantitation. *Classical and modern plant breeding techniques: A hands on training*. Centre for Plant Breeding and Genetics, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, India, 2004, 109-121.
- [53] ARLEO, M., RUIBAL, F., PEREYRA, J., a spol. A DNA-based approach to discriminate between quince and apple in quince jams. *International Food Research Journal*. 2012, 19(4), 1471-1477.

9 POUŽITÉ ZKRATKY

zkratka	vysvětlení zkratky
bp	pár bází (base pair)
CTAB	cetyltrimethylammonium bromid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleosidtrifosfát
HCl	kyselina chlorovodíková
PCR	polymerázová řetězová reakce
MS	magnetický separator
MJ	magnetická jehla
PEG	polyethylenglykol
qPCR	polymerázová řetězová reakce v reálném čase
T _m	teplota tání
WHO	světová zdravotnická organizace
FAO	organizace pro výživu a zemědělství
UNEP	program osn pro životní prostředí
ISO	mezinárodní organizace pro normalizaci
HACCP	system analýzy rizika a stanovení kritických kontrolních bodů
IFS Food	mezinárodní standard