

## **ABSTRAKT**

Ověření autenticity potravinářských výrobků je důležitým krokem před jejich uvedením na trh. Tohle testování zabezpečuje, že výrobek skutečně obsahuje to, co uvádí etiketa a taktéž je ověřena jeho zdravotní nezávadnost. Jednou z metod, které je možné použít na ověření autenticity je polymerázová řetězová reakce (PCR).

Experimentální část práce byla zaměřena na izolaci DNA pomocí magnetických částic v kvalitě pro PCR z potravinářského výrobku – kečupu. Jako kontrola byla izolována ze semen a stonku rajčete. Byla porovnáována amplifikovatelnost DNA izolované z výrobku pomocí magnetických částic separovaných jehlou a separátorem. Metodu je potřeba dále optimalizovat.

## **ABSTRACT**

Authenticity verification of food products is an important step before their release to the market. This testing ensures that the product contains what the label states and also confirms the medical harmlessness. One of methods possible to use for authenticity verification is polymerase chain reaction (PCR).

The experimental part was focused on the DNA isolation using magnetic particles on PCR – ready quality from food product – ketchup. DNA isolated from seeds and stalk of tomato were used as a controls. Amplificability of DNA isolated with magnetic particles using magnetic separator and needle was compared. The method requires further optimization.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Autenticita, potravinářský výrobek, DNA izolace, PCR

## **KEYWORDS**

Authenticity, food products, DNA isolation, PCR

KOČIANOVÁ, Vanda. *Testování autenticity potravin s využitím DNA analýzy*. Brno, 2018. Bakalářská práce. VUT Brno. Vedoucí práce Doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité zdroje jsou správně odcitovány. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucí bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

*Velmi ráda bych se poděkovala vedoucí své bakalářské práce doc. RNDr. Alena Španové, CSc. za její obrovskou trpělivost a ochotu, odborné vedení, cenné rady a hlavně za čas, který mi věnovala při zpracování této bakalářské práce.*

## Obsah

1	Úvod.....	6
2	Teoretická část.....	7
2.1	Autenticita .....	7
2.1.1	Falšování výrobků .....	7
2.1.2	Autenticita výrobků rostlinného původu .....	8
2.2	Izolace a separace DNA .....	10
2.2.1	Izolace pomocí CTAB metody.....	10
2.2.2	Izolace pomocí magnetických částic .....	11
2.3	Metody DNA analýzy.....	11
2.3.1	DNA hybridizace.....	11
2.3.2	PCR .....	12
3	Cíl práce .....	17
4	Experimentální část.....	18
4.1	Materiál.....	18
4.1.1	Materiál rostlinného původu použitý na analýzu .....	18
4.1.2	Roztoky pro homogenizaci vzorku .....	18
4.1.3	Roztoky pro izolaci a purifikaci DNA.....	18
4.1.4	Magnetické nosiče.....	19
4.1.5	Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu .....	19
4.1.6	Komponenty pro PCR .....	19
4.1.7	Přístroje a pomůcky.....	19
4.2	Metody.....	19
4.2.1	Příprava homogenátu buněk z rajčete a kečupu .....	19
4.2.2	Izolace DNA.....	20
4.2.3	Stanovení koncentrace DNA .....	21
4.2.4	Srážení DNA ethanolem.....	21
4.2.5	PCR .....	21
4.2.6	Detekce produktů PCR agarózovou gelovou elektroforézou .....	22
4.3	Výsledky.....	24
4.3.1	Izolace DNA z rajčete .....	24
4.3.2	Izolace DNA z kečupu .....	28
4.4	Diskuze .....	39
4.4.1	Izolace DNA z rajčete a rajčatového výrobku.....	39
4.4.2	Stanovení koncentrace a čistoty DNA.....	39
4.4.3	Amplifikace v PCR .....	40
5	Závěr.....	41
6	Zdroje .....	42

# 1 Úvod

Falšování potravin je proces, při kterém je kvalita potravin nižší, než za jakou je vydávána. Tenhle problém je lidstvu znám už od starověku, kdy v důsledku velké poptávky, vysokých cen a omezeného zásobování byly některé potraviny nahrazované levnější variantou.

V pozdějších dobách, kdy se začalo využívat chemických přípravků, vzrostla na významu otázka bezpečnosti lidského zdraví. V důsledku toho začaly vznikat analytické metody schopné rozpoznat aditivní látky a taktéž ověřit autenticitu.

Mezi takovéto metody patří i metody DNA analýzy. Při těchto metodách je velmi důležitým krokem samotná izolace DNA ze vzorku, protože metody založené na DNA analýze jsou citlivé na čistotu DNA. Spolu s DNA se mohou izolovat i jiné látky, které interagují v procesu syntézy a způsobují falešně negativní výsledky, proto je důležitým faktorem právě čistota vzorku DNA. U tepelně zpracovaných výrobků je dalším problémem degradace DNA.

Pro každou potravinu je nutná optimalizace izolačních a purifikačních kroků, aby bylo následně možné provést požadovanou analýzu. Nejčastěji se jedná o amplifikaci DNA.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Autenticita

V dnešní době jsou podvody na potravinářských výrobcích častým problémem. Firmy, v snaze získat co největší zisk, mění složení výrobku, etiketa však zůstává stejná. Na takovou změnu doplatí konzument, který se musí spoléhat na etiketu. Navzdory tomu, že ve většině případů nepřesného označení výrobku není ohroženo lidské zdraví, jsou však i případy, které mohou mít i závažnější následky, zvláště v případě potenciálních potravinových alergenů. [1]

#### 2.1.1 Falšování výrobků

Otázka autenticity souvisí se složením výrobku. Navzdory tomu, že mohou být páchány různé podvody, můžeme říct, že ve většině případů se jedná o prodej levného výrobku za dražší. Může docházet k následujícím záměnám.

##### 2.1.1.1 Druh nebo odrůda

Záměna druhu nebo odrůdy je nejjednoznačnější případ neautentických výrobků. Může nastat případ, kdy dojde ke kompletní záměně jednoho druhu za jiný, avšak častější případem je smíchání autentického produktu s podobnou méně nákladnou alternativou. Příkladem prvního případu, kdy dojde k úplné záměně, je například použití směsi slunečnicového a sójového oleje s přidanými barvivy jako chlorofyl či beta karoten pro získání barvy a aroma olivového oleje. Příkladem druhého případu může být smíchání olivového oleje s jiným rostlinným olejem, nebo smísení pomerančového džusu s jablečným.

Tenhle typ falšování lze převážně poměrně lehce detegovat, protože se ve výrobku často nacházejí přírodní markery, které mohou být monitorovány. [2]

##### 2.1.1.2 Oblast původu

Hodně výrobků, hlavně těch evropských, klade velký důraz na jméno regionu, odkud produkt pochází. Takovýto produkt může přitahovat větší pozornost nežli jemu podobný bez označení regionu. Asi nejvíce jasným příkladem jsou v tomhle případě vína, kde jeho chuť závisí nejen od výrobního procesu a odrůdy vinné révy, ale také od klimatických podmínek a složení půdy. [2]

##### 2.1.1.3 Proces výroby

Je častým případem, že výrobek má vyšší cenu, protože byl připraven speciálním procesem výroby. Jednoduchým příkladem je opět olivový olej. Olivový olej může obsahovat rafinovaný podíl, což znamená, že tahle část byla zahřátá a vyextrahována pomocí organických rozpouštědel, avšak panenský olivový olej musí být připraven zastudena použitím mechanických sil.

Vzhledem k tomu, že daný proces je levnější a výnosnější, často se stává, že je výrobek vyroben touthle cestou, ale označen je jako vyrobený jiným procesem. [2]

##### 2.1.1.4 Průmyslové podvody

Jedná se převážně o úpravu barvy, aroma, chuti výrobku přidáním aditiv. Příkladem může být zředění pomerančového nebo jiného ovocného džusu cukerným roztokem. Do téhle kategorie lze zařadit podvody týkající se značky výrobku. [2]

## **2.1.2 Autenticita výrobků rostlinného původu**

Následující část bude věnována autenticitě jednotlivých druhů výrobků rostlinného původu.

### **2.1.2.1 Olivový olej**

Význam olivového oleje je v dnešní době znatelný, zejména díky jeho nutričním hodnotám. Charakter oleje je dán kombinací klimatických podmínek regionu a typu kultivaru, čili vyšlechtěné odrůdy.

Autenticita olivového oleje byla po dlouhou dobu prováděna analýzou sterolů a mastných kyselin pro určení falšování olivového oleje rostlinným olejem. V poslední době se DNA markery ukázaly být účinným nástrojem při identifikaci kultivarů použitých pro produkci olivového oleje. DNA izolovaná z oleje může být vysoce degradovaná nebo bohatá na inhibitory PCR, což může znemožnit efektivní analýzu. Existují však výsledky studií, které potvrzují získání dostatečného množství DNA z olivového oleje. [3,4]

### **2.1.2.2 Obilniny**

Obilniny jako pšenice, žito nebo ječmen obsahují zásobní protein gluten (lepek), který není vhodný pro lidi trpící celiakií. Bezlepková dieta je pro tyto lidi nevyhnutelná, proto je správné označení výrobku velmi důležité, aby bylo možné se vyhnout požití potravin obsahujících lepek.

Metody používané na detekci lepku jsou převážně založeny na proteinové analýze. Nejnovější PCR metody založené na specifickém rozlišení pšenice, žita, ječmene a ovsa ve vzorcích poskytly výsledky korelující s proteinovou analýzou.

Dalším případem, kdy je potřebné ověření autenticity jsou tradiční italské těstoviny, které se vyrábí z tvrdé pšeničné krupice a nesmí obsahovat měkkou pšenici. Podle italské legislativy tvrdá pšenice může obsahovat maximálně tři procenta měkké pšenice.

Byla popsána dvojitá (duplexní) PCR metoda, která umožňuje zároveň detegovat oba druhy pšenice a byla úspěšně použita na těstovinách s detekčním limitem 0,2 % (w/w). Druhově specifická PCR byla použita na detekci měkké pšenice v krupici a chlebu a její detekční limit byl 3 až 5 % (w/w). Použitím PCR v reálném čase bylo možné tento detekční limit snížit na 2,5 %.

Autenticitu je potřebné ověřit i při produkci sladu z ječmene. Vyskytují se dva druhy ječmene a to s dvojřadovým a šestřadovým klasem, kde počet řadů udává počet plodných květů nacházejících se na každém klase. Dvojřadový klas poskytuje méně úrody, ale je považován za lukrativnější než šestřadový klas, který dává více úrody. Tu se vyskytuje možnost pro falšování dvojřadového klasu za šestřadový, což může uškodit sladovnickému procesu. Proto je potřebná spolehlivá metoda na určení odrůdy ječmene v nemixovaných dávkách a určení odrůdy v mixovaných dávkách zrn.

Mezi spolehlivé metody určení odrůdy patří elektrolyza, především SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného), jejím principem je separace zásobních proteinů hordeinů a jejich stupeň polymorfizmu, který se druhově liší. Pro zvýšení detekčních limitů je možné použít HPLC (vysokoúčinná kapalinná chromatografie) jako doplňkovou metodu, kde se daný protein dělí na základě hydrofobicity. [2,4]

### 2.1.2.3 Alergeny

Správné označení potravin je jediný způsob, jak se vyhnout konzumaci potravinám obsahujícím alergen. Avšak úplné vyhnutí se alergenům může být problémové vzhledem k tomu, že zpracované výrobky obsahují velká množství ingrediencí. Proto je nesmírně důležitá spolehlivá metoda pro určení alergenů ve výrobcích.

Většina komerčně užívaných technik pro detekci alergenů je založená na určení potenciálně alergenních proteinů s využitím imunologických metod. DNA však může být také využita jako marker pro přítomnost alergenů.

Jedním z alergenů je lískový oříšek, který se často používá jako přísada do těstovin, cukrárenských výrobků nebo zmrzliny a může být taktéž zpracován na olej. Neúmyslně může být přítomný v řadě dalších výrobků jako kontaminant v procesu výroby.

Druhově specifická PCR umožňuje amplifikovat fragment hlavního alergenu lískového oříšku a tak umožnit jeho detekci s limitem 0,001% (w/w). PCR-ELISA ukázala vysokou specifitu na lískový oříšek, kterého přítomnost bylo možné detekovat v zpracovaných výrobcích díky vyšší stabilitě DNA.

Dalším alergenem je arašíd. Vysloužil si větší pozornost kvůli vysoké četnosti a závažnosti reakce u citlivých lidí.

PCR v reálném čase využívající TaqMan sondu umožňuje specifickou detekci i stopového množství arašídů. Duplexní PCR umožňuje současnou detekci arašídů a lískového oříšku v surové i zpracované potravíně; je schopná detekovat 50 pg DNA. Spolehlivější metodou detekování současně dvou druhů ořechů je PCR, při které se využívá specifická DNA sonda pro detekci a rozpoznání specifické sekvence DNA.

Vlašský ořech patří také mezi alergeny. Je velmi často používán v pekárenství jako základní komponenta náplní, taktéž se nachází v cukrárenských produktech jako například v čokoládě, je součástí směsí müsli cereálií a velkého množství dalších potravin.

PCR v reálném čase dokáže amplifikovat hlavní alergenní gen vlašského ořechu s detekčním limitem 0,01% (w/w) ve vzorku pečiva.

Mezi alergeny patří taktéž celer. Tahle zelenina má rozsáhlé použití v potravinářském průmyslu, zejména jako ingredience do směsí koření, do bujónů, omáček, klobás a předpřipravených jídel. Celer obsahuje hned několik známých alergenů.

Druhově specifickou PCR se amplifikuje gen manitol dehydrogenáza a to umožňuje specifickou detekci čtyř druhů celeru s detekčním limitem 0,1 % (w/w). Tato technika byla testována na masových výrobcích. S využitím klobás jako vzorku je možné detegovat stejný gen pomocí PCR v reálném čase, přičemž detekční limit je 0,0005 – 0,001 % (w/w). [4]

### 2.1.2.4 Ovocné pyré

Dětské výživy pozůstávají z ovocného pyré, cukru, vody a aditiv jako antioxidantů a zahušťovadel. Protože je tohle jídlo určeno pro malé děti, je nutné, aby mělo dostatečnou nutriční hodnotu, vysoký obsah ovocné složky ve vysoké kvalitě, a taktéž se kladou vysoké požadavky na nízké hladiny pesticidů, mikrobiologickou kontaminaci, aditiva a správné značení. [5]

### 2.1.2.5 Kečup

Mezi základní složky kečupu patří rajčatová pasta, cukr, sůl, ocet, koření a jiné ingredience. Komerční kečupy mají rozličné složení, které se liší poměrem jednotlivých ingrediencí. Co

mají však společné je, že musí obsahovat minimální množství rajčat 7 – 10 %. Často se však stává, že jsou produkovány kečupy s nižším obsahem rajčatové složky.

Mezi markery, které se sledují při ověřování autenticity, patří obsah karotenoidů (lykopénu a betakaroténu), glutamové kyseliny, kyseliny citrónové a maleinové a ionty jako sodík, draslík, hořčík nebo vápník.

Obsah hydroxymethylfurfuralu (HMF) indikuje zhoršení kvality výrobku vlivem zahřátí nebo skladování. Vzniká spontánně Maillardovou reakcí nebo dehydratací hexóz. HMF se prakticky nevyskytuje v čerstvé potravině, avšak zahřátím či dlouhým skladováním se jeho obsah zvyšuje. [5,6]

### **2.1.2.6 Geneticky modifikované organismy (GMO)**

Od doby, kdy se GMO zařadili do potravinářského průmyslu, vyvstala obava ohledem bezpečnosti výrobků, jak ze strany vědců, tak ze strany veřejnosti. Proto bylo označení takovýchto výrobků nevyhnutelností, především v Evropě. EU se rozhodla věnovat speciální pozornost takovýmto výrobkům a rozhodla, že pokud výrobek obsahuje více než 0,9 % povolených GMO musí nést speciální označení. Vyvstala tedy potřeba analytické metody nejenom v krajinách EU, ale taktéž v krajinách exportujících produkty do EU.

Pro detekci se využívají metody PCR. Tyto metody mohou být rozděleny do několika kategorií na základě specifity a to prověřovací skrínigové metody, genově specifické metody a konstrukčně specifické metody.

Skrínigové metody jsou nejméně specifické, protože se zaměřují na detekci promotoru a terminátoru, které jsou přítomny v mnoha rozdílných GMO. Genově specifické metody se zaměřují na průkaz aktivního genu se specifickou genetickou modifikací. Tuhle metodou se může určit přítomnost GMO, avšak nedokážeme říct, zda se jedná o povolený GMO nebo nikoli. Obě tyto metody jsou založeny na průkazu více či méně v přírodě se vyskytujících DNA sekvencí, a proto je tu značné riziko získání falešně pozitivního výsledku. Konstrukčně specifická metoda se zaměřuje na průkaz spojení mezi dvěma úseky DNA a to promotoru a funkčního genu, které se v přírodě nemusí vyskytovat.

Bez ohledu na to, jakou technikou je GMO detekován, identifikace specifického fragmentu (produktu PCR) často zahrnuje elektroforézu na agarovém gelu. K dispozici jsou však i metody PCR v reálném čase. [4]

## **2.2 Izolace a separace DNA**

Izolace a separace jsou prvními kroky před samotnou amplifikací DNA.

