



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

DŮKAZ VYBRANÝCH DRUHŮ ČERVENÉHO OVOCE V POTRAVINÁCH ROSTLINNÉHO PŮVODU POMOCÍ MULTIPLEX PCR A INSTRUMENTÁLNÍCH METOD

DETERMINATION OF SELECTED RED FRUIT SPECIES IN PLANT-BASED FOOD USING MULTIPLEX PCR
AND INSTRUMENTAL METHODS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Natálie Vybíralová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Lenka Fialová

BRNO 2021

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1721/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Natálie Vybíralová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Lenka Fialová**

Název bakalářské práce:

Důkaz vybraných druhů červeného ovoce v potravinách rostlinného původu pomocí multiplex PCR a instrumentálních metod

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracování literární rešerše
2. Izolace DNA z vybraných potravin a její analýza pomocí multiplex PCR
3. Extrakce vybraných rostlinných metabolitů z potravin a jejich charakterizace pomocí instrumentálních metod
4. Vyhodnocení a diskuse výsledků

Termín odevzdání bakalářské práce: 6.8.2021:

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

Natálie Vybíralová
student(ka)

Ing. Lenka Fialová
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Stále častěji se potraviny stávají předmětem falšování, výjimkou nejsou ovocné výrobky, které obsahují jahody, borůvky a maliny. Tato bakalářská práce je zaměřena na detekci jahod, borůvek a malin v modelových i reálných ovocných produktech pomocí multiplex PCR a HPLC. Teoretická část pojednává o složení červeného ovoce, jeho významu ve výživě člověka a především o izolaci DNA z rostlinného materiálu. Cílem experimentální části práce byla analýza vybraných komerčních ovocných pyré obsahujících maliny, jahody a borůvky a jejich replik pomocí vybraných instrumentálních a molekulárně-biologických metod a následné srovnání výsledků těchto metod. Komerční ovocná pyré byla zakoupena v maloobchodní síti a modelové směsi (repliky těchto pyré) byly připraveny v laboratoři. Z ovocných pyré byla vyizolována DNA, která byla po potvrzení její amplifikovatelnosti úspěšně využita v multiplex PCR pro důkaz malin, jahod a borůvek. V instrumentální části byly pomocí HPLC u modelových a komerčních směsí detekovány určité látky specifické pro červené ovoce.

Klíčová slova

Multiplex PCR, real-time PCR, HPLC, červené ovoce, dětské příkrmy, autenticita potravin

Abstract

In many cases food is becoming the subject of adulteration, including fruit products that contain raspberries, strawberries and blueberries. This bachelor thesis is focused on the detection of strawberries, raspberries and blueberries in model and commercial baby food products using multiplex PCR and HPLC. The theoretical part of this thesis is focused on composition of red fruits, their importance in human nutrition and especially about isolation of DNA from plant material. The aim of the experimental part of work was the analysis of selected commercial and model mixtures fruit purees containing raspberries, strawberries and blueberries using instrumental and molecular biological methods. The results of these methods are compared. Commercial purees were bought in retail grocery shop. Model mixtures of these purees were prepared in our laboratory. DNA was isolated from fruit purees and its amplifiability was confirmed, it was successfully used in multiplex PCR to confirm the presence of raspberries, strawberries and blueberries in fruit purees. In the instrumental part, certain phenolic substances which are specific to red fruits were detected by HPLC in model and commercial mixtures.

Keywords

Multiplex PCR, real-time PCR, HPLC, red fruit, baby food, food authenticity

Bibliografická citace

VYBÍRALOVÁ, Natálie. *Důkaz vybraných druhů červeného ovoce v potravinách rostlinného původu pomocí multiplex PCR a instrumentálních metod*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131530>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Lenka Fialová.

Prohlášení

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

V Brně dne: 2. srpna 2021

podpis autora

Obsah

ÚVOD	8
1. TEORETICKÁ ČÁST	9
1.1 ČERVENÉ OVOCE	9
1.2 VÝZNAM OVOCE VE VÝŽIVĚ ČLOVĚKA	9
1.3 SLOŽENÍ ČERVENÉHO OVOCE	10
1.3.1 Sacharidy	10
1.3.2 Fenolické látky	10
1.3.3 Flavonoidy	11
1.3.4 Anthokyany	12
1.3.5 Fenolické kyseliny	12
1.3.6 Vitamíny	13
1.4 JAHODNÍK OBECNÝ (<i>FRAGARIA ANANASSA</i>)	13
1.4.1 Účinné látky plodů	13
1.5 OSTRUŽINÍK MALINÍK (<i>RUBUS IDEAEUS</i>)	14
1.5.1 Účinné látky plodů	14
1.6 BRUSNICE BORŮVKA (<i>VAACCINIUM MYRTILLUS</i>)	15
1.6.1 Účinné látky plodů	15
1.7 FALŠOVÁNÍ OVOCE	16
1.7.1 Metody detekce falšování	17
1.8 IZOLACE DNA Z ROSTLINNÉ MATRICE	17
1.8.1 Proces extrakce DNA	18
1.8.2 Purifikace DNA	20
1.9 STANOVENÍ KONCENTRACE A ČISTOTY DNA	21
1.10 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE	22
1.10.1 Komponenty pro PCR	23
1.10.2 Cyclery	24
1.11 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE V REÁLNÉM ČASE (QPCR)	25
1.11.1 Kvantifikace	25
1.11.2 Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM-analýza)	25
1.12 ELEKTROFOREZA	26
1.12.1 Gelová elektroforéza	26
1.13 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ FENOLICKÝCH LÁTEK A FLAVONOIDŮ	26
1.13.1 Metoda FCM	26
1.13.2 Metoda PBM	27
1.13.3 Metoda AAPM	27
1.13.4 Metoda CUPRAC	27
1.14 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (HPLC)	27
1.14.1 Princip	28
1.14.2 Charakteristika procesu HPLC	29
2. CÍL PRÁCE	30
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
3.1 MATERIÁL	31
3.2 CHEMIKÁLIE	31

3.3	PŘÍSTROJE A VYBAVENÍ.....	31
3.4	IZOLACE DNA Z ROSTLINNÉHO MATERIÁLU.....	32
3.4.1	<i>Pracovní postupy</i>	32
3.4.2	<i>Příprava modelových a komerčních směsí</i>	33
3.4.3	<i>Měření koncentrace a čistoty DNA</i>	33
3.4.4	<i>Polymerázová řetězcová reakce</i>	34
3.4.5	<i>Detekce produktů PCR pomocí agarózové gelové elektroforézy</i>	35
3.4.6	<i>Příprava extraktů pro HPLC</i>	35
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	37
4.1	MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÉ METODY.....	37
4.1.1	<i>Izolace DNA</i>	37
4.1.2	<i>Ověření amplifikovatelnosti DNA</i>	37
4.1.3	<i>Ověření specifity primerů BLHL3, GAST1, RiACO1 a jejich funkčnosti v triplex PCR</i>	41
4.1.4	<i>Stanovení citlivosti triplex PCR</i>	46
4.1.5	<i>Izolace DNA z modelových a komerčních pyré</i>	52
4.1.6	<i>Ověření amplifikovatelnosti DNA izolované z komečních výrobků za použití ITS 2 primerů</i>	52
4.1.7	<i>Průkaz malinové, jahodové a borůvkové složky v ovocných pyré pomocí druhově specifických primerů</i>	56
4.1.8	<i>HRM analýza PCR produktů a stanovení specifity primerů a citlivosti</i>	60
4.2	INSTRUMENTÁLNÍ METODY.....	63
4.2.1	<i>HPLC</i>	63
5.	ZÁVĚR.....	65
	LITERATURA.....	66

ÚVOD

Dnešní doba přináší mnoho nových trendů, mezi které jednoznačně patří i zájem o zdravou životosprávu a s tím i spojený vyvážený jídelníček. Lidé se snaží do svého jídelníčku zařadit více výživově hodnotných potravin, které mají vysoký obsah vitamínů, minerálů, vlákniny a antioxidantů. Bohatým a vhodným zdrojem těchto látek je čerstvé ovoce a zelenina.

Kromě čerstvého ovoce můžeme na trhu nalézt i ovocné produkty jako jsou marmelády, džemy, džusy, cidery apod. Maliny, jahody i borůvky můžeme zařadit mezi dražší ovoce, což znamená, že se často stávají objektem falšování. K detekci falšování potravin slouží řada metod, nejrozšířenější jsou však chromatografické metody. Chromatografické metody mají ale určité nevýhody, které metody založené na analýze DNA nemají, např. nákladná údržba, velká spotřeba organických látek či nedostatečná citlivost pro některé látky. Kvůli těmto důvodům stojí za to hledat molekulárně - biologické metody a postupy pro detekci falšování výrobků z jahod, malin a borůvek, i jiného červeného ovoce.

Nevýhody jsou však i na straně molekulárně-biologických metod. Metoda PCR vyžaduje čisté prostředí a sterilní materiál, protože přítomnost i malého množství cizorodé DNA může vést k falešně pozitivním výsledkům. Některé kontaminující látky, jako například v ovoci se vyskytující fenolické látky a polysacharidy, mohou PCR inhibovat, takže výsledkem může být naopak falešně negativní reakce.

Cílem této práce byla analýza vybraných ovocných výrobků metodou triplex real-time PCR s vysokorozlišovací analýzou křivek tání a metodou HPLC, a následné srovnání získaných výsledků. U metody s analýzou DNA, byla z vybraných ovocných pyré nejprve vyizolována DNA, poté následovala kontrola její amplifikovatelnosti a pomocí druhově specifických primerů byly ve zmíněných ovocných pyré detekovány malina, jahoda i borůvka. U metody HPLC bylo cílem najít a detekovat specifické látky pro malinu, jahodu i borůvku. [1]

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Červené ovoce

Mezi červené ovoce a plody můžeme řadit šípky, maliny, jahody, brusinky, borůvky, granátová jablka, třešně, višně, rybíz, červená jablka, vodní melouny a další. Z toto typu ovoce se vyrábějí především džusy, džemy, dětské příkrmy, ale také zmrzliny, cukrovinky, cidery a koncentráty. K základní specifikaci těchto výrobků patří typická barva, chuť a vůně.

Za červenou barvu ovoce a zeleniny je zodpovědný lykopen, což je přírodní rostlinné barvivo s antioxidačními účinky ze skupiny karotenoidů. Patří mezi biologicky důležité látky a to terpeny, konkrétně mezi tetraterpeny [1].

Mezi další pigmenty, které obsahuje červené ovoce můžeme uvést anthokyaniny. Jsou to ve vodě rozpustné pigmenty, které se nachází ve vakuolách některých buněk. Barva anthokyanů se mění v závislosti na pH, kyselé roztoky anthokyanů mají červenou barvu, neutrální bývají fialové a zásadité modré. Obecně můžeme řadit anthokyaniny k flavonoidům, ale v rostlinách se vyskytují ve formě glykosidů [1], [2].

1.2 Význam ovoce ve výživě člověka

Trendem dnešní doby je zdravý životní styl, který se snaží dodržovat stále více lidí. V souladu s tímto trendem je potřeba dodržovat základní pravidla a to, že množství energie přijaté jídlem a pitím, se musí rovnat energii vydané fyzickými aktivitami. Strava musí být upravena každému jedinci na míru, musí být přiměřená a pestrá a hlavně odpovídat náročnosti vykonávané práce.

Ovoce se nedá ve stravě člověka ničím nahradit, důležitá je především konzumace ovoce v syrovém stavu, protože obsahuje látky, které jsou potřebné pro zdravý vývin a životní pochody organismu. Tyto látky jsou v ovoci obsažené ve formě, která je přijatelná pro organismus, tyto látky nelze zcela nahradit uměle syntetizovanými produkty. Pravidelná konzumace ovoce a těchto látek zvyšuje odolnost organismu a schopnost bránit se proti onemocněním [3].

Pro tuto skupinu je charakteristická nízká energetická hodnota a vysoký obsah minerálních látek a vitamínů. Další důležitou složkou ovoce je vláknina, která byla v minulosti velmi přehlížena. Vláknina má velmi důležitý význam pro lidskou výživu, stimuluje činnost trávicího traktu a příznivě ovlivňuje činnost dalších orgánů. Vláknina má schopnost na sebe vázat vodu, čímž zvětší svůj objem a vytváří pocit sytosti. Vláknina na sebe váže toxické látky a tukové částice, čímž udržuje čistý trávicí trakt. Z chemického pohledu je vláknina tvořena polysaccharidy, přičemž má velmi nízkou výživovou hodnotu. Z červeného ovoce je nejvíce zastoupena v šípkách, jablkách, malinách a rybízu. Další neopomenutelnou složkou ovoce jsou antioxidanty, což jsou molekuly, které omezují aktivitu kyslíkových radikálů - snižují pravděpodobnost vzniku, nebo je převádí do méně aktivní či vůbec neaktivní podoby. Tímto způsobem se omezuje proces oxidace

v organismu. Z tohoto důvodu se antioxidanty používají jako konzervační látky při výrobě potravin, které by jinak byly oxidací nadměrně poškozovány, například rostlinné oleje. Při konzumaci v rozumném množství působí v jistém smyslu pozitivně na organismus [4].

Antioxidanty se přidávají do potravin, protože prodlužují jejich trvanlivost a zároveň mají pozitivní účinky na naše zdraví.

Některé rostliny, resp jejich části obsahují tolik účinných antioxidantů (nebo jsou lidské stravě zastoupeny v takovém množství), že je označujeme jako rostlinné antioxidanty. Příkladem mohou být ostružiny, lékořice, kopr, malinoostružiny, maliny, granátové jablko, černý rybíz, červené víno, máta, borůvky, brusinky a arašídý.

Obecně by červené ovoce mělo být součástí vyvážené doporučené stravy, ale přímo speciální místo v ní nemá. Organizace WHO jednoduše doporučuje sníst přibližně 200 až 300 g ovoce denně [5].

1.3 Složení červeného ovoce

Složení ovoce výrazně ovlivňuje jeho zralost a geografické podmínky. Jako hlavní složky můžeme uvést vodu, sacharidy, organické kyseliny a v malé míře i lipidy. V ovoci můžeme dále nálezt pigmenty, aromatické látky a vitamíny. Další skupina, kterou nelze opomenout jsou minerály, které mají i nutriční význam.

Většina vody, která se u plodů nachází je ve vakuolách buněk, je potřebná pro všechny biochemické pochody v buňce a tedy i v ovoci. Při vadnutí ovoce dochází ke ztrátě hmotnosti, a to v důsledku vysokého výparu vody[3].

1.3.1 Sacharidy

Sacharidy jsou hlavní složkou, která u ovoce tvoří více než 90 % sušiny. V dozrávajícím ovoci díky asimilaci a v malé míře i hydrolýzou polysacharidů, dochází ke zvyšování obsahu monosacharidů a oligosacharidů. Obsah sacharidů závisí na druhu a odrůdě ovoce, velikosti plodů a geografických podmínkách.

Mezi dva hlavní cukry nacházející se v ovoci můžeme jednoznačně zařadit glukózu a fruktózu. Jahody, maliny a borůvky mají hodnotu glykemického indexu okolo 40, což znamená, že i lidé s cukrovkou mohou konzumovat tento typ ovoce, protože po konzumaci, nedochází k velkým nárůstům glykemie (krevní cukr) **Error! Reference source not found.**

1.3.2 Fenolické látky

Fenoly a polyfenoly můžeme zařadit do skupiny sekundárních metabolitů rostlin. Tyto sloučeniny obsahují jednu, nebo více hydroxylových funkčních skupin, které jsou navázané na buď na jedno, či více aromatických jader [7], [8].

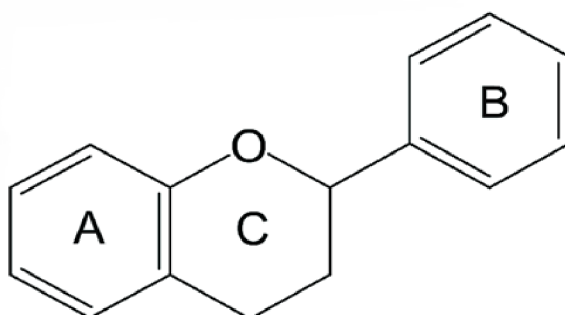
U některých potravin byly stanoveny průměrné hodnoty celkového obsahu fenolických látek. Zjištěné hodnoty nemůžeme brát jako směrodatné, jelikož obsah fenolických látek se mezi odrůdami jednoho druhu ovoce velmi liší.

Rozdělení fenolických látek v různých částech rostliny a v plodech se může značně lišit. V pupenech a květech bývají přítomné flavonolové glykosidy kvercerinu a myricetinu, zatímco v slupce bývají nejhojněji zastoupené třísloviny. Při zpracovávání či oddělování částí potravin může vést k ochuzení, či naopak obohacení o určité fenolické látky [9], [10].

1.3.3 Flavonoidy

Flavonoidy jsou asi nejrozsáhlejší skupina fenolických látek. Flavonoidy jsou tvořeny dvěma benzenovými jádry (A a B), které jsou vzájemně propojeny heterocyklem (C), který je tvořen třemi atomy uhlíku a jedním atomem kyslíku (Obrázek 1).

Mezi flavonoidy můžeme zařadit tyto skupiny sloučenin: flavonoly, flavony, isoflavony, flavanony, anthokyany a také favanoly. Každá skupina z výše uvedených látek vykazuje v živých organismech biologickou aktivitu [9], [10].

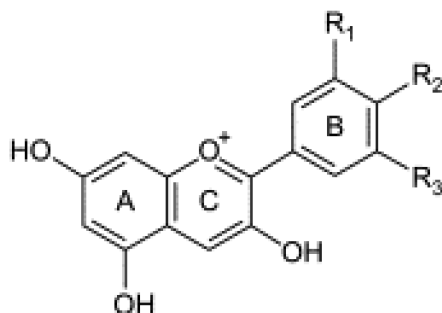


Obrázek 1: Základní struktura flavonoidů [11]

1.3.4 Anthokyany

Velmi důležitou a rozsáhlou podskupinou flavonoidů jsou anthokyany. Anthokyany jsou glykosidy polyhydroxy a polymethoxy derivátů, které jsou odvozené od 2-fenylbenzopyryliového kationtu, nebo flavylium soli (Obrázek 2).

V některé literatuře se můžeme setkat i s jiným názvem anthokyanů, jsou jinak také nazývané anthokyaniny. Jednotlivé rozdíly mezi anthokyany jsou dány různou mírou hydroxylace, množstvím, vlastnostmi a polohou připojených kyselin a sacharidů [13].



Obrázek 2: Struktura 2-fenylbenzopyryliového kationtu [12]

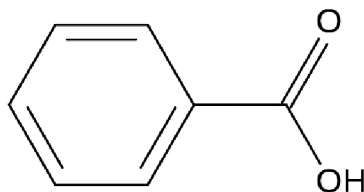
Anthokyany jsou rostlinné pigmenty, které jsou rozpustné ve vodě, a jejich barva je nejčastěji červená až modrá. Barva je dána typem přítomných anthokyanů, přítomností dalších pigmentů a může se měnit působením vnějších podmínek (teplota, pH, přítomnost enzymů).