### **2.2.1 Izolace pomocí CTAB metody**

Izolace DNA z rostlinného pletiva je velmi obtížná, protože biochemické složení se výrazně liší v závislosti na druhu rostliny. Největším problémem jsou polysacharidy a polyfenoly, které interferují v procesu amplifikace DNA. Za neoptimálnější metodu se v současnosti považuje CTAB metoda. Tato metoda zahrnuje využití CTAB pufru a merkptoethanolu.

CTAB pufr obsahuje CTAB (cetyltrimethylamonium bromid), Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan), EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová), NaCl (chlorid sodný), PVP (polyvinylpyrrolidon).

CTAB slouží na rozrušení membrán. EDTA vystupuje jako chelační činidlo a tvoří komplexy s dvojmocnými kationty, potřebnými pro aktivitu nukleáz. Tris udržuje stabilní pH 8. NaCl slouží na neutralizaci negativního náboje DNA a odstránění polysacharidů. PVP odstraňuje polyfenoly. Merkptoethanol pomáhá denaturaci proteinů porušením disulfidických vazeb a taktéž odstraňuje polyfenoly. [7,8]



### 2.2.2 Izolace pomocí magnetických částic

Tento proces pozůstává ze čtyř kroků, a to navázání, separace, promytí a eluce.

Prvním krokem je navázání DNA na magnetické částice. Povrch magnetických částic vykazuje afinitu k DNA nebo je tvořen porézním sklem. DNA je navázána na povrch částice. Jádro částice je tvořeno kovem a proto je možné odseparovat nosiče s navázanou DNA s využitím magnetického pole.

Zdrojem magnetického pole může být magnet (magnetický separátor), kterým se působí na eppendorfovou zkumavku a nosiče s navázanou DNA jsou k němu přitahovány. Dalším zdrojem magnetického pole je magnetická jehla. Magnetické pole je tvořeno přechodem proudu vodičem (kovovou tyčkou - jehlou). Separace probíhá tak, že jehlu zanoříme do roztoku a nosiče s navázanou DNA nám ulpí na špičce jehly. Následně jsou přeneseny do čisté zkumavky a vypnutím proudu se uvolní z jehly.

Dalším krokem je promytí. V případě separátoru se nejdříve odstraní zbylý roztok a pak se vzorek promyje ethanolem. V případě magnetické jehly stačí pouze promytí ethanolem.

DNA se z magnetických částic uvolní elucí do TE pufru. [9]

## 2.3 Metody DNA analýzy

Molekulární metody detekce jsou založeny na dvou typech molekul a to na proteinech a nukleových kyselinách.

Při určování autenticity detekcí druhově specifického proteinu byly využity imunologické a elektroforetické metody. Zahřátím potravin v procesu výroby však dochází k denaturaci proteinu, proto jsou metody založené na DNA analýze, konkrétně PCR, preferovány, především díky lepší stabilitě DNA oproti stabilitě proteinů a taktéž kvůli vysoké citlivosti a specifitě.

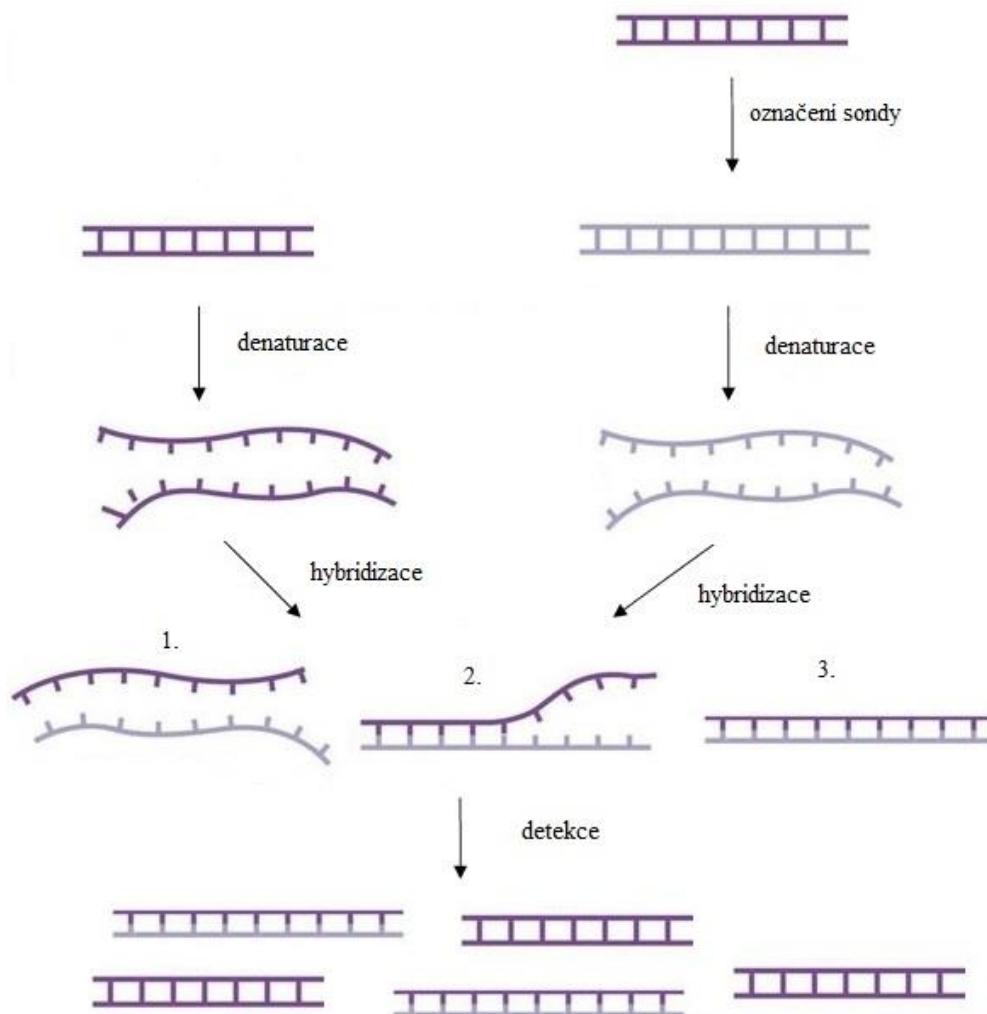
Díky větší termostabilitě DNA je její analýza pravděpodobně méně ovlivněná zpracováním výrobku. Navíc je DNA přítomna ve většině buněk organismu, což umožňuje obdržení identického výsledku neohledně na to, z které části byl vzorek odebrán. [10]

### 2.3.1 DNA hybridizace

Hybridizace je proces, při kterém se tvoří dvouřetězcová molekula ze dvou jednořetězcových DNA nebo jednořetězcové DNA a jednořetězcové RNA na základě komplementarity báz. Abychom tuto metodu mohli provést, je třeba si nejprve připravit značený specifický úsek DNA nebo RNA, který bude sloužit jako sonda a bude sledem nukleotidů přesně odpovídat menší (20-30 nukleotidů) nebo větší části (100-2000 nukleotidů) genomu DNA. Značení se provádí radioaktivně nebo neradioaktivně, například fluorescenčně.

Následně necháme při vhodných reakčních podmínkách zreagovat sondu s cílovou DNA, ve které předpokládáme přítomnost genu. Zahřátím nukleové kyseliny dojde k denaturaci a vzniku jednovláknové DNA, ke které se na základě komplementarity může připojit námi připravená sonda a dojde ke hybridizaci. Následným ochlazením se vytvoří dvouvláknový řetězec DNA-DNA, DNA-RNA nebo RNA-RNA. Protože byla naše sonda označená, můžeme teď podle označení detekovat požadovaný úsek DNA nebo RNA. Tento postup je graficky znázorněn na obrázku 1.

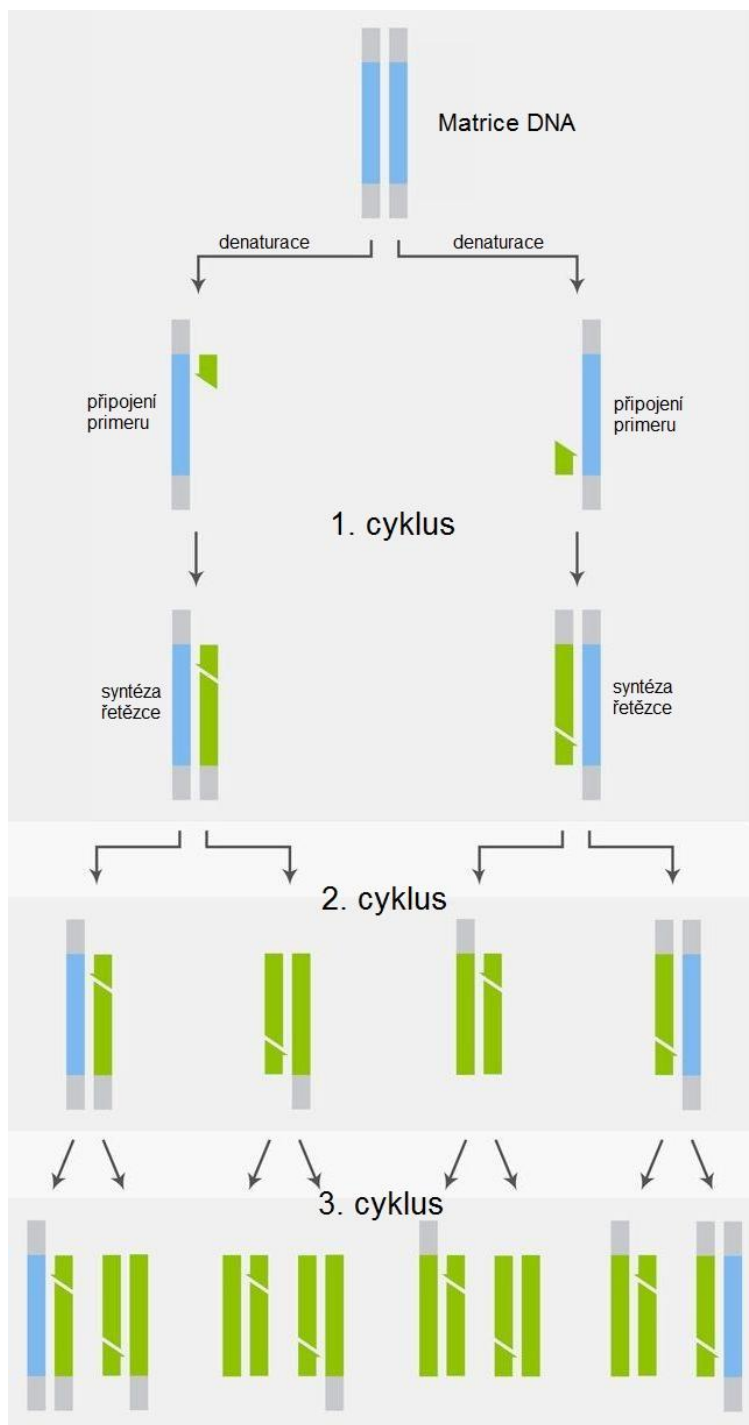
Hybridizace se využívá i v metodě PCR, kde chemicky syntetizované primery (oligonukleotidy) hybridizují s denaturovanou DNA maticí. V PCR se využívá neznačená DNA. [11,12,13]



Obrázek 1: Schéma hybridizace [14]

### 2.3.2 PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je založena na základním molekulárním procesu všech živých organismů a to na replikaci nukleových kyselin. Tak jako replikace i syntéza nového řetězce v PCR probíhá ve směru 5' → 3' za pomoci enzymu termostabilní DNA – polymerázy. U PCR je tento proces cyklický, protože se opakovaně syntetizuje námi vybraná část, kterou je potřebné namnožit, aby byla detekovatelná. Tuhle námi vybranou část si ohraničíme pomocí dvou primerů, které se navážou na protilehlé řetězce DNA. Po přidání DNA - polymerázy a nukleotidů může začít syntéza, která probíhá na obou matricových řetězcích současně ale protisměrně. V prvním cyklu získáme jen částečný amplikon a teprve ve druhém cyklu se nám syntetizuje požadovaný produkt PCR (amplikon). Jeden takovýto cyklus se skládá ze tří částí, přičemž každá má rozdílné nároky na teplotu. Prvním krokem je denaturace dvouřetězcové molekuly DNA matrice, která probíhá za teploty 94 °C, dalším krokem je hybridizace, kdy dojde k připojení primerů na matrici při teplotě 30 – 65 °C a třetím krokem je samotná syntéza za pomoci termostabilní DNA – polymerázy při teplotě 65 -75 °C. Amplifikace úseku DNA je názorně zobrazena na obrázku 2.



Obrázek 2: Schéma průběhu PCR [15]

Aby nedošlo k denaturaci polymerázy, a tím ztrátě její funkčnosti využívá se termostabilní polymeráza izolovaná z termofilních mikroorganismů, která je odolná vůči vyšším teplotám. [16,17]

### 2.3.2.1 Komponenty PCR

#### 2.3.2.1.1 DNA polymeráza

Běžně používanou polymerázou je *Taq* DNA – polymeráza, která je izolovaná z termofilních mikroorganismů, konkrétně *Thermus aquaticus*. Replikace není bezchybný proces, proto se občas stane, že je do řetězce zařazen nekomplementární nukleotid. V živé buňce jsou

mechanizmy, které takhle vzniklou chybu odstraní opravnými mechanizmy, jenže *Taq* DNA – polymeráze takhle aktivita chybí.

Mezi termostabilní DNA – polymerázy korektorskou aktivitou patří *Pfu* DNA – polymeráza (z *Pyrococcus furiosus*) a *Pwo* DNA – polymeráza (z *Pyrococcus woesei*), díky jimž je frekvence chyb 2 – 6 krát nižší než při použití *Taq* DNA – polymerázy. Jejich použití v praxi je však o něco komplikovanější, protože opravní mechanismus taktéž způsobuje degradaci jednořetězcových primerů. Uplatňují se však spolu se *Taq* DNA – polymerázou při amplifikaci dlouhých úseků DNA. [17]

#### 2.3.2.1.2 Primery

Úspěšnost a přesnost PCR je závislá na správném návrhu primerů využitých při syntéze amplifikovaného řetězce. Mezi faktory ovlivňující účinnost primerů patří délka primerů, teplota tání primerů a teplota hybridizace primerů.

Optimální délka primerů je zpravidla 18 – 25 bp (párů bází). Tenhle řetězec je dostatečně dlouhý na to, aby poskytl specifický produkt, na druhou stranu je také dostatečně krátký, aby se primery vázaly jednoduše.

Teplota tání primerů ( $T_m$ ) je teplota, kdy je denaturováno 50 % dvouřetězcových molekul. S primery s  $T_m$  v rozmezí 52 – 58 °C se dosahují nejlepší výsledky.

Teplota navázání primerů ( $T_a$ ) závisí na délce a složení primerů. Obvykle by  $T_a$  měla být o 5 °C nižší než je  $T_m$ . Při příliš vysoké  $T_a$  nedojde k navázání primerů a při příliš nízké  $T_a$  dojde k tvorbě nespecifických produktů v důsledku nesprávného spárování bází. [18, 19]

#### 2.3.2.1.3 Pufr pro PCR

DNA je citlivá na pH a proto je nutné využít pufru. PCR pufr obsahuje Tris – HCl, KCl a  $MgCl_2$ .

Fosfátová skupina na volných nukleotidech váže vodíkové ionty z roztoku a vzniká kyselina fosforečná, což zvyšuje aciditu roztoku. Aby se zabránilo tomuto jevu je hlavní složkou pufru Tris – HCl. Jedná se o konjugovaný pár kyseliny (kyselina chlorovodíková) a báze (tris(hydroxymethyl)aminomethan), který je schopný udržet pH v optimu (8,0 – 9,5) regulací množství vodíkových iontů v roztoku.

KCl (chlorid draselný) ulehčuje vázání primerů, tím že stabilizuje DNA řetězec navázáním draselného iontu na fosfátovou skupinu. Tím se sníží negativní náboj DNA řetězce a primer, který je taktéž negativně nabitý, nebude odpuzován.

$MgCl_2$  (chlorid hořečnatý) stabilizuje DNA řetězec obdobně jako v případě KCl. Slouží však navíc jako kofaktor pro *Taq* DNA – polymerázu. Pro její optimální aktivitu ho však směs musí obsahovat jen určité množství. [20]

#### 2.3.2.1.4 dNTP (deoxynukleotid trifosfáty)

dNTP jsou volné nukleotidy přidávané do roztoku, aby mohlo dojít k syntéze DNA řetězce. Ve fázi prodlužování řetězce DNA je dNTP (deoxynukleotid trifosfát) štěpen a vzniklý dNMP (deoxynukleotid monofosfát) je připojován na řetězec. Odštěpení fosfátové skupiny je katalyzováno hořečnatým iontem, který se váže na alfa – fosfátovou skupinu a ulehčuje tak odštěpení zbylých dvou skupin. [20,21]

#### 2.3.2.1.5 PCR voda

Jedná se o přečištěnou vodu, která nesmí obsahovat nukleázy (hydrolytický enzym, štěpící fosfodiesterovou vazbu), aby nedošlo k degradaci DNA řetězce. Taktéž nesmí obsahovat některé ionty, organické molekuly a bakterie.