V rostlinách anthokyany zastávají nejednu funkci, podílejí se na pigmentaci rostliny a jejich plodů. Dále působí jako antioxidanty a odpuzovače hmyzu [13].

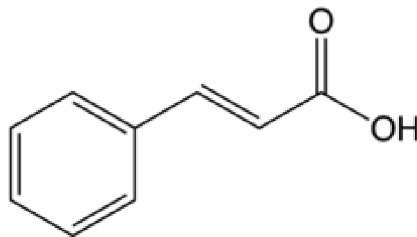
1.3.5 Fenolické kyseliny

Fenolické kyseliny se dělí do dvou hlavních skupin. První skupina jsou fenolické kyseliny, které jsou odvozené od kyseliny benzoové, která obsahuje sedm atomů uhlíku (Obrázek 3). Druhá skupina jsou fenolické kyseliny, které jsou odvozené od kyseliny skořicové, která obsahuje devět atomů uhlíku (Obrázek 4) [16].

Nejčastější podoba, ve které se tyto kyseliny vyskytují je hydroxylová forma, proto je označujeme jako hydroxybenzoové a hydroxyskořicové kyseliny. Některé přírodní fenolické kyseliny se běžně vyskytují ve stravě, například kvercetin. Zastoupeny jsou ve volné formě, ale běžnější jsou vázané formy, nejčastěji estery a amidy [17].



Obrázek 3: Kyselina benzoová [14]



Obrázek 4: Kyselina skořicová [15]

V rostlinách se mnohem častěji vyskytují deriváty kyseliny skořicové než benzoové. Fenolické kyseliny v rostlinách nalezneme spíše vázané, zejména na sacharidy, nebo s kyselinou chinovou, šikimovou či vinnou. Fenolické látky ve volné formě nalezneme jen velmi zřídka [16], [17].

1.3.6 Vitamíny

Ovoce obecně obsahuje velké množství vitamínů, které jsou nepostradatelnou součástí zdravé výživy člověka a jejich nedostatek může vést k vážným onemocněním. Červené ovoce obsahuje vysoké množství vitamínu C a fenolických látek, z nichž za nejdůležitější můžeme považovat anthokyany, které patří mezi hlavní antioxidační sloučeniny. Mezi další důležité antioxidanty můžeme zařadit vitamin A a prvky jako mangan, zinek a měď. Kromě vitamínů A a C se v červeném ovoci nachází i vitamin B6, vitamin E, vitamin K, thiamin, riboflavin a niacin.

Jahody a maliny mohou také být zdrojem esenciálních aminokyselin, které se nacházejí v semínkách a zrníčkách jahod a malin. Pro naše tělo mají nutriční význam a mohou ovlivňovat chuť jahod a malin [18],[19].

1.4 Jahodník obecný (*Fragaria ananassa*)

Jahodník obecný patří mezi vytrvalé byliny, ale podle jeho velikosti je můžeme řadit i jako přechod mezi bylinou a keřem, tzv. polokeř. Rostlinu tvoří listy, šlahouny, stvoly na kterých rostou květy a plody. Rostlinu dále tvoří kořenová soustava, která rostlinu pevně drží v zemi [20].

Rozlišovacím znakem mezi různými odrůdami jahod jsou listy. Listy u jahod jsou řapíkaté, mají různou délku a velikost v závislosti na odrůdě. Plody jahodníku jsou jahody. Kromě planě rostoucích lesních jahod je dnes známo několik desítek až stovek druhů velkoplodých odrůd jahod [21],[22].

1.4.1 Účinné látky plodů

Fenolické sloučeniny, které jsou přítomné v jahodách podporují zdraví srdce, mají protizánětlivé a antikarcinogenní účinky. Za zástupce glykosidů v jahodě můžeme uvést kvercetin a kyselinu ellagovou. Při dozrávání jahody se začíná objevovat značné množství kyseliny skořicové a anthokyanů, které způsobují následné zčervenání plodu. Jahody jsou dobrým zdrojem vlákniny (*Tabulka 1*) a jsou bohaté na kyselinu listovou, vitamin C,

riboflavin, vitamin B5 a B6. Dále jsou jahody dobrým zdrojem draslíku a hořčíku (*Tabulka 2*). Samotné jádérka jahod obsahují Omega -3 mastné kyseliny [22], [23].

Tabulka 1: Látkové složení jahody [22]

Vybrané látky v jahodách	Obsah [%]
Voda	90,9
Proteiny	0,7
Tuky	0,3
Vláknina	2,0
Sacharidy	5,7
Minerály, vitaminy	0,4

Tabulka 2: Vybrané prvky v jahodách [22]

Vybrané minerály v jahodách	Obsah [mg·kg ⁻¹]
Vápník	160
Železo	40
Hořčík	130
Fosfor	240
Draslík	1530
Sodík	10

1.5 Ostružiník maliník (*Rubus idaeus*)

Ostružiník maliník, převážně nazývaný jako maliník obecný, je vysoký listnatý opadavý keř. Maliník dorůstá výšky až kolem 2 metrů. Listy maliníku jsou 3 až 7 čtelné, střídavé a jsou lehce chlupaté s jemnými trny. Květy maliníku jsou pravidelné, mají bílou, až lehce narůžovělou barvu. Maliník kvete v květnu až červenci [20].

Plodem tohoto keře je malina, což je souplodí malých peckovic, které se poskládají dohromady. Maliníku se daří v celém mírném pásu severní polokoule. V dnešní době se v zahradách nejčastěji pěstují velkoplodé odrůdy, kterých již bylo vyšlechtěno přes několik set [21].

1.5.1 Účinné látky plodů

Maliny obsahují celou řadu látek, u kterých byly prokázány příznivé účinky na lidské zdraví. Maliny můžeme považovat za bohatý zdroj vitaminů a to především vitamínu A a C. Vitamin A obsažený v malinách může být dobrým lékem proti očním obtížím, protože obsahuje zřetelný purpur rhodopsin, který se nachází v sítnici oka obratlovců. Maliny můžeme zařadit mezi dobrý zdroj vlákniny a sacharidů, ale obsahují pouze 1 % bílkovin (*Tabulka 3*) [24].

Typickou růžovočervenou barvu malin způsobují anthokyany. Maliny mají silné antioxidační účinky, jelikož obsahují dva velmi silné antioxidanty a to kyselinu gallovou a kvercetin. Tyto látky vykazují antikarcinogenní účinky a příznivě působí proti

onemocněním oběhového systému. Obsahují také důležité minerály, jako jsou vápník, hořčík, fosfor, železo a draslík (*Tabulka 4*) [25].

Tabulka 3: Látkové složení maliny [24]

Vybrané látky v malinách	Obsah [%]
Voda	85,7
Proteiny	1,2
Tuky	0,7
Vláknina	6,5
Sacharidy	5,4
Minerály, vitaminy	0,5

Tabulka 4: Vybrané prvky v malinách [25]

Vybrané minerály v malinách	Obsah [mg·kg ⁻¹]
Vápník	250
Železo	70
Hořčík	220
Fosfor	290
Draslík	1510
Sodík	10

1.6 Brusnice borůvka (*Vaaccinium myrtillus*)

Brusnice borůvka je nízký, na zimu opadavý keř, s malými drobnými listy. Dorůstá výšky kolem 50 cm. Listy mají oválný tvar a na lodyze jsou uspořádány střídavě. Borůvka kvete od dubna do června a její květy mají bílou barvu [3].

Plodem brusnice borůvky jsou borůvky, jsou to fialovomodré drobné kulaté bobule. Borůvky obsahují (*Tabulka 5*) velké množství červenofialové šťávy a drobná semínka uvnitř. Borůvky rostou hojně v řídkých lesích, kde tvoří hustý a rozsáhlý porost. Brusnice borůvka je rozšířena téměř ve všech částech Evropy. Borůvky v nižších polohách dozrávají v období od června do září, ale ve vyšších polohách je to vždy později [3],[20],[21].

1.6.1 Účinné látky plodů

Borůvky obsahují velké množství sacharidů a dají se považovat za dobrý zdroj vlákniny (*Tabulka 5*). Borůvky obsahují prvky, které jsou důležité pro náš organismus, například vápník, hořčík a fosfor (*Tabulka 6*).

Obecně můžeme plody borůvek označit jako ovoce s vysokým obsahem vitamínu C. Borůvku můžeme zařadit mezi potraviny bohaté na polyfenoly. Anthokyany, železo a vitamín C, které jsou spolu přítomné v borůvce, příznivě ovlivňují krevní oběh [18], [25].

Tabulka 5: Látkové složení borůvky [25]

Vybrané látky v borůvkách	Obsah [%]
Voda	84,2
Proteiny	0,7
Tuky	0,3
Vláknina	2,4
Sacharidy	12,1
Minerály, vitaminy	0,3

Tabulka 6: Vybrané prvky v borůvkách [25]

Vybrané minerály v borůvkách	Obsah [mg·kg ⁻¹]
Vápník	60
Železo	30
Hořčík	60
Fosfor	120
Draslík	770
Sodík	10

1.7 Falšování ovoce

Slovo falšování označované také jako falzifikace pochází z latinského slova „falzum“ a znamená napodobování. Falšování potravin je účelné zhoršení kvality potravin výrobcem, za účelem zvýšení zisku. Při falšování je nejčastěji dražší surovina nahrazena levnější, to v některých případech může znamenat i zdravotní závadnost. Může dojít k nahrazení původní složky za alergenní, která poté není uvedena na obalu. Tento krok je velmi nebezpečný, jelikož alergenní složka může někoho ohrozit na životě (například stopy arašídů v čokoládě nebo sušenkách). Potravinu zfalšované tímto způsobem bohužel nelze odhalit předem, protože u většiny výrobků nedochází k pozorovatelným změnám na vzhledu či chuti [26].

U ovocných výrobků je nejčastějším způsobem falšování přidávání cukru, čímž dochází ke snížení ovocného podílu. Dalším způsobem je nahrazování dražších druhů ovoce levnějšími druhy (zejména náhrada malin, borůvek a ostružin jablky) a vydávání šťávy získané naředěním koncentrátu za šťávu, která byla získána lisováním z ovoce.

Ovocné šťávy jsou ze všech ovocných výrobků nejčastěji falšovány. Při analýzách ovocných šťáv dochází ke zjištění, že podíl ovocné složky uvedený na obalu se neshoduje s podílem zjištěným analýzou.

Další často falšované ovocné výrobky jsou džemy, džusy, želé, cukrovinky, ovocné sirupy a dřeně, kde opět dochází k nahrazení drahé suroviny levnější [26].

Anthokyany a jiné fenolické látky často slouží jako ukazatel pravosti při analýzách potravin. Specifické vzorce anthokyanů a fenolických látek umožňují klasifikovat různé druhy ovoce na základě těchto vzorců a dokáží odhalit přídavky levnějšího ovoce nebo plodů se stabilnější barvou [26].

Ve zpracovávaném ovoci a zelenině bývá často prokázána přítomnost cizorodých látek, nejčastěji barviv. Barviva se přidávají nejčastěji do sušeného ovoce, které sušením ztrácí svoji přirozenou barvu. Méně časté jsou případy přidávaných barviv do kompotů a marmelád. Dále jsou často u konzervované zeleniny a ovoce zjištěny nepovolené konzervační látky, nebo překročené limity těchto konzervačních látek.

U plechovkových kompotů byl zjištěn nadlimitní obsah olova a cínu, který se uvolňoval z obalu. Touto problematikou se zabývá státní potravinářská inspekce (SZPI). Nedodržování požadavků ze směrnice Evropského parlamentu a Rady 2000/13/ES, která se zabývá označováním zdůrazněných složek, patří mezi problematiku falšování [27].

1.7.1 Metody detekce falšování

K detekci falšování ovocných výrobků se v dnešní době využívají nejmodernější metody, které jsou založené na DNA analýze, nebo fyzikálních a chemických parametrech. U DNA analýzy dochází k odběru vzorku z ovocného produktu, na základě takto získané DNA identifikujeme druh a odrůdu ovoce, ze kterého je produkt vyroben. Další metody používané k odhalení falšování mohou být chromatografické a spektroskopické metody.

Mezi nejčastěji používané metody, které nám pomáhají odhalit pravost produktu řadíme analýzy fyzikálních a chemických parametrů, jako jsou hustota, obsah cukrů a kyselin [26].

1.8 Izolace DNA z rostlinné matrice

Zásadní krok pro všechny molekulárně biologické metody je izolace čisté a neporušené DNA. V praxi DNA můžeme izolovat mnoha způsoby a postupy, ale mezi hlavní kritéria při výběru postupu jednoznačně patří rychlost postupu, druh matrice a cenová dostupnost [28].

Rostlinné tkáně a jejich biochemické složení se u různých rostlinných druhů výrazně liší. Použití jednoho stejného izolačního postupu u takto různorodých rostlinných druhů, bude mít za následek nedostatečný výtěžek nebo nedostatečnou kvalitu izolované DNA. I u blízké příbuzných rostlinných druhů může stejný postup izolace DNA vést k rozdílné kvalitě izolátů. Izolační postupy mohou zůstat stejné pouze u živočišné tkáně a mikroorganismů, ale pro každý rostlinný druh a rostlinnou tkáň musí být upraveny postup upraven [29].

Největší potíže při izolaci DNA způsobují polysacharidy, fenolické látky a proteiny. Při rozrušení struktury buněk může docházet k navázání těchto látek na DNA, odstranění těchto navázaných látek je nezbytné pro izolaci kvalitní DNA.

Polysacharidy přítomné v izolované DNA jsou velmi nepříjemné a to z důvodu, že při PCR reakci inhibují enzymovou aktivitu DNA polymerázy a velmi těžko se odstraňují. Přítomností polysacharidů ve vzorku DNA vznikají velmi viskózní roztoky, které se těžko pipetují [30].

Fenolické látky přítomné ve vzorku snižují výtěžek a kvalitu izolované DNA. Při narušení struktury buňky se z vakuol uvolní polyfenoly, které jsou oxidovány

oxidásami

a ireverzibilně se vážou na nukleové kyseliny. Oxidované formy polyfenolů, které jsou navázány na nukleové kyseliny, způsobí hnědé zabarvení a sníží kvalitu izolované DNA [17], [31].

Proteiny jsou další kontaminanty DNA, které je nutno při purifikaci odstranit, jelikož může docházet k degradaci nukleových kyselin nebo k navázání proteinu na nukleovou kyselinu. Proteiny lze odstranit pomocí proteáz. Dalším způsobem používaným na odstraňování proteinů je extrakce směsí fenolu a chloroformu, která je nemísitelná s vodou. Směs je přidána do prostředí buněčného lyzátu, kde po promíchání dojde k denaturaci proteinů. Po centrifugaci se vytvoří dvě fáze. Spodní fáze je organická a horní je vodná fáze, fáze jsou od sebe odděleny rozhraním denaturovaného proteinu. Extrakce se opakuje do vymizení denaturovaných proteinů z fázového rozhraní [28].

Tyto výše uvedené látky mají negativní vliv na kvalitu a kvantitu izolované DNA. Negativní vlivy těchto látek můžeme snížit po přidání specifických látek, u izolovaných polysacharidů přidáváme manitol, sacharosu, glukosu a NaCl s vyšší koncentrací. U odstraňování polyfenolů používáme polyvinylpyrrolidon (PVP) a β -mercaptoethanol, jejich vliv můžeme také snížit tím, že dáme rostlinnou tkáň zmrazit, před a nebo v průběhu homogenizace [28], [32].

1.8.1 Proces extrakce DNA

Extrakce DNA z rostlinné buňky zahrnuje proces odstranění polysacharidů, fenolických sloučenin a následnou deproteinizaci DNA, její srážení a purifikaci. Nejčastější problém u extrakce DNA nastává v tvorbě komplexů výše zmíněných látek s nukleovými kyselinami.

První fáze u extrakce genomové DNA spočívá v mechanickém narušení zmrzlé rostlinné tkáně (jaderné i buněčné membrány lze rozpouštět i pomocí tenzidů). Tkáň by po celou dobu dezintegrace měla být zmrazena a to mimo jiné z důvodu zamezení degradace DNA. Po narušení buněčných stěn následuje i narušení buněčných membrán pomocí detergentů, aby se DNA uvolnila do extrakčního pufru.

V průběhu procesu extrakce je DNA chráněna před působením endogenních nukleas a to přítomností disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) v extrakčním pufru. EDTA má schopnost na sebe navazovat hořčnaté ionty, které jsou nezbytným kofaktorem pro většinu endonukleáz. K deproteinizaci se používají organické sloučeniny nejčastěji fenol a chloroform. Při deproteinizaci DNA je nutné zachovat pH 8 a vyšší, protože se DNA extrahuje do organické fáze [33].

1.8.1.1 Úchova vzorků

Na izolaci DNA je nejvhodnější čerstvý a mladý rostlinný materiál, který je bez známek poškození od škůdců a který je možné krátkodobě skladovat při teplotě 4 °C bez poškození DNA. Starší rostlinné materiály nejsou vhodné na izolaci DNA z důvodu nadržování

velkého množství sekundárních metabolitů. Faktory jako je zdroj a stáří rostlinného materiálu mají vliv na kvalitu a koncentraci izolované DNA [35].

Mladé a zdravé rostliny, především jejich nově vyhanané a opadané listy jsou ideálním zdrojem pro izolaci kvalitativně i kvantitativně dobré DNA, díky velkému počtu buněk a nízkému ukládání škrobu a sekundárních metabolitů. Horší kvalitu a koncentraci bude mít DNA, která byla izolována ze zralých plodů, a to kvůli vysoké koncentraci polyfenolů, polysacharidů a dalších sekundárních metabolitů. [34]

Rostlinný materiál, který je určen pro izolaci DNA musí být skladován při velmi nízkých teplotách, cca $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, nebo při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. V některých případech není možné vzorky ihned zchladit, například při převozu ze vzdálenějších oblastí a proto se musí uchovávat v roztoku nasyceného pufu nebo v sušené formě na silika gelu, kde musíme zabránit kontaminaci vlivem vlhkosti [35].

1.8.1.2 Homogenizace rostlinné tkáně

Důkladná homogenizace je důležitým krokem, při němž dochází k narušování buněčné stěny a současně se snižuje viskozita směsi, která je způsobena sloučeninami s vysokou molekulovou hmotností (například polysacharidy).

Nejnámější metoda homogenizace je fyzické rozrušení buněk pomocí hmoždíře a tloučku nebo míchání se skleněnými kuličkami, kde dochází k porušení buněčné stěny. Mezi jedny z neúčinnějších metod se řadí homogenizace v tekutém dusíku, což je rychlá metoda použitelná pro různé druhy tkání. Nevýhodou této metody jsou vysoké náklady na skladování tekutého dusíku [36], [37].

1.8.1.3 Lyze buněk

Krokem následujícím po homogenizaci rostlinné tkáně je lyze buněk pomocí detergentů nebo fyzikálně-chemickými postupy. Tímto krokem se uvolní genetický materiál obsažený v buňce do roztoku [36].

Buněčné membrány jsou rozrušeny a přítomné proteiny denaturují přidávkem detergentů, kterými jsou nejčastěji SDS (dodecylsulfát sodný) nebo sarcosyl. Látky jako NP-40 (nonyl fenoxypolyethoxyethanolu), nám umožňují rozpustit buněčnou membránu a přitom zachovat membránu jadernou, což je jeden ze způsobů jak můžeme separovat jadernou DNA od DNA plazmidové [36], [37].