DNA – polymeráza je citlivá na těžké kovy, jako kadmium a zinek a některé přechodné kovy, jako železo, měď, kobalt, nikl, které se mohou vázat na enzymy a ovlivňovat tak aktivitu polymerázy. Dalším specifickým kovem je hořčík.

Organické molekuly se záporným nábojem mohou působit podobně jako DNA a tím ovlivňovat katalytický proces. Vystupují jako nekompetitivní inhibitory. [22]

#### 2.3.2.1.6 DNA matrice

Jedná se o DNA, která se bude v PCR amplifikovat.

### 2.3.2.2 Faktory ovlivňující PCR

#### 2.3.2.2.1 Inhibitory

Potravinové výrobky obsahují celou řadu inhibitorů, které interagují v PCR. Inhibitory mohou pocházet z DNA, se kterou jsou koextrahovány. Inhibitory mohou způsobit inaktivaci DNA – polymerázy nebo degradaci DNA.

Rostliny obsahují mnoho substancí, které interagují, nebo by mohly interagovat, když se nacházejí v DNA použité v PCR a pak brzdí PCR proces. Mezi takovéto látky patří například polysacharidy, pektiny a xylany (druh hemicelulosity vyskytující se v buněčné stěně rostlin). Bobulové ovoce obsahuje fenoly a polysacharidy, které jsou závažnými inhibitory v PCR.

Zdrojem inhibitorů jsou také činidla a reagenty, se kterými přichází vzorek do styku v průběhu purifikace. To zahrnuje soli, především KCl a NaCl a iontové detergenty.

Potenciálním inhibitorem PCR jsou hořčičnaté ionty  $Mg^{2+}$ . Ve vyšších koncentracích totiž reagují s primery, DNA, EDTA a dalšími chelačními činidly. Může tak dojít ke vzniku chyb při amplifikaci nebo k amplifikaci nespecifických produktů. [23, 24]

#### 2.3.2.2.2 Kontaminace

Mikroorganismy jsou velmi nepříznivé pro PCR reakce. Dokonce i jedna molekula kontaminující DNA může způsobit chybný výsledek. Mohou uvolňovat nukleotidy z tvořícího se řetězce, taktéž mohou bakterie uvolňovat ionty a organické molekuly, které budou interagovat s aktivitou polymerázy. Kontaminaci je třeba zabránit především v případě, že DNA ve vzorku je velmi malé množství a je proto potřeba větší množství reakčních cyklů pro dosažení požadovaného množství produktu. V tomhle případě může cizorodá DNA konkurovat se stanovovanou DNA a vést k falešně negativnímu výsledku. [22, 24]

### 2.3.2.3 Varianty PCR

Základním metodou je konvenční PCR. Vzniká při ní velké množství kopií DNA. Tento proces je popsán v kapitole 1.2.2. Opakuje se ve 20 – 40 cyklech. Výsledky je možno obdržet až po ukončení procesu amplifikace a provedení agarozové gelové elektroforézy.

Úpravou tohoto základního procesu získáme další varianty.

#### 2.3.2.3.1 PCR v reálném čase

Při této metodě je možno produkt PCR detekovat v průběhu amplifikace, čili v reálném čase. Existuje několik variací PCR v reálném čase a mezi ty nejpoužívanější patří metody využívající SYBR green nebo TaqMan.

SYBR green je barvivo vážící se pouze na dvojvláknovou DNA, následně takhle vzniklá sloučenina fluoreskuje. V průběhu amplifikace se zvyšuje fluorescence, v důsledku vzniku dvojvláknové DNA, na kterou se barvivo může vázat. Množství fluorescence přímo odpovídá

množství dvojláknové DNA. Nevýhodou barviva SYBR green je, že se váže na všechny dvojláknové produkty i na nespecifické produkty či dimery primerů.

TaqMan metoda využívá značený nukleotidový řetězec, sondu, o velikosti 18 – 30 bp. Fluorescenční barvivo, které se nazývá reportér je navázáno na 5' konec řetězce sondy. Na 3' konec řetězce sondy je navázána další molekula, která se nazývá zhášec a její úlohou je pohlcovat energii emitovanou reportérem. V průběhu amplifikace řetězce dochází k degradaci téhle sondy po jejím připojení na amplifikovaný řetězec. Dochází tedy k uvolnění reportéru a jeho fluorescence. Čím více produktu PCR vzniká, tím více reportéru se uvolní a fluorescence je intenzivnější. [25, 26]

#### 2.3.2.3.2 Multiplexní PCR

Multiplexní PCR je možno v jedné směsi detekovat několik úseků DNA současně. Tohle je umožněno tím, že se do směsi přidává několik párů primerů rozpoznávajících několik rozdílných sekvencí nukleotidového řetězce. Multiplexní amplifikace v jednom kroku poskytuje velmi rychlou analýzu, má však několik nedostatků. Může docházet k vlastní inhibici mezi primery a má nižší amplifikační účinnost. Proto jsou kladeny vysoké požadavky na primery. [27, 28]

#### 2.3.2.3.3 PCR – ELISA

Tahle metoda spájí PCR a imunologické metody, přičemž PCR amplifikuje specifický úsek DNA a imunologická metoda pak umožní jeho okamžitou detekci.

Amplifikované sekvence DNA vzniklé PCR reakcí jsou označeny antigenem digoxigeninem (DIG) a je k nim připojena sonda obsahující biotin. Takhle připravená směs je umístěná do mikrotitračních destiček a následuje propláchnutí mírným detergentem. Sonda umožňuje zachycení sekvencí DNA na stěně destičky, díky interakci mezi biotinem z sondy a streptavidinem, který se nachází na povrchu stěny destičky, díky tomu sekvence DNA nejsou odplaveny detergentem. Pak se do směsi přidá anti-DIG protilátka, která se naváže na antigen DIG. Nenavázané protilátky se odplaví detergentem. Součástí protilátky je příkonjugovaný enzym, na který se v dalším kroku naváže kolorimetrický substrát. Navázaný substrát změní barvu a je ho možné měřit spektrofotometricky. [29, 30]

#### 2.3.2.4 Agarozová gelová elektroforéza

Agarozová gelová elektroforéza je jednou z metod detekce produktů PCR. Elektroforéza umožňuje rozdělit fragmenty DNA podle velikosti.

Směs fragmentů je nanášená do žlábků na jednom konci gelu, ve kterém je mikroskopická síť pórů, a celý gel je umístěn do elektrického pole. DNA se pohybuje směrem ke kladné elektrodě, díky svému negativnímu náboji, který je způsoben přítomností fosforečné skupiny. Dlouhé úseky DNA se pohybují pomaleji, protože jsou gelem déle zadržovány. Po několika hodinách jsou jednotlivé fragmenty separovány napříč gelem. Velikost řetězce DNA zjistíme jeho porovnáním se standardním řebříčkem.

DNA na agarozovém gelu není možné vidět. Je nutné DNA obarvit nebo označit. Jednou z metod je smíchání DNA s látkou, která po navázání na DNA fluoreskuje v ultrafialovém světle. Takovou látkou je například ethidium bromid. Další možná metoda je radioaktivní značení nukleotidů před elektroforézou a autoradiografická detekce. [17, 31]

### **3 Cíl práce**

Teoretická část bakalářské práce pojednává o autenticitě potravinových výrobků a metodách jejího stanovení. Cílem praktické části bakalářské práce bylo zvládnutí izolace DNA v kvalitě pro PCR z potravinářského výrobku (kečupu) a následně DNA amplifikovat v PCR s primery specifickými pro rostlinnou DNA. Jako kontrola byly pro analýzu použity semena a stonek rajčete.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Materiál rostlinného původu použitý na analýzu

Rajčata: semena z rajčete, stonky rajčete

Kečup: Hellmann's jemný [Složení: voda, rajčatový protlak (151 g rajčat na 100 g kečupu), cukr ocet modifikovaný kukuřičný škrob, jedlá sůl, sušená zelenina (cibule, česnek), koření]

Kečup je zobrazen na Obrázku 3. Materiál byl zakoupen v komerční síti.



Obrázek 3: Rajčatový potravinářský výrobek použitý na analýzu [32]

#### 4.1.2 Roztoky pro homogenizaci vzorku

- 1,5 % CTAB pufr (1g CTAB; 10 ml 0,5 M Tris; pH 8,0; 16 ml 5 M NaCl; 2 ml 0,5 M EDTA, 42 ml vody)
- Merkaptoethanol (0,2%)
- Chloroform – oktanol (24:1)

#### 4.1.3 Roztoky pro izolaci a purifikaci DNA

- 5 M NaCl (chlorid sodný)
- 40% PEG
- Ethanol (70%)
- TE (Tris – EDTA) pufr
- Ethanol (96%)
- 3 M octan sodný



#### 4.1.4 Magnetické nosiče

Pro izolaci DNA z rajčatových potravinářských výrobků, které jsou uvedeny v kapitole 4.1.1, byly použity magnetické nosiče P(HEMA-co-GMA) – poly(2-hydroxyethylmetakrylát-co-glycidylmetakrylát o průměru 1,8  $\mu\text{m}$  funkcionalizované COOH skupinou (Ing. D. Horák, CSc, ÚMCHAV ČR, Praha).

#### 4.1.5 Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu

- TBE (Tris – borát – EDTA) pufr (0,5 $\times$  koncentrovaný)  
0,5 $\times$  koncentrovaný pufr byl připraven desetinasobným zředěním předpřipraveného 5 $\times$  koncentrovaného TBE pufru. 100 ml 5 $\times$  koncentrovaného TBE pufru bylo doplněno do litru destilovanou vodou.
- Agarózový gel (1,5 %)  
1,5 g agarózy bylo za zvýšené teploty, prostřednictvím mikrovlnné trouby, rozvařeno ve 100 ml 0,5 $\times$  koncentrovaného TBE pufru.
- Barvivo Midori Green
- EtBr (ethidium bromid)  
Barvicí lázeň 0,5  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  byla připravena přidáním 20  $\mu\text{l}$  EtBr do 500 ml destilované vody.

#### 4.1.6 Komponenty pro PCR

- PCR ultra H<sub>2</sub>O (Top – Bio)
- pufr 10  $\times$  LA PCR kompletní (Top – Bio)
- směs dNTP (10 mM) (Top – Bio)
- primery pro amplifikaci 700 bp: 18 S for (10 pmol/ $\mu\text{l}$ ), 5,8 S rev (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )
- primery pro amplifikaci 200 bp: 26 S for (10 pmol/ $\mu\text{l}$ ), 26 S rev (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )
- LA Taq DNA polymeráza (5 U/ $\mu\text{l}$ ) (Top – Bio)

#### 4.1.7 Přístroje a pomůcky

- mini inkubátor (Labnet)
- spektrofotometr Nanodrop 2000/2000C
- zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet)
- magnetická jehla (Němeček)
- centrifuga MiniSpin (Eppendorf)
- centrifuga MINI (Labnet)
- thermo cykler (BIOER Technology)
- UV transluminátor TVR – 312A (Spectroline)
- běžné laboratorní sklo, pomůcky a materiál
- exikátor
- automatické pipety 1000  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$ , 20  $\mu\text{l}$ , 10  $\mu\text{l}$

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Příprava homogenátu buněk z rajčete a kečupu

- Čtyři krát bylo naváženo asi 100 mg semen z rajčete do eppendorfových zkumavek o objemu 1,5 ml.
- Čtyři krát bylo naváženo asi 100 mg stonky z rajčete do eppendorfových zkumavek o objemu 1,5 ml.

- Postupně bylo naváženo různé množství kečupu do eppendorfových zkumavek o objemu 1,5 ml.
- Navážky byly smíchány s 500  $\mu$ l 1,5% CTAB pufru a 1  $\mu$ l 0,2% merkptoethanolu.
- Za stálého chlazení byla provedena homogenizace pomocí plastového kopistu
- Takto připravená směs se inkubovala při 60 °C po dobu 30 minut
- Následně bylo ke vzorku přidáno 500  $\mu$ l chloroform – oktanolu a směs byla centrifugována na 14 500 otáček po dobu 10 minut.
- Poté byla do čistých eppendorfových zkumavek převedena nejvrchnější vrstva obsahující DNA

#### 4.2.2 Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena pomocí magnetických částic s využitím magnetického separátoru a magnetické jehly. Separální směs pro izolaci DNA byla namíchána podle Tabulky 1.

*Tabulka 1: Složení směsi na izolaci DNA pomocí magnetických částic*

Krok	Složka	Objem ( $\mu$ l)
1	5 M NaCl	200
2	homogenát	150
3	40 % PEG	100
4	magnetické částice (2 mg/ml)	50
Celkově		500

- Takhle připravenou směs promícháme a inkubujeme 15 minut při laboratorní teplotě

##### 4.2.2.1 Magnetický separátor

- Směs připravena podle Tabulky 1 se umístí do magnetického separátoru a nechá se separovat 15 minut
- Poté odebereme supernant, k vzorku se přidá 500  $\mu$ l ethanolu a po promíchání se nechá opět separovat
- Po 2 minutách se ethanol odpipetuje a vzorek se ještě jednou promyje tentokrát 100  $\mu$ l ethanolu
- Po další separaci a odpipetování ethanolu se jeho zbytky nechají odpařit
- DNA adsorbována na magnetických částicích se euluje do 50  $\mu$ l TE pufru při 25 °C po dobu 15 minut
- Následně byla za pomoci spektrofotometru změřena koncentrace DNA

##### 4.2.2.2 Magnetická jehla

- Směs byla připravena podle Tabulky 1 a inkubována při laboratorní teplotě 15 minut.
- Magnetické nosiče s navázanou DNA byly pomocí magnetické jehly zachytávány a následně převedeny do eppendorfových zkumavek s 500  $\mu$ l ethanolu.
- Zachytávání magnetických nosičů s navázanou DNA bylo provedeno ve třech opakováních pro každý vzorek
- Následně byly eppendorfové zkumavky vloženy do magnetického separátoru a po odseparování magnetických částic byl ethanol odpipetován a jeho zbytky odpařeny.
- DNA byla eulována do 50  $\mu$ l TE pufru při 25 °C po dobu 15 minut.
- Následně byla za pomoci spektrofotometru změřena koncentrace DNA

### 4.2.3 Stanovení koncentrace DNA

- Koncentrace DNA byla stanovena spektrofotometricky pomocí NanoDrop 2000
- Po očištění čočky přístroje PCR vodou byl jako blank použit TE pufr
- Měřilo se v programu nukleové kyseliny, v rozpětí vlnových délek 220 – 350 nm
- Byly proměřeny všechny vzorky DNA v objemu 2  $\mu$ l

### 4.2.4 Srážení DNA ethanolem

- DNA izolována z jednotlivých navážek kečupu s využitím magnetické jehly, byly spojeny a doplněny na objem 400  $\mu$ l TE puforem.
- Ke vzorkům DNA bylo přidáno 20  $\mu$ l 3 M octanu sodného a 1 ml 96% ethanolu, který byl vychlazen na -20 °C. Po každém přidavku byla směs promíchána.
- Po dobu 15 minut probíhalo srážení při -20 °C
- Směs se následně centrifugovala při 14 500 ot/min po dobu 15 minut.
- Po slití supernatantu se k sedimentu přidal 70% ethanol a směs se opět centrifugovala při 14 500 ot/min po dobu 10 minut.
- Supernatant byl opět slit a sediment se sušil v exikátoru po dobu 10 minut.
- DNA byla následně rozpuštěna ve 50  $\mu$ l TE pufru a skladována při 4 °C.

### 4.2.5 PCR

Směsi pro PCR s primery 18 S for a 5.8 S rev byly připraveny dle Tabuleky 2, s primery 26 S for a 26 S rev dle Tabulky 3

Tabulka 2: Složení směsi pro PCR s primery 18 S for a 5.8 S rev

Komponent	Varianta	
	1	2
	V ( $\mu$ l)	V ( $\mu$ l)
Voda pro PCR	17,5	18,5
PCR pufr kompletní	2,5	2,5
Směs dNTP (10 mM)	1	0,5
DMSO	0,5	-
Primer 18 S for (10 pmol/ $\mu$ l)	1	0,5
Primer 5.8 S rev (10 pmol/ $\mu$ l)	1	0,5
Taq DNA polymeráza (5U/ $\mu$ l)	0,5	0,5
Matrice DNA	1	2,0
Celkem	25,0	25,0

Tabulka 3: Složení směsi pro PCR s primery 26 S for a 26 S rev

Komponent	Varianta		
	1	2	3
	V ( $\mu$ l)	V ( $\mu$ l)	V ( $\mu$ l)
Voda pro PCR	18,5	17,5	17,5 a 16,5
PCR pufr kompletní	2,5	2,5	2,5
Směs dNTP (10 mM)	0,5	1,0	0,5
Primer 26 S for (10 pmol/ $\mu$ l)	0,5	0,5	0,5
Primer 26 S rev (10 pmol/ $\mu$ l)	0,5	0,5	0,5
Taq DNA polymeráza (5 U/ $\mu$ l)	0,5	1,0	0,5
Matrice DNA	2,0	2,0	3 a 4
Celkem	25,0	25,0	25,0

Při pozitivní kontrole byla jako matrice DNA použita DNA z rostliny *Nicotiana tabacum* (1 ng/μl a 50 pg/μl) a při negativní kontrole byla namísto matrice DNA použita PCR voda.