1.8.1.4 Odstranění kontaminujících látek

Izolaci dostatečně kvalitní DNA z vyšších rostlin komplikuje přítomnost sekundárních metabolitů, jako jsou alkaloidy, flavonoidy a také taniny, které negativně ovlivňují čistotu a koncentraci DNA. Mezi další kontaminanty při izolaci DNA patří RNA, polysacharidy, proteiny a polyfenoly. Během lyze buněk se z vakuol vyplavují fenolické látky, které jsou oxidovány buněčnými oxidásami. Tyto oxidované polyfenoly způsobují nevratné interakce s nukleovými kyselinami, které se navenek projevují zhnědnutím izolátů DNA. Uvedené interakce můžeme eliminovat tím, že buněčnou tkáň během homogenizace

zmrazíme nebo použijeme antioxidanty, které působí jako adsorbenty fenolických látek. Antioxidanty vytváří s polyfenoly sloučeniny, což nám umožní jejich oddělení od DNA a tedy snížení jejich koncentrace v produktu [36].

Nejčastěji se za tímto účelem využívá polyvinyl pyrrolidon (PVP), polyvinyl polypyrrolidon (PVPP) a β -merkaptoethanol. Další nepříjemnou látkou během izolace DNA jsou polysacharidy, které se rády s DNA sráží a tím zvyšují viskozitu homogenátu a falešně zvyšují množství izolované DNA. Nukleové kyseliny s vysokým obsahem polysacharidů zůstávají často nalepené v jamce během gelové elektroforézy [32].

Musíme brát v úvahu, že DNA a RNA mají velice podobné vlastnosti, směs těchto dvou nukleových kyselin se získává velice snadno. RNA lze odstranit poměrně jednoduše a to přidáním enzymu ribonukleázy, která specificky štěpí RNA na směs oligosacharidů, aniž by nějak narušila molekulu DNA. Další způsob odstranění RNA může být pomocí pankreatické RNázy nebo chloridem lithným [37].

Struktura proteinů se dá chemicky rozrušit pomocí β -merkatoethanolu nebo pomocí SDS (dodecylsulfát sodný), proto se tyto látky používají při odstraňování proteinů z DNA. Proteiny je možné odstranit i jinými látkami, např. fenolem i chloroformem, ale při použití těchto látek dochází ke značným ztrátám DNA. Lipidy je vhodné vyextrahovat před izolací DNA z rostlinných materiálů bohatých na tuky (například olejnatá semena). Lipidy tvoří nad homogenátem vrstvu tuku, která zabraňuje odebrání supernatantu a způsobuje potíže při dalším zpracovávání vzorku [36], [37].

1.8.2 Purifikace DNA

Purifikací rozumíme přečištění nukleových kyselin, tedy odstranění veškerých nežádoucích kontaminantů z daného vzorku DNA. Pomocí purifikace se snažíme získat nukleovou kyselinu v určitém množství a o požadované čistotě, jelikož kvalita DNA určuje úspěšnost navazujících postupů a metod [28].

Přečišťovací metody mohou být založené na vysolování DNA z roztoku, či oddělování směsi centrifugováním nebo na iontoměničové chromatografii. Izolační a přečišťovací postupy u nukleových kyselin jsou ve výše uvedených případech a v mnoha bodech stejné, nebo se značně překrývají [28], [29], [30].

1.8.2.1 Pevné nosiče- silika kolonky

Princip izolace na kolonkách je založen na základě selektivní vazby DNA nebo RNA o určité délce na vrstvu drceného borosilikátového skla, které se nachází mezi dvěma fritami na kolonce. Tato metoda je poměrně stará a využívá adsorpci na silikátový povrch. Když se ohlédneme do historie, z počátku byly využívány přírodní materiály jako je křemelina, dnes se využívá synteticky připravený silikagel [38].

Metoda je založena na poměrně vysoké adsorpci DNA na silikát, je poměrně rychlá a jednoduchá. Přídavkem vysoké koncentrace chaotropních solí dojde při vhodném pH k rozbití vodíkových můstků mezi molekulami vody a povrchem silikátu.

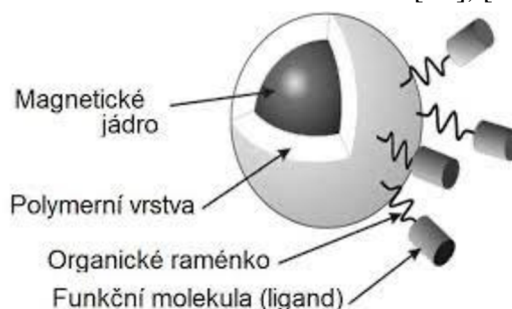
Na dehydratovaný silikát se poté mohou navázat vysoko afinitní fosfátové skupiny DNA. Při opakovaném promývání se odstraní kontaminující složky. DNA se ze silikátových kuliček vymyje puřrem s nízkým obsahem solí nebo, pomocí destilované vody.

Silikagel můžeme využívat k separaci nejrůznějších látek, od jedovatých plynů, přes kovové ionty až po proteiny a nukleové kyseliny. Silikagel je silně polární a proto adsorbuje také polární sloučeniny. Polární charakter silikagelu může být snížen napojením nepolárních skupin. Při navázání chelatačních skupin na silikagel, můžeme takto upravený silikagel používat k separaci proteinů. Mezi výhody silikagelu patří jeho vlastnosti, je nehořlavý, není toxický, je stabilní a je nereaktivní. Silika kolonky mají, ale i jisté nevýhody, silikagel je stabilní pouze jen v rozmezí pH 3 až 7,5. Po modernějších úpravách těchto kolon je možné dosáhnout až rozpětí pH 2 až 10. Nízké pH způsobuje hydrologické štěpení organického ligandu, naopak vyšší pH vede k rozpuštění silikagelu. Stabilita částic je tedy omezena na 60 °C. Tepelné omezení má hlavně význam při separaci silných kyselin nebo naopak silně bazických látek, kde se namísto SiO₂ používají kolony na bázi ZrO₂ [38].

1.8.2.2 Magnetické nosiče

K separaci nukleových kyselin můžeme využít magnetické částice (Obrázek 5), na které se nevratně naváže DNA. Po navázání DNA na magnetické částice se kuličky pomocí magnetu oddělí od zbytku roztoku, který obsahuje kontaminující látky.

Purifikovaná DNA se z nich uvolní po promývání, nejčastěji pomocí ethanolu. Jádro těchto magnetických částic je nejčastěji tvořeno magnetitem nebo maghemitem, ale může být tvořeno i drahými kovy, např. zlatem. Magnetická separace je vhodná k automatizaci a používáme ji tehdy, pokud chceme zpracovat větší počet vzorků. Výtěžky a čistota purifikované DNA jsou srovnatelné se silikátovou extrakcí, je ale možné získat i koncentrovanější DNA a to v menším množství roztoku [39], [40].



Obrázek 5: Magnetická částice [41]

1.9 Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Čistota izolované DNA se dá stanovit pomocí spektrofotometrického měření absorbance v UV části spektra, v rozsahu vlnových délek 220 až 320 nm. DNA má maximální absorbanci při 260 nm a při této vlnové délce lze také stanovit její koncentraci. Tato

koncentrace může být nadhodnocena přítomností RNA, která by měla být odstraněna srážením při samotné izolaci DNA [42].

Vzorek může také obsahovat jiné kontaminanty, a to zbytky bílkovin, jejichž absorbance je maximální při 280 nm. Z poměru hodnot $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ lze zjistit, jakou má vzorek čistotu. Kontaminaci RNA a proteiny dokážeme zjistit z tohoto poměru. Čistá dsDNA má poměr hodnot $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ v rozmezí 1,85–1,88. Při znečištění RNA bude tento poměr zvýšený a při kontaminaci bílkoviny bude snížený. Poměr hodnot $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ je jemným indikátorem látek, které absorbují při 230 nm. Mezi takové látky patří chaotropní soli, EDTA, proteiny a fenol. Poměr hodnot $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ nabývá u čisté dsDNA asi 1,8 [35], [43].

1.10 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce je velmi citlivá metoda, která umožňuje amplifikovat specifický úsek nukleových kyselin pomocí enzymu DNA-polymerázy. Její specifčnost je určena použitím dvou výchozích oligonukleotidových jednotek (primerů), které se komplementárně hybridizují na obou vláknech DNA a ohraničují cílový úsek. Výslednými produkty PCR (polymerase chain reaction) jsou amplikony, což jsou úseky DNA o definované délce [28].

Velikost těchto produktů jsou obvykle desítky až tisíce párů bází. Správný průběh PCR je kontrolován pomocí systému negativních (tato kontrola se používá pro sledování kontaminace PCR komponentů) a pozitivních kontrol (tato kontrola sleduje funkčnost všech složek reakce). Amplikony mohou být analyzovat pomocí metod jako je hybridizace, ELISA nebo sekvenční analýza. K rozdělení DNA fragmentů se využívá gelová elektroforéza (ELFO), z důvodu její jednoduchosti a spolehlivosti.

Nukleové kyseliny mají konstantní poměr velikosti a náboje, protože jednotlivé nukleotidy mají stejnou hmotnost a v zásaditém prostředí negativní náboj. Nejčastěji se používá gel agarosový nebo polyakrylamidový a fragmenty DNA se v gelu dělí na základě velikosti molekul (molekulová síta). Podle velikosti amplikonů volíme různou koncentraci agarosy v gelu, nejčastěji se používá 1–1,5 % gel.

PCR můžeme rozdělit do tří základních kroků [28],[32].

Denaturace dvouřetězcových molekul DNA

Dochází k zahřátí asi na 95 °C, v tomto kroku dochází i k přerušení vodíkových vazeb, díky kterým drží obě vlákna pohromadě. Dojde k rozdělení dvouvláknové DNA na jednovláknovou [44].

Nasedání primerů na oddělené řetězce DNA

V tomto kroku dojde ke snížení teploty cca na 50–60 °C. Dojde k navázání primerů na komplementární sekvence DNA a k vytvoření vodíkových můstků..

Teplota a délka procesu (15–60 s) se odvíjí od délky a sekvenci primeru [44].

Elongace

Dochází ke zvýšení teploty na 72 °C, protože tato teplota je ideální pro aktivitu DNA polymerázy. V tomto kroku DNA polymeráza nasedne na hybridizovaný primer a k jeho 3' konci naváže další nukleotidy. Tímto krokem dojde k proloužení primeru a tvorbě nového komplementárního řetězce DNA. Délka elongace závisí na požadované délce cílové DNA, čím delší je cílová sekvence, tím déle proces trvá.

Cyklickým opakováním těchto kroků se může vytvořit až jedna miliarda kopií daného úseku cílové molekuly. Jestliže by PCR měla 100 % účinnost, z jedné molekuly by vzniklo 2^n molekul (kde n = počet cyklů), v praxi se běžně využívá 20 až 40 cyklů [44].

1.10.1 Komponenty pro PCR

V reakční směsi PCR se setkáme s následujícími složkami:

Matrice DNA (DNA templát)

Matrice je makromolekula DNA, obsahující cílová místa pro primery, podle které se komplementárně syntetizují nové řetězce DNA. Použitá DNA může být z jakéhokoli zdroje, genomická, komplementární či plazmidová. V závislosti na druhu použité DNA se odvíjí její potřebné množství do PCR směsi [45], [46].

DNA polymeráza

DNA polymeráza je enzym, který katalyzuje syntézu nové DNA. Ke katalýze se nejčastěji využívají termostabilní polymerázy, např. Taq DNA-polymeráza izolovaná z mikroorganismu *Thermus aquaticus*. Termostabilita DNA polymerázy je poměrně vysoká, poločas rozpadu je asi 40 minut při 95 °C [45], [46].

Primery

Pokud známe některé informace o sekvencích, můžeme použít metodu PCR, protože sekvence a kombinace primerů ve většině případů určují úspěšnost testu. Pokud je nám známa sekvence, která má být amplifikována, musíme zvolit vhodné primery, které budou splňovat několik základních pravidel. Jejich výběr je poměrně snadný vzhledem ke značnému množství výpočetních nástrojů pro návrh primerů (např. *Genebank* nebo výpočetní program *Primer3*). Pokud není sekvence známa, je výběr primerů mnohem obtížnější, ale stále je možné použití degenerovaných primerů [42] [44].

PCR primer je krátký oligonukleotid, který je speciálně navržen tak, aby byl komplementární s koncovou sekvencí cílového amplikonu. Primery jsou většinou dlouhé 15–25 nukleotidů a musí mít vyvážený obsah G/C a A/T páru (přibližně 50–60 %). Od sekvence primeru se dále odvíjí teplota tání primeru (T_m). Teplotou tání se rozumí teplota, při které je polovina molekul vázána na komplementární sekvenci a druhá polovina vázána není. Teplotu tání zvyšuje přítomnost vodíkových můstků, mezi párem bází A a T jsou dvě vodíkové vazby, zatímco u páru bází G a C jsou tři. Čím více je tedy přítomno G, C párů bází, tím vyšší je potřebná teplota k disociaci primerů od cílové DNA.

Průběh PCR může být ovlivněn i sekvencí primerů. Nukleotidové sekvence primerů by neměli mít komplementární báze a to zejména na 3'konci, protože jinak by primery přednostně nasedaly vzájemně na sebe a vznikaly by dimery primerů. Další problém, který může nastat u sekvence primerů je tzv. vlásenka.

Vlásenka vzniká pokud jsou na primeru dva vzájemně se doplňující segmenty, které začnou nasedat na sebe, místo na cílovou DNA. V takovém případě dojde ke sklopení primeru, čímž vznikne vlásenková struktura [44].

3'-deoxynukleotid-5-trifosfáty (dNTP)

dATP, dCTP, dGTP a dTTP je směs nukleotidů, která tvoří základní stavební kameny pro nové řetězce DNA. Do PCR směsi jsou obvykle přidávány v malých množstvích, za účelem optimální začlenění báze.

Doporučená koncentrace je 0,2 mM, při vyšších koncentracích by dNTP mohlo inhibovat PCR, jelikož vyvazují hořčnaté ionty [45], [46].

Hořčnaté ionty

DNA polymeráza pro svou aktivitu nezbytně potřebuje hořčnaté ionty, protože během PCR umožňují včlenění dNTP. Aktivní místo DNA-polymerázy katalyzuje tvorbu fosfodiesterové vazby mezi fosfátovou skupinou dNTP a 3'koncem primeru. Hořčnaté ionty se v PCR směsi vyskytují ve formě chloridu hořčnatého a dále napomáhají vzniku komplexu primeru a templátu DNA [45].

Při nízké koncentraci hořčnatých iontů dochází ke snížení aktivity DNA-polymerázy s čímž je spojené i malé množství specifického produktu. Naopak vysoká koncentrace způsobuje zvýšenou stabilitu komplexu primer-templát, kdy poté dochází k amplifikaci nespécifických produktů a špatnému začlenění dNTP, což způsobuje vyšší množství replikačních chyb [45], [46].

Voda

Používá se na doplnění reakční směsi pro PCR a ředění vzorků na požadovanou koncentraci. Pro tuto metodu je nejvhodnější voda o odporu 18 mΩ [45], [46].

Pufr pro PCR

Pufr vytváří vhodné prostředí pro aktivitu DNA-polymerázy, ideální pH pufru se pohybuje v rozmezí 8,0 až 9,5 a je stabilizován pomocí tris-HCl. V pufru jsou přítomny draselné i hořčnaté ionty a to v podobě chloridu draselného a chloridu hořčnatého. Draselné ionty podporují hybridizaci primerů.

Pufr většinou dále obsahuje pomocné látky, jako je například acetamid, albumin, či betain. Látky tohoto charakteru zlepšují průběh reakce a stabilizují DNA-polymerázu [45], [46].

1.10.2 Cyclery

Cyclery jsou řízené stroje, které umožňují automatizaci PCR a v současné době jsou nejvhodnějšími přístroji pro provádění PCR v laboratoři, z důvodu jejich velikosti

a rychlosti Mají uživatelsky nastavitelné, teplotně řízené bloky, díky kterým je zajištěno rovnoměrné nastavení teplot a vysoká reprodukovatelnost [28], [32].

1.11 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR)

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce je metoda založena na stejném principu jako klasická PCR, tento typ PCR nám však umožňuje sledovat průběh reakce v reálném čase. Fluorescenční záření a jeho intenzita je měřena v průběhu každého cyklu a je tedy přímo úměrná množství amplikonu přítomného v reakční směsi [28].

Fluorescenční signál může být vytvořen několika způsoby a to buď přidáním interkalačního fluorescenčního barviva, pomocí fluorogenních sond nebo fluorescenčně značenými primery. Přidané interkalační barvivo volně v roztoku emituje světlo, ale emise je výrazně slabší, než když je navázané na dvouřetězcovou DNA. V průběhu PCR se zvyšuje množství nově nasyntetizované DNA, na kterou se váže fluorofor, což může být např. barvivo SYBR GREEN. Pouze při elongaci nám vzniká nová dvouřetězcová DNA, kde barvivo interkaluje do dvouřetězcové DNA a dochází k emisi fluorescence [44].

V průběhu denaturace a při nasedání primerů je většina DNA jednořetězcová, což znamená, že barvivo zůstává volné v roztoku, kde fluoreskuje mnohem méně. Barvivo SYBER GREEN I. má nevýhodu v tom, že jeho intenzita fluorescence roste v přítomnosti jakékoliv dvoušroubovice DNA a nedokáže rozlišit různé sekvence. V tomto případě při vzniku dimerů primerů nespecifických produktů dochází k nadhodnocení výsledné koncentrace DNA [28].

1.11.1 Kvantifikace

Ke kvantifikaci se u Real Time PCR používají metody genové exprese, relativní a absolutní kvantifikace.

Pomocí relativní kvantifikace můžeme analyzovat změny genové exprese vzorku ve srovnání s referenčním vzorkem (například pozitivní kontrola).

Při absolutní kvantifikaci využíváme křivku se standardy o nám známé koncentraci. Vzorky o neznámé koncentraci jsou porovnávány se standardy, u kterých koncentraci známe a koncentrace se zjistí pomocí interpolace [47].

1.11.2 Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM-analýza)

Tato metoda se používá pro analýzu PCR amplikonů, je velmi citlivá, rychlá, přesná a finálně nenáročná technika. V přítomnosti interkalačního barviva, které emituje při navázání na dvoušroubovici DNA signál, dochází k amplifikaci cílových sekvencí DNA. Při teplotě T_m , což je teplota tání, je už polovina párů bází disociovaná [48].

Při postupné denaturaci amplifikované DNA dochází ke snížení fluorescenčního záření. Křivku tání tvoří graf závislosti relativní intenzity fluorescence na teplotě. U DNA s odlišnými sekvencemi je možné křivky tání rozlišit na základě rozdílných tvarů.

Citlivost této metody by měla rozpoznat i amplikony, které se liší pouze v jedné jediné dvojici bází [48].

1.12 Elektroforeza

Elektroforeza se využívá k separaci makromolekul a využívá schopnosti nabitých částic pohybovat se v elektrickém poli. Rychlost pohybu částic je závislá na velikosti celkového povrchového náboje, velikosti, koncentraci v roztoku a také na tvaru.