Směsi pro PCR s primery 18 S for a 5.8 S rev bez DMSO (varianta 2) byly vloženy do cykléru na amplifikační program ROST 700, který pozůstává z kroků uvedených v Tabulce 4.

*Tabulka 4: Jednotlivé kroky amplifikačního programu ROST 700*

Číslo kroku	Krok	T (°C)	t (s)
1	Zahřátí	95	300
2	Denaturace DNA	95	40
3	Hybridizace primérů	57	40
4	Syntéza DNA	72	80
5	Ukončení syntézy	72	600
6	Ochlazení	10	-

Krok 2 až 4 probíhá 35 krát.

Směsi pro PCR s primery 18 S for a 5.8 S rev s DMSO (varianta 1) byly vloženy do cykléru na amplifikační program 700RO35, který pozůstává z kroků uvedených v Tabulce 5.

*Tabulka 5: Jednotlivé kroky amplifikačního programu 700RO35*

Číslo kroku	Krok	T (°C)	t (s)
1	Zahřátí	95	600
2	Denaturace DNA	95	30
3	Hybridizace primérů	52	30
4	Syntéza DNA	72	40
5	Ukončení syntézy	72	600
6	Ochlazení	10	-

Krok 2 až 4 probíhá 35 krát.

Směsi pro PCR s primery 26 S for a 26 S rev byly vloženy do cykléru na amplifikační program 220RO40, který pozůstává z kroků uvedených v Tabulce 5.

*Tabulka 6: Jednotlivé kroky amplifikačního programu 220RO40*

Číslo kroku	Krok	T (°C)	t (s)
1	Zahřátí	95	600
2	Denaturace DNA	95	30
3	Hybridizace primérů	52	30
4	Syntéza DNA	72	40
5	Ukončení syntézy	72	600
6	Ochlazení	10	-

Krok 2 až 4 probíhá 39 krát.

#### **4.2.6 Detekce produktů PCR agarózovou gelovou elektroforézou**

Byl připravený 0,5× koncentrovaný TBE pufr a 1,5 % agarózový gel. Před nalitím gelu do elektroforetické formy s hřebínkem bylo přidáno barvivo Midori Green (1μl). Po nalití se gel nechal 30 minut tuhnout na vodorovném povrchu.

Na připravený gel byly nanášeny produkty PCR, ke kterým bylo přidáno 5  $\mu$ l nanášecího pufru Yellow load. Následně byla forma umístěná do elektroforetické vaničky a zalitá 0,5 $\times$  koncentrovaným TBE puftrem.

Elektroforéza byla puštěná na 70 V po dobu 2,5 hodiny. Výsledky byly pozorovány na UV transluminátoru a zdokumentovány fotograficky. Délka PCR produktů byla porovnána s DNA standardním 100 bp řebříčkem.

V některých případech byl gel ještě dobarven v roztoku ethidium bromidu.

## 4.3 Výsledky

### 4.3.1 Izolace DNA z rajčete

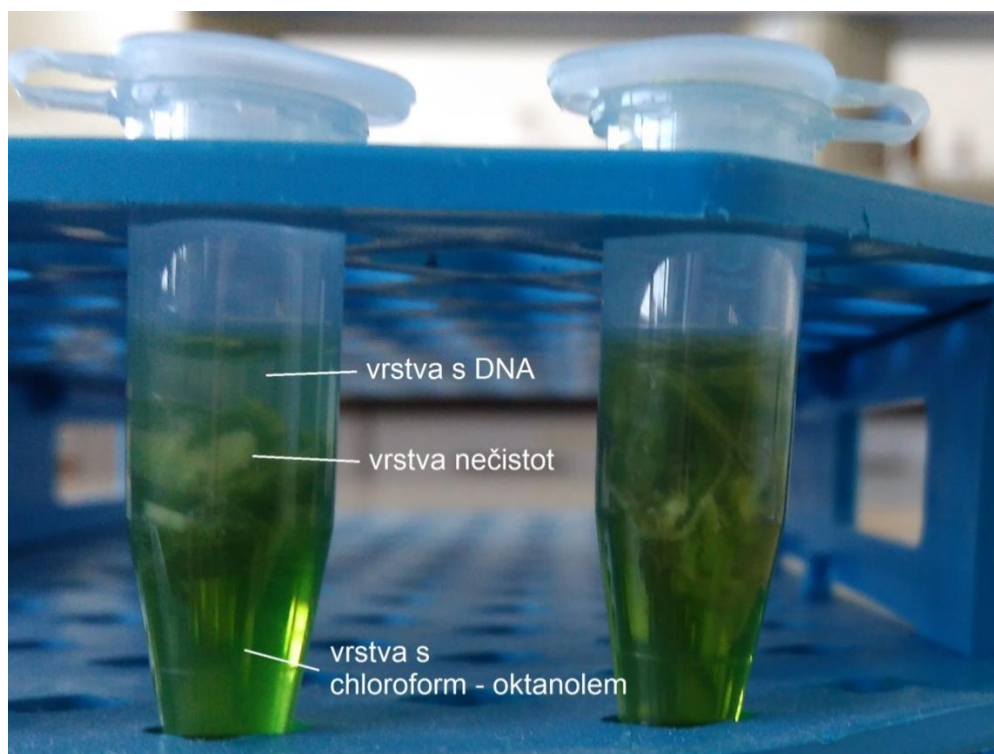
#### 4.3.1.1 Homogenizace

DNA byla izolována z asi 100 mg (konkrétně 110, 120, 110, 100 mg) semen rajčete a asi 100 mg (konkrétně 110, 120, 110, 100 mg) stonku rajčete ve čtyřech opakováních. Vzorby byly homogenizovány v CTAB pufru s merkaptoethanolem s přidavkem chloroformoktanolu (4.2.1.). Rozdělení směsi po centrifugaci můžeme vidět na Obrázku 4 a 5.

*Obrázek 4: Rozdělení vrstev homogenátu semen z rajčete po centrifugaci*



*Obrázek 5: Rozdělení vrstev homogenátu stonku z rajčete po centrifugaci*



Směs se rozdělila na tři vrstvy. Spodní vrstva obsahuje chloroform – oktanol a zbytky semen a stonku, střední vrstva nečistoty, jako například proteiny, a vrchní vrstva obsahuje DNA. Vrchní vrstva s DNA byla odpipetována a dále zpracována.

#### 4.3.1.2 Separace DNA

DNA byla z homogenátu izolována pomocí magnetických částic (4.2.2). Částice s navázanou DNA byly následně separovány pomocí magnetického separátoru (4.2.2.1).

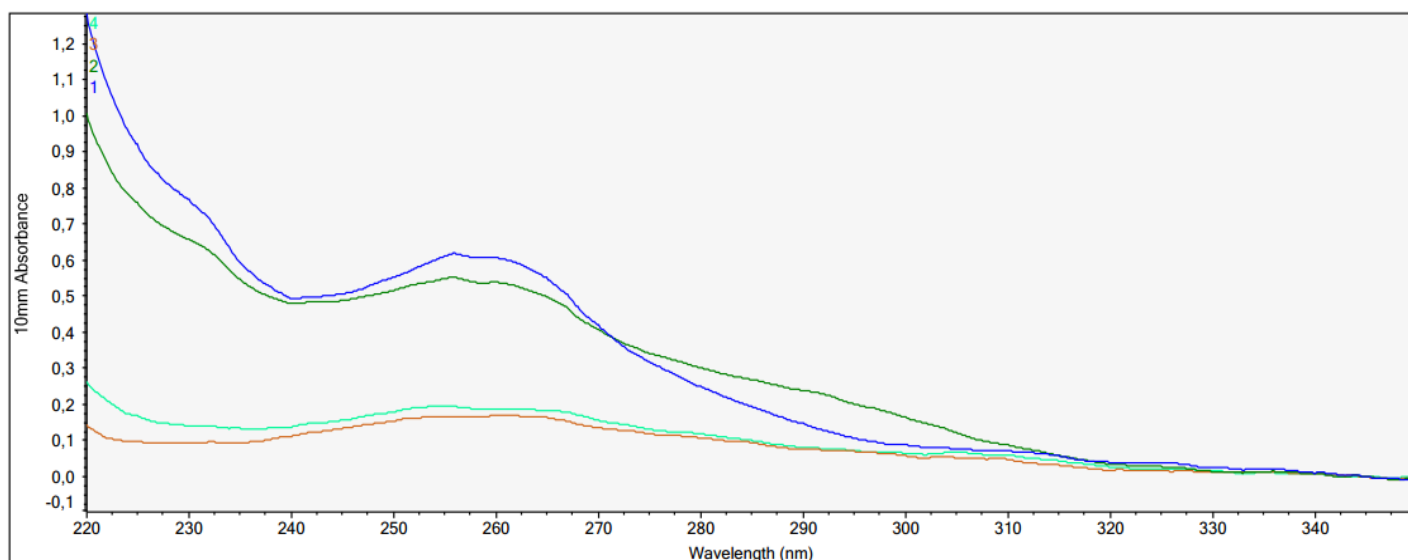
#### 4.3.1.3 Koncentrace DNA

Koncentrace DNA byla stanovena spektrofotometricky (4.2.3) pro DNA izolovanou ve čtyřech opakováních ze semen rajčete a ze stonku rajčete. Koncentrace DNA byla měřena 15 minut po eluci. Výsledky jsou uvedené v tabulce 7 a graficky znázorněné na obrázcích 6 a 7.

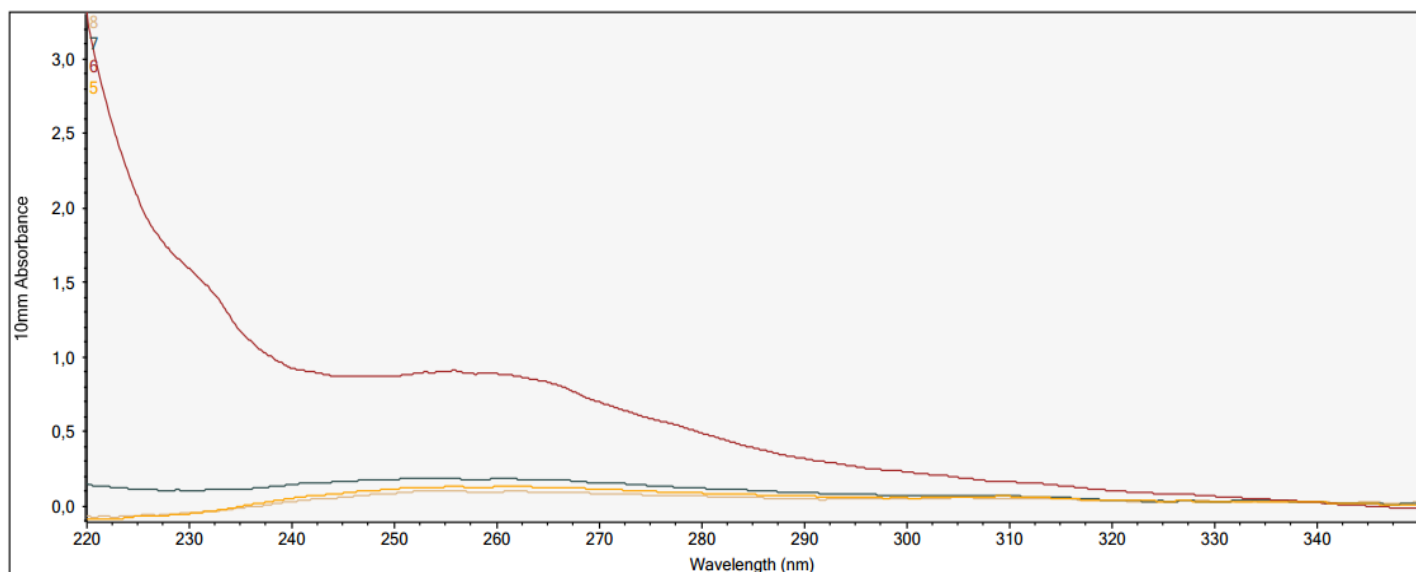
Tabulka 7: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované ze semen rajčete a ze stonku rajčete

DNA izolovaná ze semen rajčete					
$m_{\text{navážky}}$ (g)	$c$ (ng/ $\mu$ l)	$A_{260}$	$A_{280}$	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
0,11	30,0	0,599	0,239	2,50	0,79
0,12	26,5	0,530	0,293	1,81	0,82
0,11	8,0	0,159	0,098	1,63	1,91
0,10	8,9	0,179	0,109	1,65	1,36
DNA izolovaná ze stonku rajčete					
$m_{\text{navážky}}$ (g)	$c$ (ng/ $\mu$ l)	$A_{260}$	$A_{280}$	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
0,11	5,2	0,104	0,061	1,70	-
0,12	43,3	0,866	0,468	1,85	0,55
0,11	7,9	0,157	0,094	1,68	1,95
0,10	3,5	0,071	0,041	1,71	-

Obrázek 6: Závislost absorpance DNA ze semen rajčete na vlnové délce



Obrázek 7: Závislost absorbance DNA ze stonku rajčete na vlnové délce



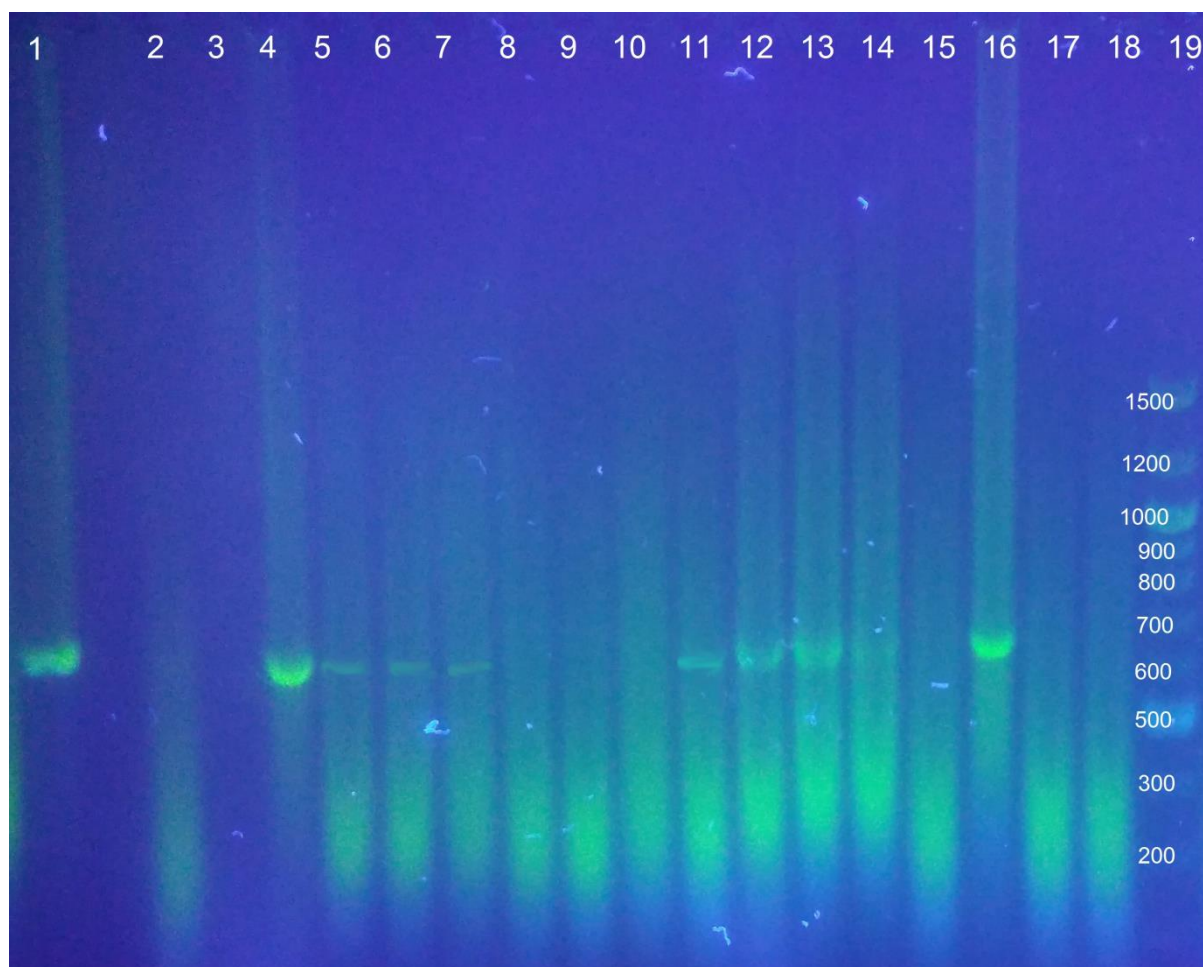
DNA byla izolována v malé koncentraci. U semen to bylo 8,0 - 30,0 ng/μl a u stonku 3,5 – 3,3 ng/μl. DNA byla znečištěna.

#### 4.3.1.4 PCR

DNA izolovaná ze semen a stonku rajčete byla amplifikována s primery 5.8 S for a 18 S rev v PCR del programu 700RO35, který je uveden v Tabulce 5 (4.2.5). Směs pro PCR byla připravena dle Tabulky 2 varianta 1. Amplifikace byla provedena i s 10× zředěnou DNA. Výsledky detekce produktů PCR jsou uvedeny na Obrázku 8.