DNA je záporně nabitá, díky přítomnosti fosfátových skupin, které jsou hlavním nositelem náboje nukleových kyselin. V případě elektroforezy se DNA v elektrickém poli pohybuje od záporné elektrody směrem ke kladné [28].

1.12.1 Gelová elektroforeza

Agarózová gelová elektroforeza je jedna z nejčastějších a nejučinnějších způsobů na vyhodnocování produktů PCR. Tato metoda je schopna oddělit DNA fragmenty různých velikostí. Agaróza je lineární polysacharid, který se izoluje z mořských řas. Strukturu agarózy tvoří galaktózové podjednotky (L- a D- galaktózy), které jsou spojené glykosidickou vazbou.

Během tuhnutí gelu se agarózové polymery kovatelně spojují a začnou tvořit póry o velikosti, která je daná koncentrací gelu. Obecně můžeme říci, že čím hustší gel, tím menší je velikost pórů. Agaróza se dodává v práškové formě a rozvažuje se v TBE pufru (tris-base, kyselina boritá, EDTA) [28].

1.13 Spektrofotometrické stanovení fenolických látek a flavonoidů

Metody pro stanovení celkových fenolických látek jsou obvykle založeny na oxidačně-redukčních vlastnostech, protože fenolické látky fungují jako redukční činidla. Mezi nejpoužívanější metody pro stanovení celkových fenolických látek je spektrofotometrické stanovení podle Folin-Ciocalteua (FCM). Další metody pro stanovení obsahu fenolických látek je metoda podle Price a Butlera (PBM), která využívá aminoantipyrinu (AAPM) a nebo metoda redukce mědi (CUPRAC).

Jednotlivé fenolické látky se stanovují nejčastěji za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi. Jako detektory můžeme použít UV-VIS detekci, nebo detekci diodovým polem (DAD) a hmotnostní detekci (MS) [49].

1.13.1 Metoda FCM

Metoda podle Folin-Ciocalteuava má použitelnost pro různé typy vzorků (ovocné šťávy a extrakty) a je poměrně jednoduchá a levná. Folin-Ciocalteuavo činidlo je čirý roztok žluté barvy, který je připravený z wolframanu sodného, molybdenanu sodného, koncentrované kyseliny chlorovodíkové, kyseliny fosforečné, síranu lithného a destilované vody [50].

Fenolické látky oxidují komplex fosfowolframátufosfomolybdenátu, za vzniku modrých produktů reakce, jejichž množství je přímo úměrné přítomným fenolickým látkám. FCM činidlo reaguje s poměrně širokou škálou sloučenin, proto bude absorpční pík široký a pro analýzu lze použít široký rozsah vlnových délek. Nejčastěji používané vlnové délky pro analýzu jsou 750 nm, 760 nm a 765 nm. Kalibrační křivka se tvoří pomocí přítomnosti kyseliny gallové. Výsledek stanovení koncentrace fenolických látek se pak vyjadřuje jako ekvivalent kyseliny gallové [50].

1.13.2 Metoda PBM

U této metody se k vzorku přidává hexakynoželezitan draselný spolu s chloridem železitým. Při tomto kroku reakce dochází současně k oxidaci fenolátového aniontu na radikál a k redukci hexakynoželezitanu na hexakynoželezitan.

Původní zelená barva směsi se touto reakcí mění na modrou, díky vzniku Berlínské modři. Absorbance je měřena při vlnové délce 720 nm a jako standard se používá kyselina gallová. Výsledek stanovení koncentrace fenolických látek se vyjadřuje jako ekvivalent kyseliny gallové [50].

1.13.3 Metoda AAPM

Tato metoda se liší od předchozích dvou v průběhu reakčního mechanismu. V této metodě dochází k tvorbě komplexu mezi fenolickými látkami a 4-aminoantipyrinem v přítomnosti oxidačního činidla. Výsledkem reakce je barevný komplex, který má chininovou strukturu, proto je tato reakce omezena jen na fenolické látky, které mají schopnost tvořit tyto struktury [50].

Absorbanci barevného komplexu měříme při vlnové délce 470 nm a jako standard se používá kyselina gallová. Výsledky stanovení koncentrace se uvádějí jako ekvivalent kyseliny gallové [50].

1.13.4 Metoda CUPRAC

Metoda spočívá v redukci Cu^{2+} iontů na ionty Cu^+ v prostředí hydroethanolu, při neutrálním prostředí a v přítomnosti činidla neocuproinu (2,9-dimethyl-1,10-fenantrolin). Neocuproin tvoří s měďnatými ionty barevné komplexy, absorbance těchto barevných komplexů je měřena při vlnové délce 450 nm.

Jako standard se používá kyselina gallová nebo tříslová. Výsledky jsou následně vyjádřeny jako ekvivalent příslušné kyseliny. Metoda CUPRAC je cca 1,5× citlivější než metoda FCM [50].

1.14 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC - High Performance Liquid Chromatography) je chromatografická metoda používaná k oddělování složek směsí.

HPLC nám poskytuje rychlou a účinnou separaci s přesnou kvantifikací rozdělených látek. Může být aplikovaná na široké spektrum látek. Ostatní separační metody nedosahují takové přesnosti a citlivosti.

V současnosti je HPLC jedna z nejpoužívanějších separačních metod, protože je částečně automatizovaná, má vysokou rychlost analýzy vzorků a nespotřebovává tolik vzorku k analýze [51], [52].

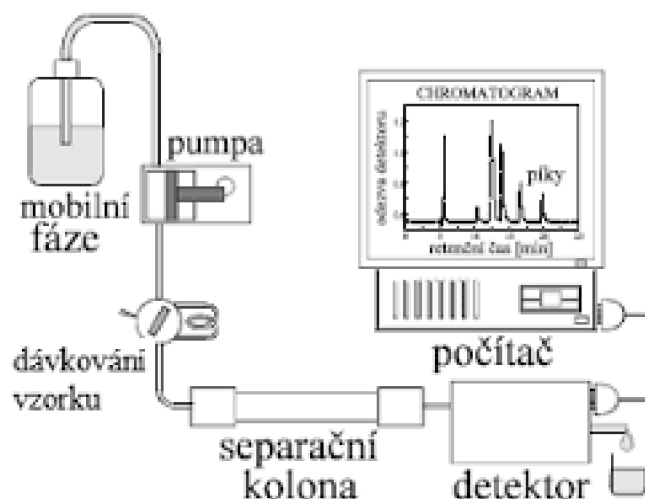
1.14.1 Princip

Separací proces chromatografie je založený na rozdělení vzorku mezi dvě nemísitelné fáze (mobilní a stacionární). Podle afinity k jednotlivým fázím se molekuly vzorku rozdělí. Základní zapojení kapalinové chromatografie znázorňuje (*Obrázek 6*). Dělení je založeno na polární interakci analytů se stacionární fází. Kolona je naplněna neupravenou mhhrozpuštědla jsou postupně z organické mobilní fáze uvolňovány látky, které jsou pevně navázány na stacionární fázi kolony [51].

K zajištění dostatečného průtoku mobilní fáze přes velmi malé částice, kterými je naplněna kolona musí vysokotlaké čerpadlo vyvinout dostatečný tlak (až 40 Mpa). Zároveň musí působit i konstantní nízký průtok, aby nedošlo k tlakovým a objemovým rázům a kolísáním.

HPLC můžeme rozlišovat na základně druhu fází, na normální či reverzní. U reverzního systému je stacionární fáze méně polární než mobilní fáze. Na základě tohoto rozdělení musíme při analýze vzorku volit správný typ kolony a vhodné rozpouštědlo.

Nejčastěji používaným detektorem je UV-VIS detektor pro měření absorbance ve viditelné a ultrafialové oblasti. Podmínkou použití tohoto detektoru je schopnost analytů, které vycházejí z kolony absorbovat světlo o určité vlnové délce. Dalším spektrofotometrickým detektorem může být detektor s diodovým polem (DAD - Diode Array Detector), který umožňuje proměření rozdělených látek při více vlnových délkách nebo v úplně celém spektru. V dnešní době se však nejvíce používá spojení HPLC s hmotnostním spektrometrem. Kapalinovou chromatografií můžeme stanovit různé typy látek, jako jsou aminokyseliny, sacharidy, lipidy, zbytky léků, přírodní a syntetická

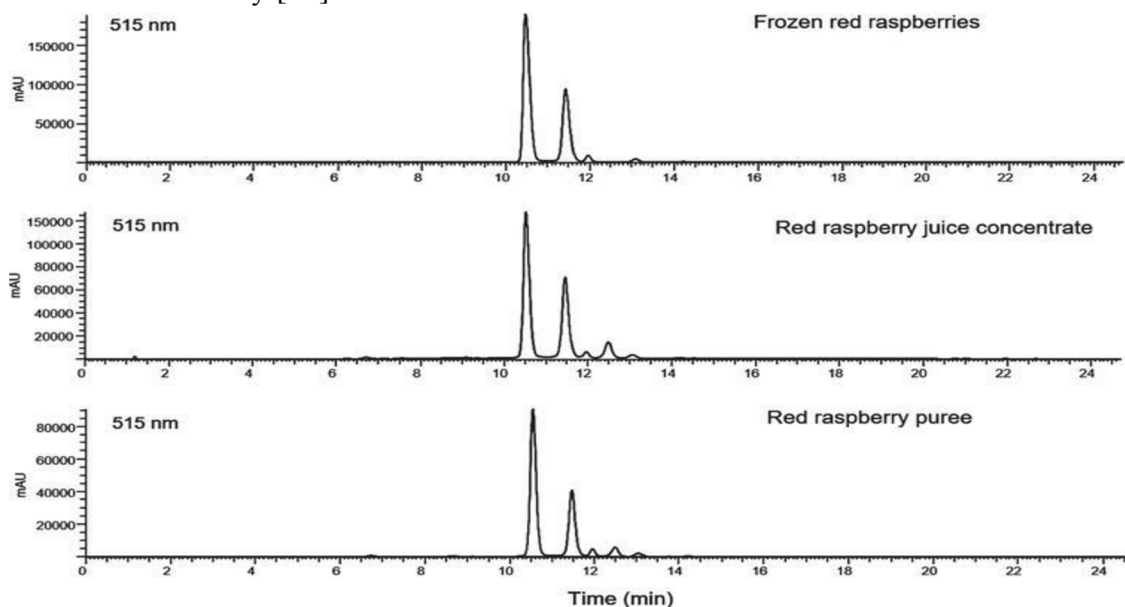


Obrázek 6: Zapojení kapalinové chromatografie [53]

1.14.2 Charakteristika procesu HPLC

Reteční čas je čas, který se analyt zdrží v separační koloně (od nástřiku až po dosažení maxima eluční křivky). Objem mobilní fáze, který je potřebný k eluci se nazývá reteční objem a můžeme jej popsat jako časovou nebo objemovou závislost.