Obrázek 8: Agarozová gelová elektroforéza produktů PCR o 700 bp. Amplifikována byla DNA izolovaná ze semen a stonku rajčete s primery 5.8S for a 18S rev



Běh	DNA	Ředění	DNA (ng/PCR směs)	Produkt PCR
1	pozitivní kontrola	-	0,05	+++
2	negativní kontrola	-	-	-
3	semena	-	30,00	-
4			26,50	+++
5			8,00	+
6			8,90	+
7	semena	10×	-	+
8			-	-
9			-	-
10			-	-
11	stonek	-	5,20	+
12			43,30	++
13			7,90	++
14			3,50	+
15	stonek	10×	-	-
16			-	+++
17			-	-
18			-	-
19	standard			

Detekce produktu je označena symbolem + a nedetekovaný produkt symbolem -. Intenzita detekovaného produktu je znázorněna množstvím daného znaku.

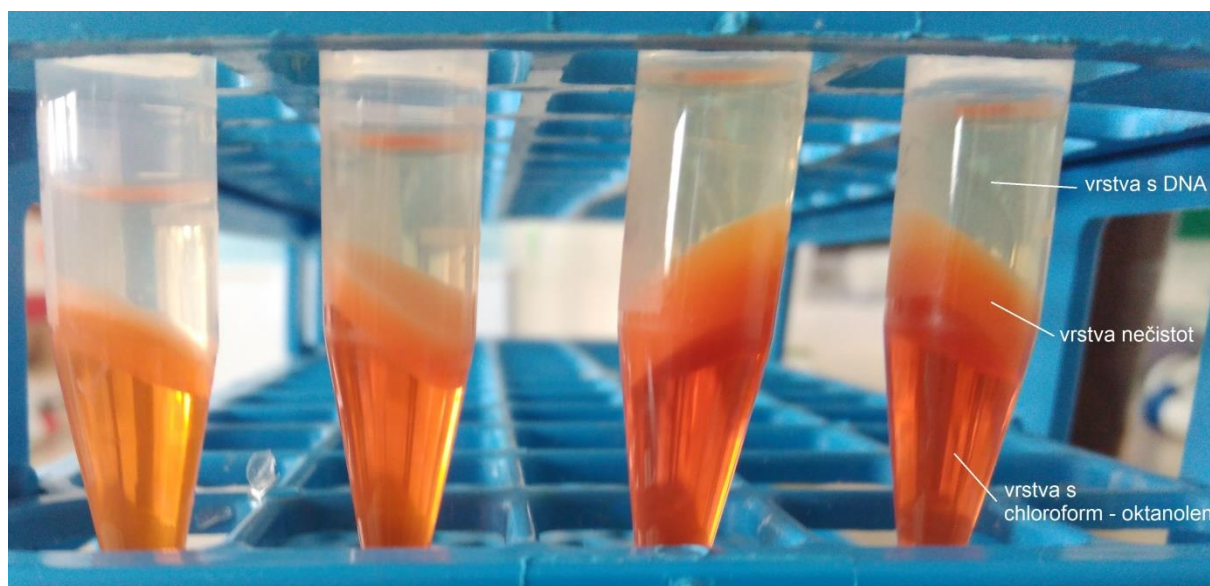
Produkty PCR různé intenzity byly detekovány po amplifikaci DNA izolované ze semen a stonku rajčete.

## 4.3.2 Izolace DNA z kečupu

### 4.3.2.1 Izolace a homogenizace DNA

DNA byla izolována z různých navážek kečupu (konkrétně 0,16; 0,34; 0,52 a 0,72 g). Vzorky byly homogenizovány v CTAB pufru s merkaptoethanolem s přidavkem chloroformoktanolu (4.2.1.). Rozdělení směsi po centrifugaci je uvedeno na Obrázku 9.

Obrázek 9: Rozdělení vrstev homogenátu kečupu po centrifugaci



Směs se rozdělila na tři vrstvy. Spodní vrstva obsahuje chloroform – oktanol se zbytky vzorku, střední vrstva proteiny a vrchní vrstva obsahuje DNA.

### 4.3.2.2 Separace DNA

DNA byla z homogenátu izolována pomocí magnetických částic. Částice s navázanou DNA byly následně separovány pomocí magnetického separátoru (4.2.2.1) a magnetické jehly (4.2.2.2).

### 4.3.2.3 Koncentrace DNA

Koncentrace DNA byla stanovena spektrofotometricky (4.2.3) pro DNA izolovanou pro 4 navážky kečupu, zvláště pro DNA separovanou magnetickým separátorem a zvláště pro DNA separovanou magnetickou jehlou.

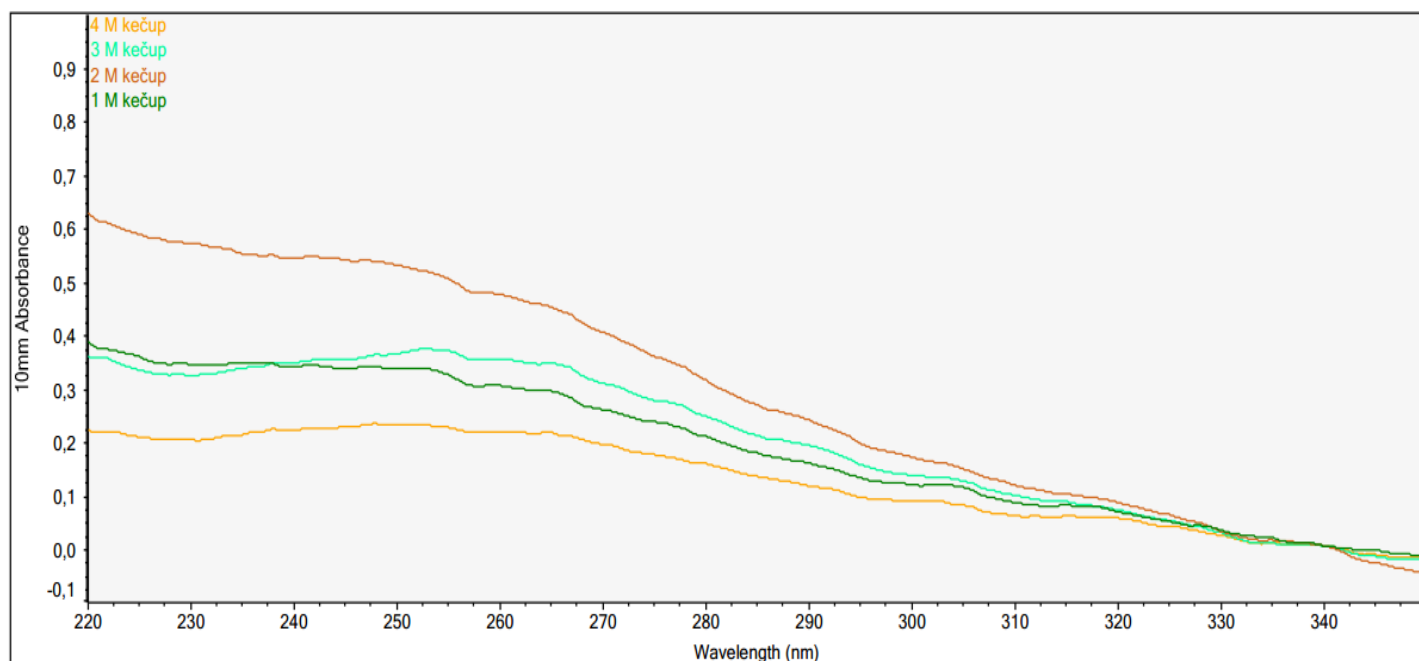
#### 4.3.2.3.1 DNA z kečupu na částicích separovaných magnetickým separátorem

Koncentrace DNA izolované pomocí magnetických mikročástic separovaných magnetickým separátorem byla měřena v různém čase po eluci. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 8 a graficky znázorněné na obrázcích 10, 11, 12.

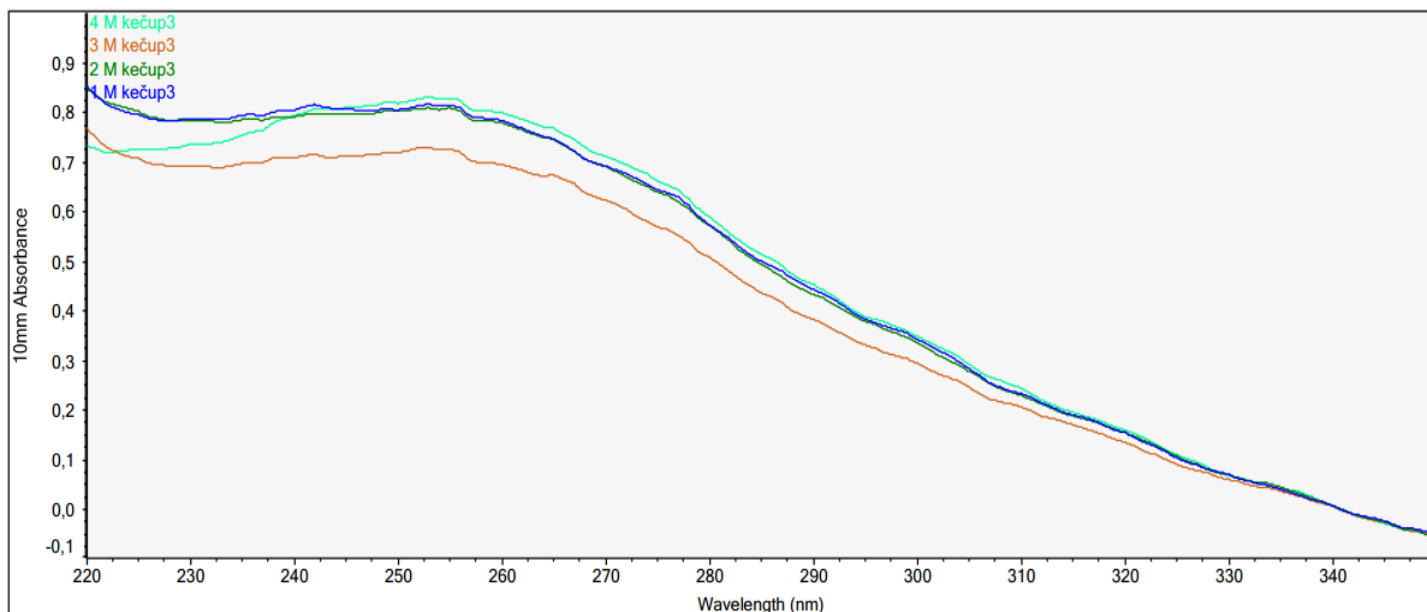
Tabulka 8: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z kečupu na částicích separovaných magnetickým separátorem ve 4 opakováních provedených v různém čase po eluci

15 minut po eluci					
m (g)	c (ng/μl)	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>
0,16	15,0	0,301	0,206	1,46	0,88
0,34	23,6	0,472	0,312	1,51	0,83
0,52	17,5	0,350	0,243	1,44	1,09
0,72	10,7	0,213	0,154	1,38	1,08
23 hodin po eluci					
m (g)	c (ng/μl)	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>
0,16	39,0	0,779	0,569	1,37	1,00
0,34	38,7	0,775	0,567	1,37	0,99
0,52	34,5	0,690	0,503	1,37	1,01
0,72	39,7	0,795	0,585	1,36	1,09
117 hodin po eluci					
m (g)	c (ng/μl)	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>
0,16	50,3	1,005	0,725	1,39	0,85
0,34	74,3	1,486	1,024	1,45	0,82
0,52	40,6	0,813	0,583	1,40	0,94
0,72	60,5	1,209	0,888	1,36	0,99

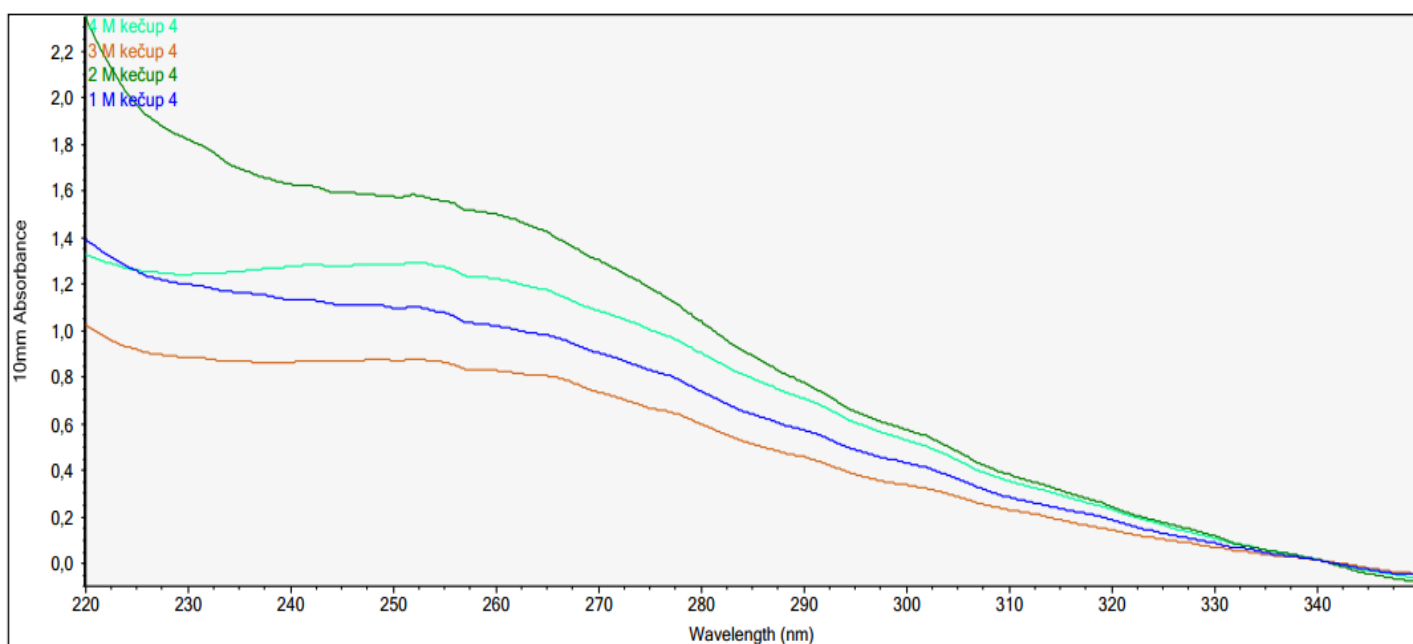
Obrázek 10: Závislost absorpance DNA na vlnové délce. Magnetické částice s DNA z kečupu byly separované magnetickým separátorem. Koncentrace DNA byla měřena 15 minut po eluci



Obrázek 11: Závislost absorpance DNA na vlnové délce. Magnetické částice s DNA z kečupu byly separované magnetickým separátorem. Koncentrace DNA byla měřena 23 hodin po eluci



Obrázek 12: Závislost absorpance DNA na vlnové délce. Magnetické částice s DNA z kečupu byly separované magnetickým separátorem. Koncentrace DNA byla měřena 117 hodin po eluci



Koncentrace DNA se zvyšovala s dobou eluce. Po dlouhodobé eluci (117 hodin) se množství eluované DNA zvyšovalo s množstvím navážky. DNA byla znečištěna.

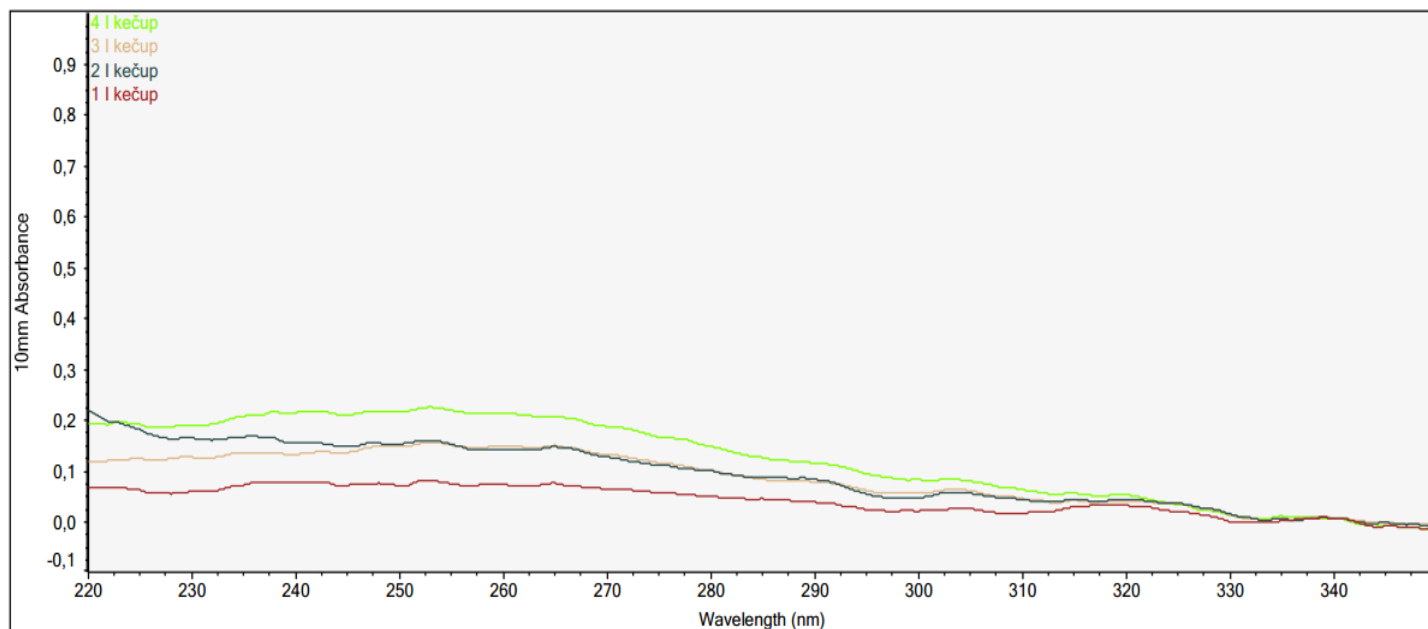
#### 4.3.2.3.2 DNA z kečupu na částicích separovaných magnetickou jehlou

Koncentrace DNA izolované pomocí magnetických mikročástic separovaných magnetickou jehlou byla měřena v různém čase po eluci. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 9 a graficky znázorněné na obrázcích 13, 14, 15.

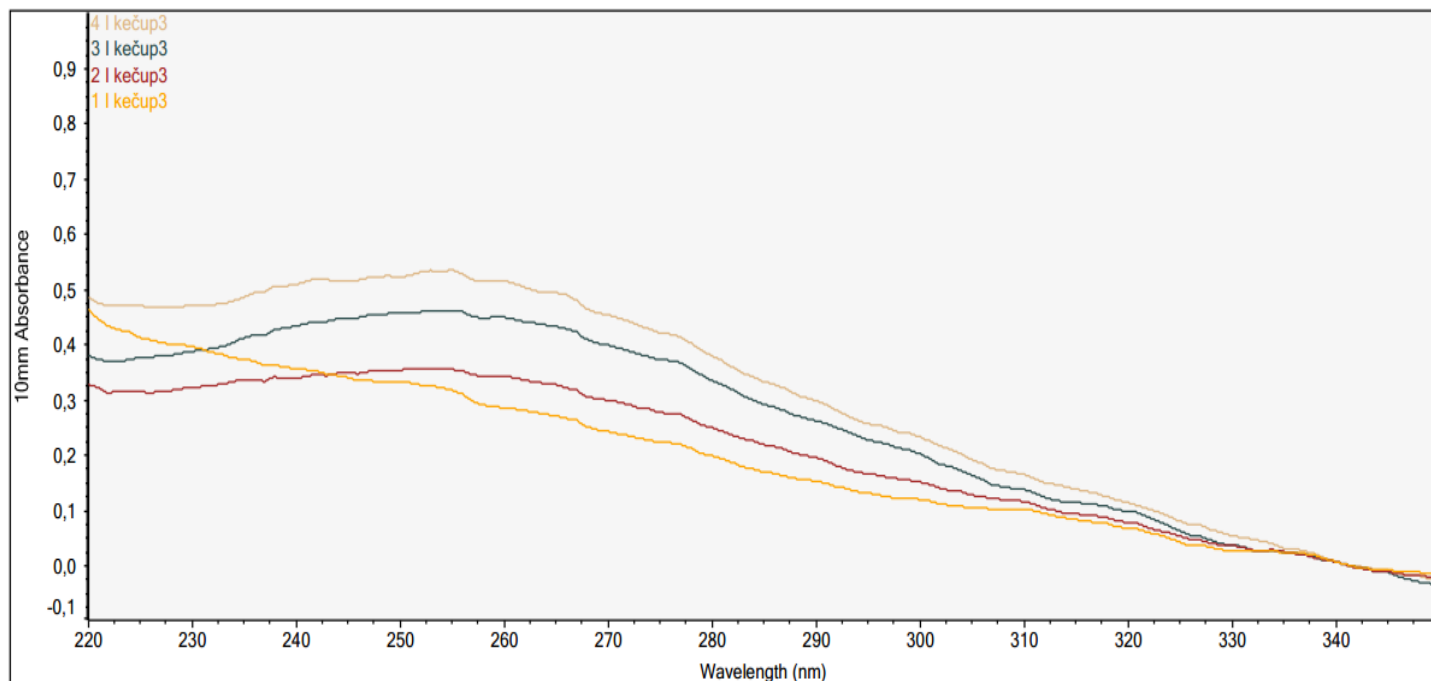
Tabulka 9: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z kečupu na částicích separovaných magnetickou jehlou ve 4 opakováních provedených v různém čase po eluci

15 minut po eluci					
m (g)	c (ng/μl)	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>
0,16	3,3	0,066	0,044	1,51	1,27
0,34	6,8	0,135	0,095	1,42	0,86
0,52	7,1	0,141	0,094	1,49	1,18
0,72	10,3	0,206	0,142	1,45	1,13
23 hodin po eluci					
m (g)	c (ng/μl)	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>
0,16	14,0	0,279	0,192	1,46	0,72
0,34	16,8	0,336	0,243	1,38	1,06
0,52	22,2	0,443	0,329	1,35	1,16
0,72	25,5	0,510	0,374	1,36	1,10
117 hodin po eluci					
m (g)	c (ng/μl)	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>
0,16	9,4	0,187	0,154	1,22	0,96
0,34	21,5	0,431	0,307	1,40	0,99
0,52	27,7	0,553	0,407	1,36	1,14
0,72	27,0	0,541	0,384	1,41	1,10

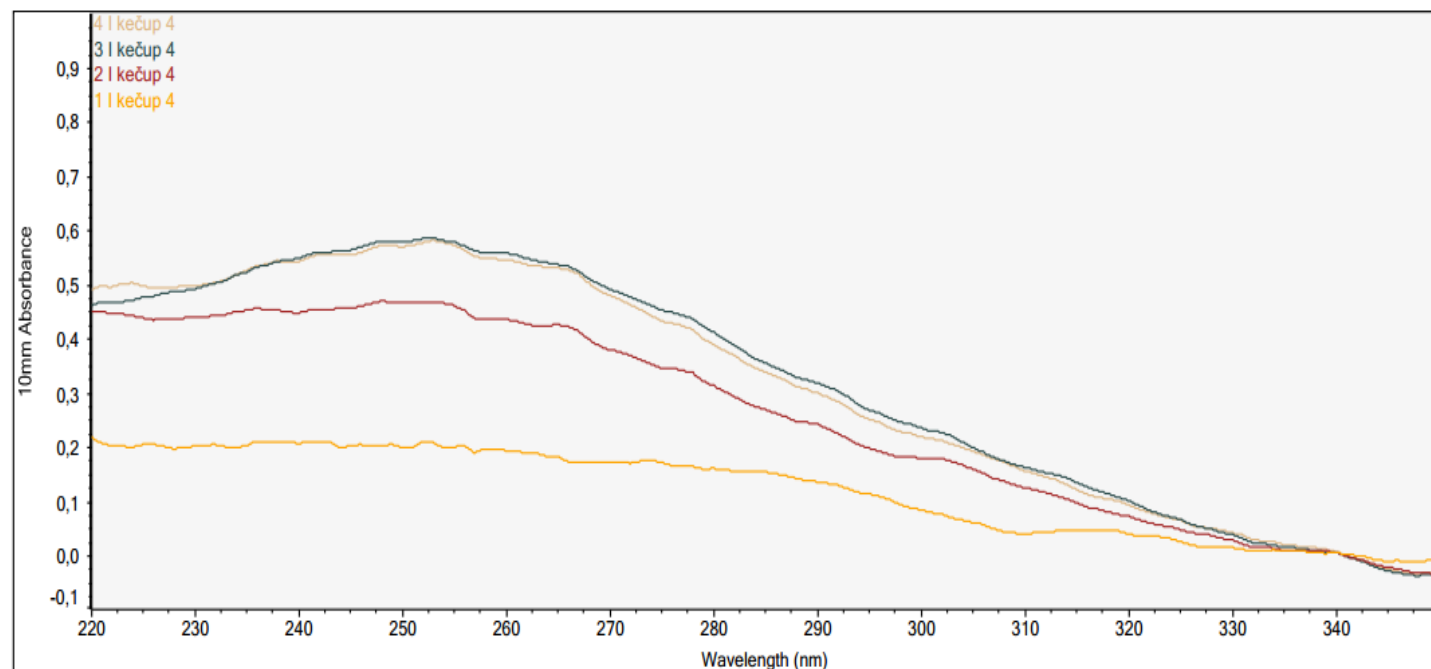
Obrázek 13: Závislost absorpance DNA na vlnové délce. Magnetické částice s DNA z kečupu byly separované magnetickou jehlou. Koncentrace DNA byla měřena 15 minut po eluci



Obrázek 14: Závislost absorpance DNA na vlnové délce. Magnetické částice s DNA z kečupu byly separované magnetickou jehlou. Koncentrace DNA byla měřena 23 hodin po eluci



Obrázek 15: Závislost absorpance DNA na vlnové délce. Magnetické částice s DNA z kečupu byly separované magnetickou jehlou. Koncentrace DNA byla měřena 117 hodin po eluci



Koncentrace DNA se zvyšovala s dobou eluce. Po dlouhodobé eluci (23 a 117 hodin) se množství eluované DNA zvyšovalo s množstvím navážky. DNA byla znečištěna.

#### 4.3.2.4 Přesrážení DNA z kečupu

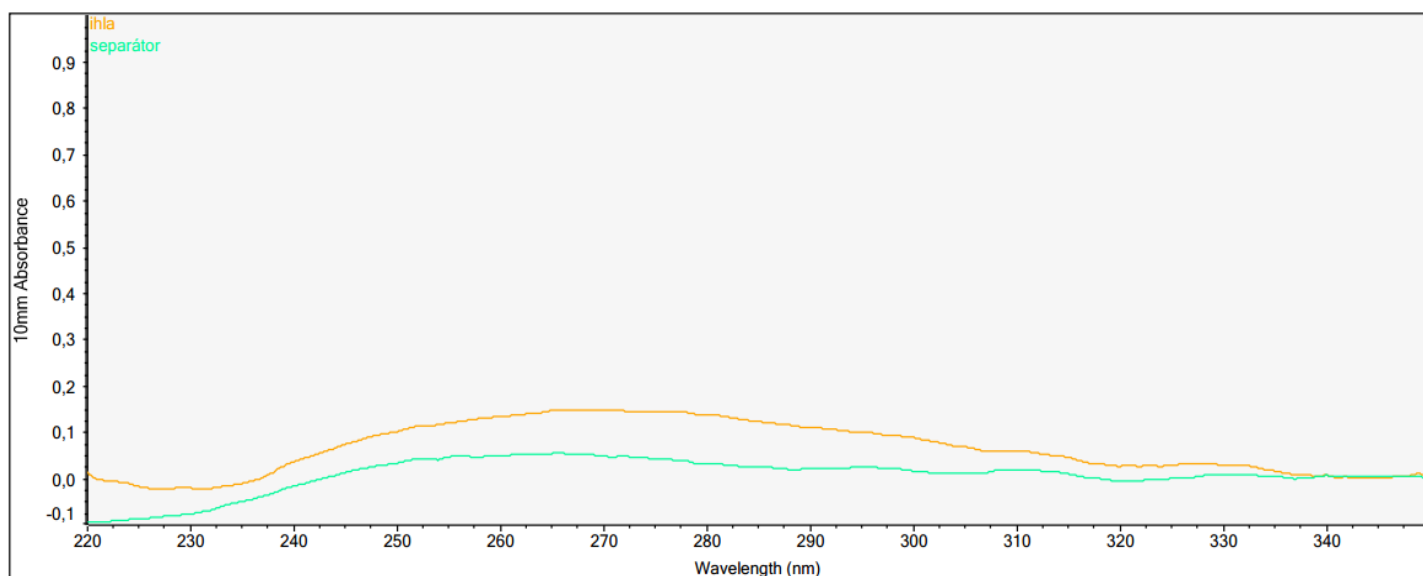
DNA izolovaná z různých navážek kečupu, zvláště pomocí magnetických částic separovaných magnetickým separátorem a magnetickou jehlou, byla spojena do jedné zkumavky a přečištěna srážením ethanolem (4.2.4).

Změřená koncentrace a čistota přečištěné DNA je uvedena v Tabulce 10 a graficky znázorněna a Obrázku 16.

Tabulka 10: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty přečištěné DNA z kečupu

typ separace částic s DNA	c (ng/μl)	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260/280</sub>
separátor	2,1	0,042	0,024	1,73
jehla	6,3	0,126	0,131	0,96

Obrázek 16: Závislost absorbance přečištěné DNA z kečupu na vlnové délce



Koncentrace DNA se přesrážením snížila. Čistší DNA byla izolována s využitím magnetického separátoru ( $A_{260}/A_{280} = 1,73$ ).

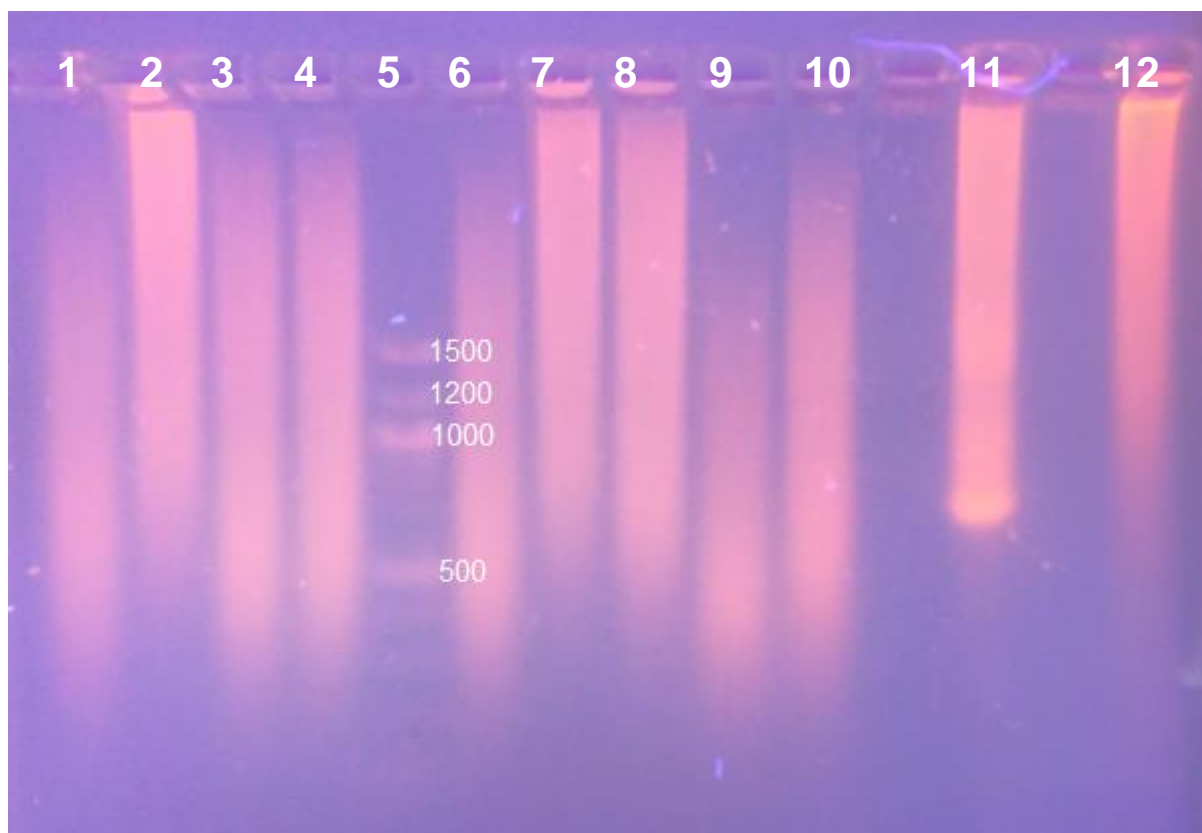
#### 4.3.2.5 PCR

DNA izolovaná z kečupu bez přečištění a s přečištěním byla amplifikována v PCR s dvěma sadami primerů.

##### 4.3.2.5.1 Detekce produktů PCR o velikosti 700 bp

DNA izolovaná z různých navážek kečupu byla amplifikována v PCR dle programu ROST700, který je uveden v Tabulce 4 (4.2.5). Směs pro PCR byla připravena dle Tabulky 2 varianta 2. Výsledky detekce PCR produktů jsou uvedeny na Obrázku 17.

Obrázek 17: Agarozová gelová elektroforéza produktů PCR (700 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná z kečupu magnetickými částicemi. Magnetické částice byly separovány magnetickou jehlou a magnetickým separátorem.



Běh	DNA/ separace magnetických částic	Ředění	DNA (ng/PCR směs)	Produkt PCR
1	jehla	10×	1,88	-
2			4,30	-
3			5,54	-
4			5,40	-
5	standard			
6	jehla	10×	1,88	-
7	separátor	10×	10,06	-
8			14,86	-
9			8,12	-
10			12,10	-
11	pozitivní kontrola	-	2,00	+++
12	negativní kontrola	-	-	-

Detekce produktu je označena symbolem + a nedetekovaný produkt symbolem -. Intenzita detekovaného produktu je znázorněna množstvím daného znaku.

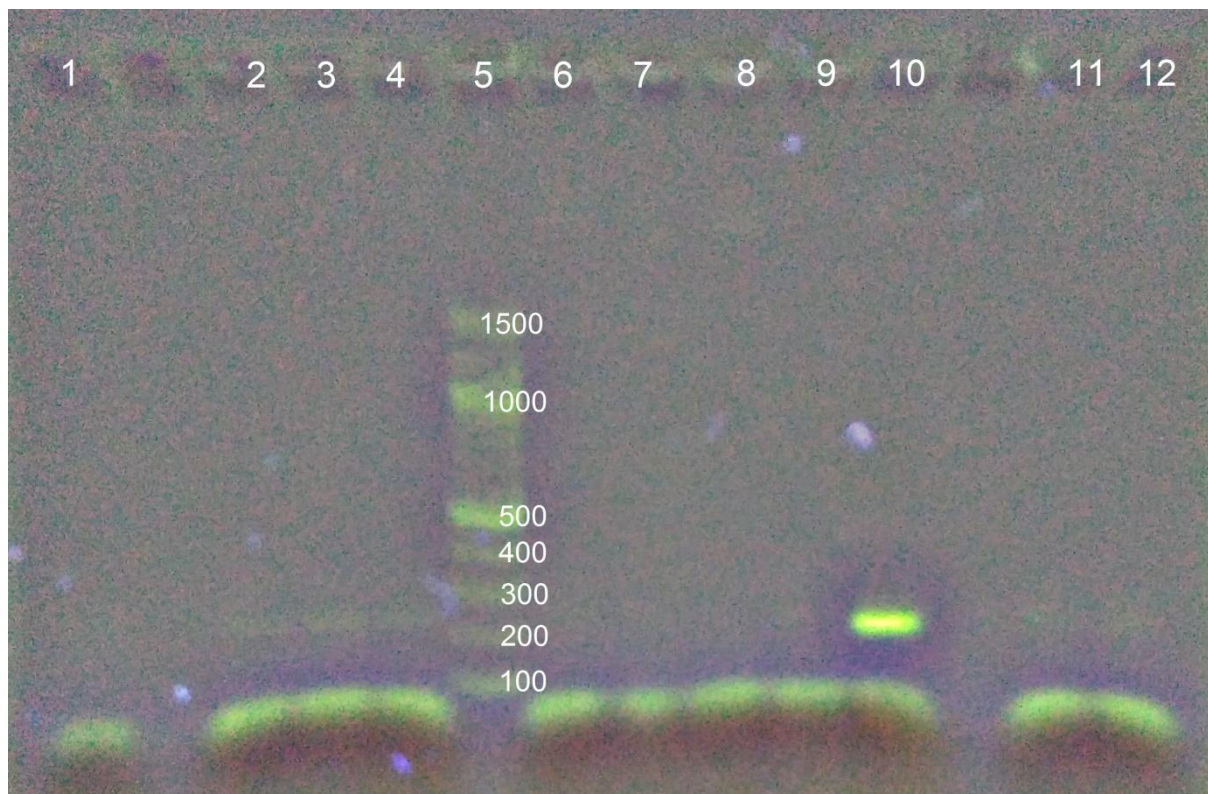
Agarozovou gelovou elektroforézou nebyly detekovány produkty PCR, pravděpodobně z důvodu degradace DNA kečupu. Výjimkou byla pozitivní kontrola.



#### 4.3.2.5.2 Detekce produktů PCR o velikosti 200 bp

DNA izolovaná z různých navážek kečupu byla amplifikována v PCR dle programu 220RO40, který je uveden v Tabulce 6 (4.2.5). Směs pro PCR byla připravena dle Tabulky 3 varianta 1. Výsledky detekce PCR produktů jsou uvedeny na Obrázku 18.

*Obrázek 18: Agarozová gelová elektroforéza produktů PCR (200 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná z kečupu magnetickými částicemi. Magnetické částice byly separovány magnetickou jehlou a magnetickým separátorem.*



Běh	DNA/ separace magnetických částic	Ředění	DNA (ng/PCR směs)	Produkt PCR
1	jehla	10×	1,88	-
2			4,30	+
3			5,54	+
4			5,40	+
5	standard			
6	separátor	10×	10,06	-
7			14,86	-
8			8,12	-
9			12,10	-
10	pozitivní kontrola	-	2,00	+++
11	negativní kontrola	-	-	-
12	negativní kontrola	-	-	-

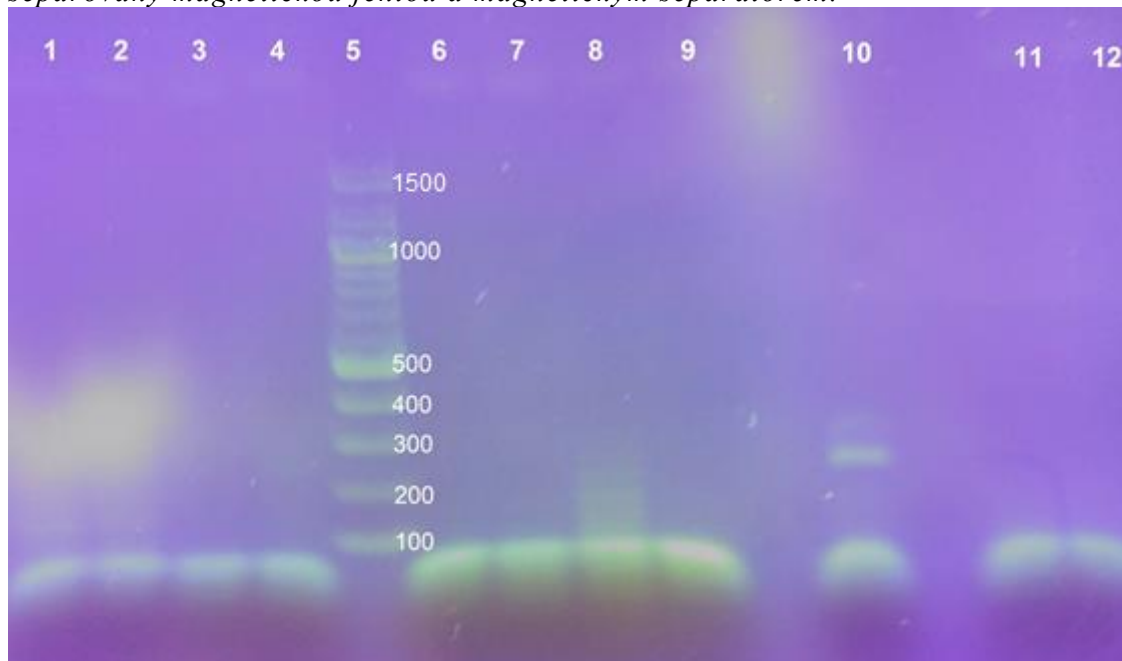
*Detekce produktu je označena symbolem + a nedetekovaný produkt symbolem -. Intenzita detekovaného produktu je znázorněna množstvím daného znaku.*

Agarozovou gelovou elektroforezou byly detekovány slabé produkty PCR, po amplifikaci DNA na magnetických částicích separovaných magnetickou jehlou. Pro docílení intenzivnější detekce produktů PCR byla PCR směs optimalizována.

#### 4.3.2.5.2.1 Optimalizace PCR směsi 1

DNA izolovaná z různých navážek kečupu byla amplifikována v PCR dle programu 220RO40, který je uveden v Tabulce 6 (4.2.5). Směs pro PCR byla připravena dle Tabulky 3 varianta 2. Byla upravena množství jednotlivých komponent PCR směsi. Výsledky detekce produktů PCR jsou uvedeny na Obrázku 19.

Obrázek 19: Agarozová gelová elektroforéza produktů PCR (200 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná z kečupu magnetickými částicemi. Magnetické částice byly separovány magnetickou jehlou a magnetickým separátorem.



Běh	DNA/ separace magnetických částic	Ředění	DNA (ng/PCR směs)	Produkt PCR
1	separátor	10×	10,06	-
2			14,86	-
3			8,12	-
4			12,10	-
5	standard			
6	jehla	10×	1,88	-
7			4,30	-
8			5,54	+
9			5,40	-
10	pozitivní kontrola	-	2,00	++
11	negativní kontrola	-	-	-
12	negativní kontrola	-	-	-

Detekce produktu je označena symbolem + a nedetekovaný produkt symbolem -. Intenzita detekovaného produktu je znázorněna množstvím daného znaku.

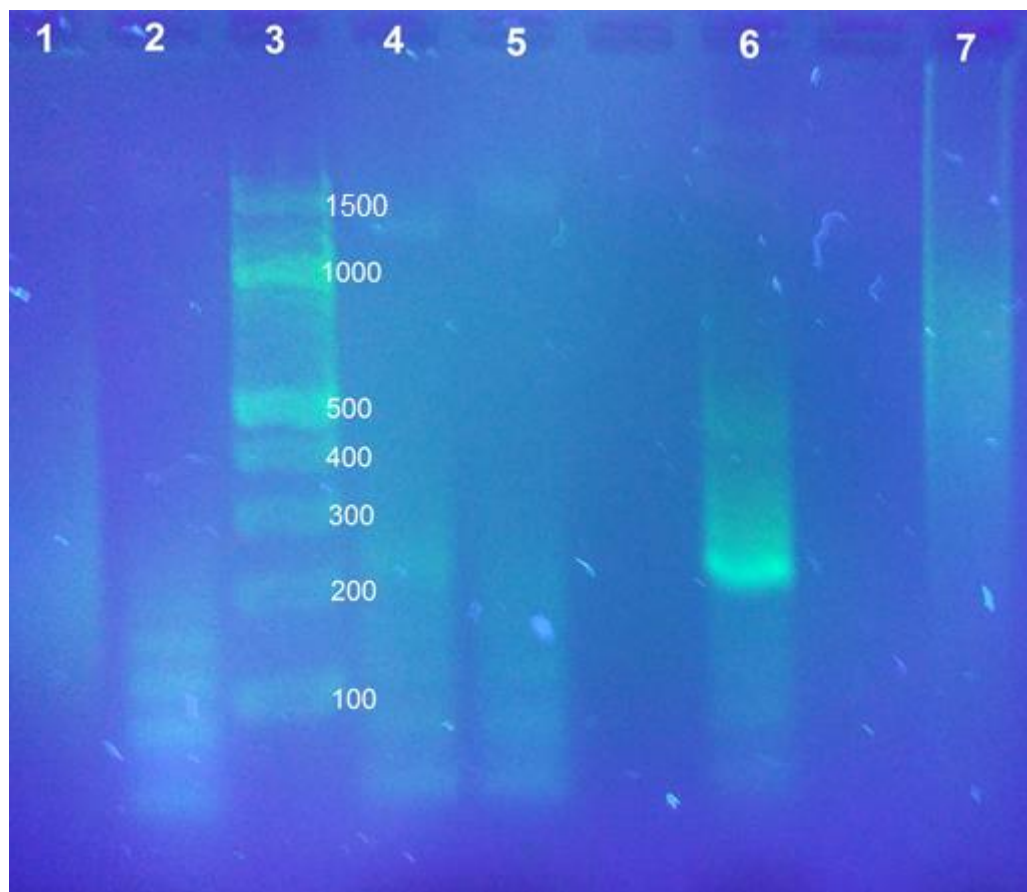
Agarozovou gelovou elektroforezou byl slabě detekován produkt PCR po amplifikaci DNA izolované magnetickými částicemi separovými magnetickou jehlou.

#### 4.3.2.5.2.2 Optimalizace PCR směsi 2

DNA izolovaná z různých navážek kečupu byla amplifikována v PCR dle programu 220RO40, který je uveden v Tabulce 6 (4.2.5). Směs pro PCR byla připravena dle Tabulky 3

varianta 3. Byla upravena množství jednotlivých komponent PCR směsi. Amplifikace byla provedena pouze pro DNA na magnetických částicích separovanou magnetickou jehlou. Výsledky detekce produktů PCR jsou uvedeny na Obrázku 20.

Obrázek 20: Agarozová gelová elektroforéza produktů PCR (200 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná z kečupu magnetickými částicemi. Magnetické částice byly separovány magnetickou jehlou.



Běh	DNA/ separace magnetických částic	Ředění	DNA (ng/PCR směs)	Produkt PCR
1	jehla	10×	3,76	-
2			6,45	-
3	standard			
4	jehla	10×	11,08	+
5			8,10	-
6	pozitivní kontrola		2,00	+++
7	negativní kontrola		-	-

Detekce produktu je označena symbolem + a nedetekovaný produkt symbolem -. Intenzita detekovaného produktu je znázorněna množstvím daného znaku.

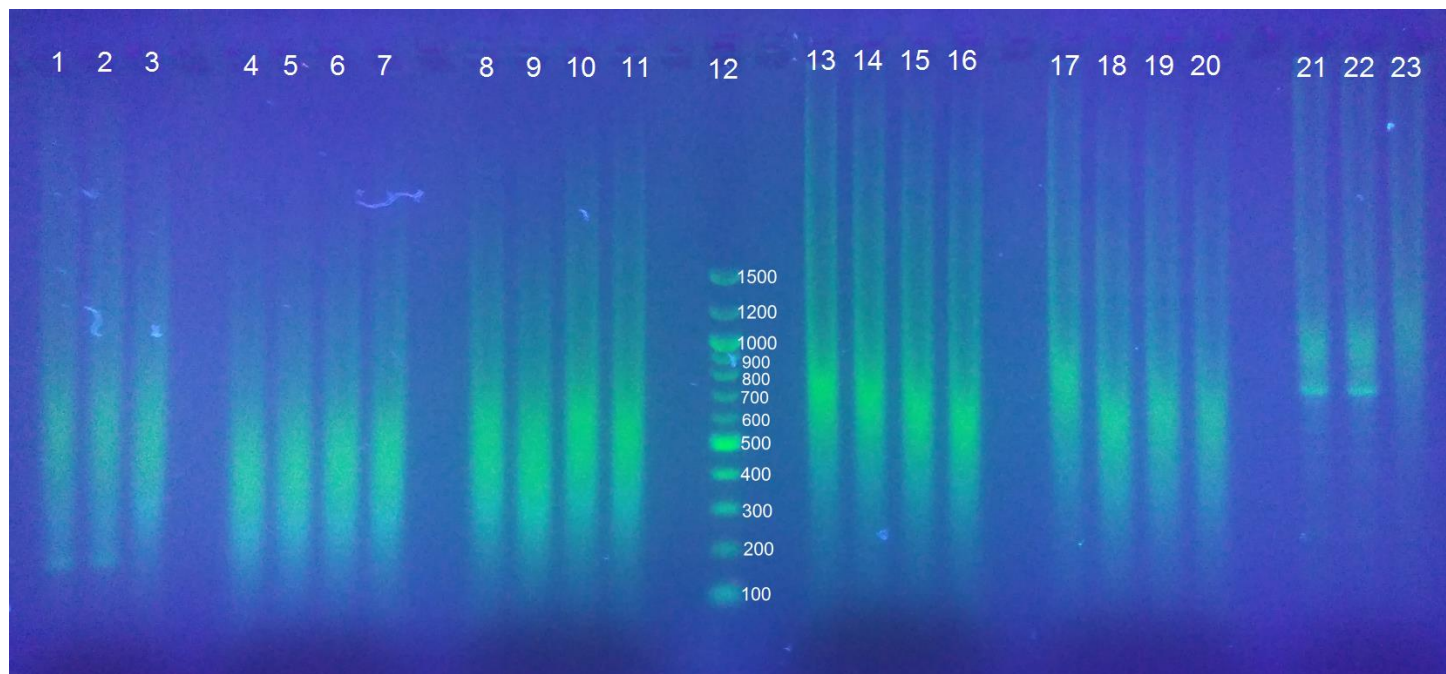
Agarozovou gelovou elektroforezou byl slabě detekován produkt PCR po amplifikaci DNA izolovaná magnetickými částicemi separovanými magnetickou jehlou.

#### 4.3.2.5.3 Přesrážená DNA

Přesrážená DNA z kečupu byla amplifikována v PCR dle programů ROST700 a 220RO40, které jsou uvedeny v Tabulce 5 a Tabulce 6 (4.2.5). Směs pro PCR amplifikovanou programem ROST700 byla připravena dle Tabulky 2 varianta 2. Směs pro PCR

amplifikovanou programem 220RO40 byla připravena dle Tabulky 3 varianta 1. Výsledky detekce PCR produktů jsou uvedeny na Obrázku 21.

Obrázek 21: Agarozová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti 700 bp a 200 bp. DNA byla izolovaná z kečupu a přečištěna ethanolem. Magnetické částice byly separovány magnetickou jehlou a magnetickým separátorem.



Běh	DNA/ separace magnetických částic	Ředění	DNA (ng/PCR směs)	Velikost PCR produktů (bp)	Produkt PCR
1	pozitivní kontrola	-	2	200	+
2	pozitivní kontrola				+
3	negativní kontrola	-	-	200	-
4	separátor	-	4,2	200	-
5					-
6	separátor	10×	-	200	-
7					-
8	jehla	-	12,6	200	-
9					-
10	jehla	10×	-	200	-
11					-
12	standard				
13	separátor	-	4,2	700	-
14					-
15	separátor	10×	-	700	-
16					-
17	jehla	-	12,6	700	-
18					-
19	jehla	10×	-	700	-
20					-
21	pozitivní kontrola	-	2	700	++
22	pozitivní kontrola				++
23	negativní kontrola	-	-	700	-

*Detekce produktu je označena symbolem + a nedetekovaný produkt symbolem -. Intenzita detekovaného produktu je znázorněna množstvím daného znaku.*

Agarozovou gelovou elektroforezou nebyly detekovány produkty PCR po amplifikaci přesrážené DNA izolované z kečupu (s 1 výjimkou). Detegovány byly amplikony pozitivní kontroly. Metodu je potřeba dále optimalizovat.

## **4.4 Diskuze**

### **4.4.1 Izolace DNA z rajčete a rajčatového výrobku**

Jako vzorek nám sloužil plod rajčete, konkrétně semena ze středu plodu a zelený stoněk rajčete. Dále byl analyzován komerční kečup Hellmann's. Vzorky byly homogenizovány pomocí CTAB pufru a následně byla DNA izolována pomocí magnetických částic P(HEMA-co-GMA). Tato metoda izolace DNA byla již dříve ukázaná jako vhodná pro izolaci DNA v kvalitě pro PCR.

Částice s navázanou DNA byly od zbytku směsi odseparovány buď magnetickým separátorem nebo magnetickou jehlou. Tímto krokem jsme se zbavili případných inhibitorů PCR, které zůstaly ve směsi. Separace magnetickým separátorem je na obsluhu jednodušší, avšak tím, že magnetické částice s navázanou DNA zůstávají ve stejné eppendorfové zkumavce může být DNA více kontaminována, protože inhibitory můžou ulpět na stěně zkumavky.

Separace magnetickou jehlou je náročnější, ale tím že jsou magnetické částice s navázanou DNA přenášeny na špičce jehly do druhé eppendorfové zkumavky můžeme dosáhnout větší čistoty. Bohužel v tomhle kroku dochází i k ztrátám DNA, protože je obtížné přenést všechny magnetické částice s DNA do nové zkumavky.

### **4.4.2 Stanovení koncentrace a čistoty DNA**

Koncentrace byla měřena spektrofotometricky při vlnové délce 230 - 320 nm. DNA absorbuje při 260 nm, proteiny při 280 nm, polyfenoly a polysacharidy při 230 nm, proto na základě poměrů absorbancí 260/280 a 260/230 můžeme určit čistotu DNA. Pokud máme čistou DNA, tak poměr absorbancí 260/280 je 1,8 a poměr absorbancí 260/230 je větší jako 1.

Nejvíce DNA jak ze semen, tak ze stonku rajčete bylo izolované z navážky 0,12g. Tato navážka byla taky nejvhodnější pro amplifikaci v PCR. DNA je kontaminovaná proteiny a dále polysacharidy a polyfenoly, avšak byla izolována v dostatečném množství pro PCR. Koncentrace DNA izolované ze stonku rajčete je téměř dvojnásobná, jako je to v případě semen z plodu rajčete.

DNA z kečupu izolovaná pomocí magnetických částic separovaných magnetickým separátorem byla izolovaná v dostatečném množství ze všech navážek. Nejvhodnější pro amplifikaci byla navážka 0,34 g. DNA byla izolovaná v největším množství. Poměr  $A_{260/280}$  byl největší (1,45) a poměr  $A_{260/230}$  byl dostačující (0,82). V důsledku vysoké koncentrace bylo možné DNA naředit. Lze předpokládat, že zároveň s DNA se ředili i inhibitory PCR.

DNA z kečupu izolovaná pomocí magnetických částic separovaných magnetickou jehlou byla ze všech navážek izolovaná v dostatečném množství. Nejvhodnější pro amplifikaci byla navážka 0,72 g. DNA byla izolovaná v největším množství. Poměr  $A_{260/280}$  (1,41) a  $A_{260/230}$  (1,10) byl největší ze všech navážek.

Koncentrace DNA izolované pomocí magnetických částic separovaných magnetickou jehlou byla nižší než v případě magnetického separátoru a pravděpodobně méně znečištěna proteiny a polyfenoly, protože se lépe amplifikovala v PCR.

Koncentrace byla měřena v různém čase eluce. Čím déle byla DNA eluována, tím větší koncentrace byla naměřena. Doba 15 minut je však dostačující.

Koncentrace přečištěné DNA byla velmi nízká a její čistota se nezlepšila ani v případě částic separovaných magnetickým separátorem ani částic separovaných magnetickou jehlou.

#### **4.4.3 Amplifikace v PCR**

DNA byla amplifikována dvěma sadami primerů 5.8 S for a 18 S rev (pro 700 bp) a 26 S for a 26 S rev (pro 200 bp). Produkty PCR byly následně detekovány agarózovou gelovou elektroforézou.

##### **4.4.3.1 Rajče**

DNA byla izolována z rajčete a amplifikována podle programu 700RO35. Produkty PCR byly podrobeny elektroforéze (Obrázek 16).

DNA izolovaná z první navážky semen se neamplifikovala, z čehož usuzujeme, že vzorek DNA je znečištěn. Desetkrát zředěná DNA (běh 8) po amplifikaci poskytla slabý pozitivní produkt PCR. DNA izolovaná z druhé navážky semen poskytla po amplifikaci produkt PCR, který byl detekován. Jako desetkrát zředěná DNA (běh 9) se neamplifikovala. DNA izolovaná z navážek semen 3 a 4 se slabě amplifikovala a kvůli nízké koncentraci nebyly detekovány produkty PCR desetkrát zředěné DNA (běh 10, 11).

DNA izolovaná z první a čtvrté navážky stonku rajčete se amplifikovala a byl detekován slabý produkt PCR, pravděpodobně z důvodu znečištění. DNA izolovaná z druhé a třetí navážky stonku rajčete se amplifikovala a byl detekován poměrně intenzivní produkt PCR. Po amplifikaci 10× zředěné DNA nebyly detekovány produkty PCR, protože koncentrace DNA byla nízká. Výjimkou byla pouze DNA izolovaná z druhé navážky stonku rajčete, protože její koncentrace byla vyšší.

##### **4.4.3.2 Kečup**

DNA izolována z kečupu, která byla amplifikována dle programu ROST700, neposkytla PCR produkt, který by mohl být detekován, pravděpodobně z důvodu degradace DNA v důsledku tepelného zpracování kečupu. Z tohoto důvodu jsme se pokusili o amplifikaci kratšího úseku DNA 200 bp. DNA byla amplifikována dle programu 220RO40 a různém složení PCR směsi. Výsledek elektroforézy při prvním složení směsi je zobrazen na Obrázku 18. Zde byly velmi slabě detekovány produkty PCR po amplifikaci DNA izolované pomocí magnetických částic separovaných magnetickou jehlou (navážky 2, 3 a 4). Produkt PCR po amplifikaci DNA z navážky 1 nebyl detekován pravděpodobně z důvodu nízké koncentrace. DNA izolovaná pomocí magnetických částic separovaných magnetickým separátorem se neamplifikovala, pravděpodobně kvůli znečištění a degradaci DNA.

PCR směs byla následně upravena dvakrát a výsledky elektroforézy produktů PCR můžeme vidět na Obrázcích 19 a 20. Úprava směsi nebyla velmi vhodná, protože požadovaný produkt PCR nebyl detekován intenzivněji, jako bylo zamýšleno, právě naopak, nebyl detekován téměř vůbec.

Přečištění DNA taktéž nebylo řešením našeho problému. Je potřeba dále optimalizovat izolaci DNA, případně směs pro PCR a podmínky amplifikace, aby bylo možné detekovat požadovaný produkt PCR.

PCR je technika velmi citlivá na inhibitory, proto je její zvládnutí náročné. Při DNA izolované přímo z rajčete jsme obdrželi uspokojivé výsledky. Při DNA izolované z kečupu byly výsledky neuspokojivé. Výrobní proces kečupu obsahuje zahřátí, co způsobilo degradaci DNA, kterou je teď velmi náročné detekovat. Bylo provedeno několik pokusů detekce produktů PCR, při kterých se měnilo složení PCR směsi avšak ani jeden z pokusů nebyl úspěšný. Je potřeba více prostoru a další optimalizace pro dosažení uspokojivých výsledků.

## **5 Závěr**

V teoretické části bylo pojednáno o autenticitě potravin a využití PCR k jejich stanovení.

Cílem praktické části práce bylo zvládnout izolaci DNA v čistotě pro PCR a její následnou amplifikaci v PCR s primery specifickými pro rostlinnou rDNA. Byla porovnána amplifikovatelnost DNA izolované z výrobku pomocí magnetických částic separovaných jehlou a separátorem.

Agarozovou gelovou elektroforézou byly detekovány produkty PCR po amplifikaci DNA izolované z kečupu pomocí magnetických částic separovaných jehlou na rozdíl od magnetického separátoru. Byly detegovány produkty PCR délky 200 bp a to jen v některých případech, pravděpodobně z důvodu degradace DNA. Metodu je potřeba dále optimalizovat.

## 6 Zdroje

- [1] LEES, Michèle. *Food authenticity and traceability*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2003. ISBN 978-1-85573-526-2.
- [2] ASHURST a DENNIS. *Food Authentication*. Boston, MA: Springer US, 1997. ISBN 978-146-1311-195.
- [3] VEČERKOVÁ, Hana. Slunečnicové oleje. *Mladá fronta DNES* [online]. 2013, , 3 [cit. 2018-05-22]. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/clanek/slunecnicove-oleje.aspx?q=Y2hudW09MQ%3d%3d>
- [4] MAFRA, Isabel, Isabel M. P. L. V. O. FERREIRA a M. Beatriz P. P. OLIVEIRA. Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology*. 2008, **227**(3), 649-665. DOI: 10.1007/s00217-007-0782-x. ISSN 1438-2377. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-007-0782-x>
- [5] *Food traceability and authenticity* [online]. Praha, 2017 [cit. 2018-05-22]. Dostupné z: <https://ukp.vscht.cz/files/uzel/0037557/0001~~c8vPT1EoKUpMTk1MyszJLKIUSMxLUUgsLclIzSvJTAYJ6CqUHulNTco7vFahJLWiBAA.pdf?redirected>. Vysoká škola chemicko - technologická v Praze.
- [6] LEHKOŽIVOVÁ, Jarmila, Jolana KAROVIČOVÁ a Zlatica KOHAJDOVÁ. The Quality and Authenticity Markers of Tomato Ketchup. *Acta Chimica Slovaca*. 2009, **2**(2), 88 - 96.
- [7] GAIKWAD, Ambika B. *DNA extraction: Comparison of methodologies* [online]. , 1 - 6 [cit. 2018-05-22]. Dostupné z: [http://www.nbprg.ernet.in/Portals/6/DMX/GENOMIC\\_RESOURCES/DNA%20extraction-Comparison%20of%20methodologies.pdf](http://www.nbprg.ernet.in/Portals/6/DMX/GENOMIC_RESOURCES/DNA%20extraction-Comparison%20of%20methodologies.pdf)
- [8] AZMAT, Muhammad Abubakkar, Iqrar Ahmad KHAN, Hafiza Masooma Naseer CHEEMA, Ishtiaq Ahmad RAJWANA, Ahmad Sattar KHAN a Asif Ali KHAN. Extraction of DNA suitable for PCR applications from mature leaves of *Mangifera indica* L. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 2012, **13**(4), 239-243. DOI: 10.1631/jzus.B1100194. ISSN 1673-1581. Dostupné také z: <http://www.springerlink.com/index/10.1631/jzus.B1100194>
- [9] BERENSMEIER, Sonja. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, **73**(3), 495-504. DOI: 10.1007/s00253-006-0675-0. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-006-0675-0>
- [10] Detection Methods Basics. *CropLife International* [online]. CropLife International, 2018 [cit. 2018-05-24]. Dostupné z: <http://www.detection-methods.com/detection-methods-basics/>
- [11] LOCKLEY, A.K a R.G BARDSLEY. *DNA-based methods for food authentication*. 2000, **11**(2), 67-77. DOI: 10.1016/S0924-2244(00)00049-2. ISSN 09242244. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224400000492>
- [12] MICHALOVÁ a ZEMANOVÁ. Klasická a molekulární cytogenetika v klinické praxi. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2005, **2005**(2), 63 - 67 [cit. 2018-05-22]. Dostupné z: <http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/KBM0502-63.pdf>
- [13] VILČEK, Štefan. Molekulárno-genetické metódy detekcie mikroorganizmov. *Vesmír* [online]. 1995, **1995**(3) [cit. 2018-05-22]. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/1995/cislo-3/molekularno-geneticke-metody-detekcie-mikroorganizmov.html>
- [14] Main-qimg-9242213f1a7a1d7e574ee68c2ad3ab06-c. In: *Quora* [online]. [cit. 2018-05-23]. Dostupné z: <https://www.quora.com/How-are-scientists-able-to-identify-specific-bacteria>



- [15] In: *Thermo Fisher* [online]. [cit. 2018-05-22]. Dostupné z: [https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-basics/\\_jcr\\_content/MainParsys/image\\_b7c8/backgroundimg.img.jpg/1500206185436.jpg](https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-basics/_jcr_content/MainParsys/image_b7c8/backgroundimg.img.jpg/1500206185436.jpg)
- [16] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [17] ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero, c1998. ISBN 80-902-9060-4.
- [18] PCR Primer Design Guidelines. In: *PREMIER Biosof* [online]. PREMIER Biosof, 2018 [cit. 2018-05-22]. Dostupné z: [http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/PCR\\_Primer\\_Design.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html)
- [19] WHITMAN. The importance of melting temperature in molecular biology applications. In: *Integrated DNA Technologies* [online]. Integrated DNA Technologies, 2018 [cit. 2018-05-22]. Dostupné z: <https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/the-importance-of-tm-in-molecular-biology-applications>
- [20] WILLIAMS, Akin. What is the main function of a PCR buffer?. In: *Quora* [online]. [cit. 2018-05-22]. Dostupné z: <https://www.quora.com/What-is-the-main-function-of-a-PCR-buffer>
- [21] *Polymerase Chain Reaction (PCR)* [online]. Toledo, 2004 [cit. 2018-05-22]. Dostupné z: [http://www.eeescience.utoledo.edu/Faculty/Sigler/Von\\_Sigler/LEPR\\_Protocols\\_files/PCR.pdf](http://www.eeescience.utoledo.edu/Faculty/Sigler/Von_Sigler/LEPR_Protocols_files/PCR.pdf). University of Toledo.
- [22] Impact of Water Quality on PCR and Related Techniques. *Merck* [online]. Darmstadt: Merck, 2018 [cit. 2018-05-22]. Dostupné z: <https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/water-purification/learning-centers/applications/nucleic-acids/pcr/water-impact/TLWb.qB.tU4AAAFaOckENFly.nav>
- [23] SCHRADER, C., A. SCHIELKE, L. ELLERBROEK a R. JOHNE. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*. 2012, **113**(5), 1014-1026. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x. ISSN 13645072. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- [24] PCR in Food Analysis. *Polymerase chain reaction*. [Rijeka: Intech, 2012, 195 - 220. ISBN 9789535106128.
- [25] STEPHENSON, Frank H. The real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology*. Elsevier, 2010, 2010, , 211-311. DOI: 10.1016/B978-0-12-375690-9.00009-7. ISBN 9780123756909. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123756909000097>
- [26] Kvantitativna PCR (real-time PCR). *BIOpedia* [online]. Biopedia.sk, 2018 [cit. 2018-05-22]. Dostupné z: <https://biopedia.sk/molekularna-biologia/kvantitativna-pcr-real-time-pcr>
- [27] Multiplex PCR. *PREMIER Biosoft* [online]. PREMIER Biosoft, 2018 [cit. 2018-05-22]. Dostupné z: [http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/multiplex-pcr.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/multiplex-pcr.html)
- [28] XU, Wentao a Ying SHANG. The Detection Techniques of Genetically Modified Organisms. *Genetically Modified Organisms in Food*. Elsevier, 2016, 2016, , 343-351. DOI: 10.1016/B978-0-12-802259-7.00031-2. ISBN 9780128022597. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128022597000312>

[29] COHRT, Karen O'Hanlon. Polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay (PCR-ELISA). *BitesizeBio*[online]. Science Squared, 2017 [cit. 2018-05-22]. Dostupné z: <https://bitesizebio.com/20445/polymerase-chain-reaction-enzyme-linked-immunosorbent-assay-pcr-elisa/>

[30] GOMES, Luciana Inácia, Leticia Helena dos Santos MARQUES, Martin Johannes ENK, Maria Cláudia DE OLIVEIRA, Paulo Marcos Zech COELHO, Ana RABELLO a Jennifer KEISER. Development and Evaluation of a Sensitive PCR-ELISA System for Detection of Schistosoma Infection in Feces. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2010, 4(4), e664-. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000664. ISSN 1935-2735. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0000664>

[31] JENKINS, Frank J. *Basic Methods for the Detection of PCR Products*[online]. In: . Cold Spring Harbor Laboratory, 1994, 77 - 82 [cit. 2018-05-23]. ISSN 1054-9805/94. Dostupné z: <https://genome.cshlp.org/content/3/5/S77.long>

[32] 3482-1318886-276x450-jemny-kecup.png. In: *Hellmann's* [online]. [cit. 2018-05-24]. Dostupné z: <http://www.hellmanns.sk/Images/3482/3482-1318886-276x450-jemny-kecup.png>