Grafické znázornění chromatografických píků frakcí (Obrázek 7), které vycházejí přes detektor z kolony. Jednotlivé frakce jsou charakterizovány polohou píku na časové ose chromatogramu (retenční/eluční čas). Výška píku je daná odezvou detektoru a udává koncentraci dané látky [52].



Obrázek 7: Chromatogram HPLC (mražené maliny, malinový koncentrát, malinové pyré) [54]

2. CÍL PRÁCE

1. Vypracování literární rešerše
2. Izolace DNA z vybraných potravin a její analýza pomocí multiplex PCR
3. Extrakce vybraných rostlinných metabolitů z potravin a jejich charakterizace pomocí instrumentálních metod
4. Vyhodnocení a diskuze výsledků

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

Bio příkrm jablko, jahody, maliny 190 g

Složení: 83 hm. % jablko, 10 hm. % jahody, 5 hm. % maliny, 2 hm. % borůvky, kyselina askorbová

Datum spotřeby: od ukončeného 5. měsíce věku

Energetická hodnota na 100 g výrobku: 230 kJ/55 kcal

Babylove bio ovocné pyré jablko jahoda, borůvka 100 g

Složení: 76 hm. % jablečné pyré, 19 hm. % jahodové pyré, 5 hm. % borůvkové pyré, kyselina askorbová

Datum spotřeby: od 1 roku věku

Energetická hodnota na 100 g výrobku: 224 kJ/53 kcal

Ovocný materiál

Jahody, maliny i borůvky byly zakoupeny v čerstvé formě v obchodě. Ovocný materiál byl skladován v mrazničce při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2 Chemikálie

- izolační kit Eligene Plant DNA, Elisabeth Pharmacon, ČR
- qPCR 2x SYTO-9, Master Mix, Top-Bio
- PCR ultra H₂O, Top-Bio
- primery (sekvence viz Tabulka, Elisabeth Pharmacon spol., ČR)
- ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA), Serva, Německo
- tris–hydroxymethyl-aminomethan (Tris-báze), Serva, Německo
- kyselina boritá, Penta, ČR
- agaróza pro rutinní použití, Sigma – Aldrich, USA
- DNA standard 100 bp žebříček, Malamité, ČR
- GelRed Nucleic Acid Stain, Midori Green, Biotium
- nanášecí pufr Yellow load a Red Load, TopBio
- methanol, Penta, ČR
- destilovaná voda, FCH VUT, Brno, ČR
- pektináza ze Sigmy

3.3 Přístroje a vybavení

- centrifuga Z216 MK, Hermle, Germany
- Combi-spin FVL-2400N Mini centrifuge, Biosan
- MiniIncubator, Labnet, USA
- váhy KERN 440-33N, 200 digitální

- RotorGene-6000, Corbett Research, UK
- LightCycler® Nano Instrument (Roche, Basel, Švýcarsko)
- Biosan DNA/RNA UV-CLEANER UV/T-AR
- NanoDrop Spectrophotometer 2000, TermoFisher, USA
- zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro Power Supplies 300 V, Labnet International, Woodbridge, USA
- elektroforetické vany, Owl Separation systems, Inc., USA
- Azure Imager c600, Azure biosystem
- PS 0200, Ultrasonic Compact Cleaner
- mikrozkušavky Eppendorf
- Lyofilizátor FreeZone Triad, Labconco
- lednice, mrazák
- laboratorní sklo
- další laboratorní pomůcky (špičky, buničina, pinzety, skalpel...)

3.4 Izolace DNA z rostlinného materiálu

3.4.1 Pracovní postupy

Izolace byla provedena podle přiloženého návodu u izolačního kitu EliGene® Plant DNA Isolation Kit.

Do 1,5 ml mikrozkušavky bylo naváženo 0,2 g homogenizačního písku a 0,05 g vzorku. Pomocí homogenizační špachtle byl vzorek rozmělněn a bylo přidáno 450 µl roztoku P1. Obsah zkumavky byl krátce promíchán.

Bylo připipetováno 50 µl roztoku P2, obsah zkumavky byl krátce zvortexován a nechal se inkubovat při 70 °C 10 minut za občasného míchání.

Dále následovala centrifugace 3 minuty při 10 000 x g a při laboratorní teplotě. Vzniklý supernatant byl odpipetován do nové čisté 1,5 ml mikrozkušavky, bylo přidáno 175 µl roztoku P3. Obsah zkumavky byl zvortexován po dobu 10 s a 5 minut inkubován na ledu.

Obsah zkumavky byl centrifugován při 10 000 x g 3 minuty, při pokojové teplotě. 500 µl supernatantu bylo převedeno do čisté 2 ml mikrozkušavky a k němu bylo dopipetováno 500 µl roztoku P4. Obsah zkumavky byl krátce vortexován. Do zkumavky bylo přidáno 500 µl roztoku P5, vzniklý roztok byl krátce zvortexován a zcentrifugován.

750 µl supernatantu bylo převedeno na kolonku a centrifugováno 1 minutu při 10 000 x g na pokojové teplotě. Odstředěný roztok byl vylit a zbylý supernatant z předchozího kroku převeden na filtr. Opět následovala centrifugace (1 minuta, 10 000 x g, pokojová teplota).

Spinfiltr byl přemístěn do nové 2 ml mikrozkušavky a bylo na něj nanášeno 500 µl roztoku P6. Obsah zkumavky byl zcentrifugován (1 minuta, 10 000 x g, pokojová teplota).

Spinfiltr byl vyjmut ze zkumavky, roztok byl vylit a filtr vrácen zpět. Na filtr bylo napipetováno

500 µl roztoku P7 a proběhla centrifugace (1 minuta, 10 000 x g, pokojová teplota).

Roztok byl opět vylit ze zkumavky a následovala centrifugace (2 minuty, 12 000 x g, pokojová teplota), za účelem úplného vysušení membrány filtru.

Po centrifugaci byl spinfiltr vyjmut a přemístěn do nové suché 2 ml mikrozkuavky. Na filtr bylo nanášeno 100 µl roztoku P8, dále následovala centrifugace (1 minuta, 10 000 x g, pokojová teplota) poté byl vyjmut filtr. Získaná DNA byla ponechána ve zkumavce a uložena do lednice.

3.4.2 Příprava modelových a komerčních směsí

Na přípravu modelových směsí byla použita jednodruhová domácí pyré z jahod, malin, borůvek a jablek. Vícedruhová pyré byla smíchána podle určitých poměrů (*Tabulka 7*).

Všechny komerční i modelové vzorky byly následně lyofilizovány 12 hodin.

Tabulka 7: Zastoupení jednotlivých druhů ovoce v modelových směsích

Vzorek	Jahoda [%]	Malina [%]	Borůvka [%]	Jablko [%]	Jahoda [g]	Malina [g]	Borůvka [g]	Jablko [g]
1	100	0	0	0	20	0	0	0
2	0	100	0	0	0	20	0	0
3	0	0	100	0	0	0	20	0
4	0	0	0	100	0	0	0	20
5	10	5	2	83	4	2	0,8	33,2
6	19	0	5	76	7,6	0	2	30,4

3.4.3 Měření koncentrace a čistoty DNA

U všech izolátů DNA připravených v rámci této práce byla změřena koncentrace na přístroji NanoDrop 2000. Při měření byly použity 2 µl vzorku, jako blank byl použit eluční pufr P8 z izolační sady.

Bylo proměřeno celé spektrum UV oblasti. Na základě hodnoty absorbance při 260 nm byla stanovena koncentrace DNA ve vzorku a z poměrů hodnot $A_{260/280}$ a $A_{260/320}$ byla určena čistota vzorku.

3.4.4 Polymerázová řetězcová reakce

3.4.4.1 Příprava směsí pro PCR

Komponenty pro PCR byly rozmrazeny a promíchány. Směsi pro PCR byly namíchány ve speciálním sterilním boxu podle tabulek 8 a 9.

DNA templát byl přidán v jiném sterilním boxu. Oba boxy byly před použitím vysterilizovány UV zářením.

Tabulka 8: Komponenty pro singleplex PCR směs a použité objemy pro jeden vzorek

Komponent	Objem [μl]
Voda	9,5
SYTO 9 MasterMix	12,5
Primer 1	1
Primer 2	1
DNA templát	1

Tabulka 9: Komponenty pro triplex PCR směs a použité objemy na jeden vzorek

Komponent	Objem [μl]
Voda	4,25
SYTO 9 MasteMix	12,5
Pár primerů BHLH 3	2x 0,75
Pár primerů GAST 1	2x 1,5
Pár primerů RiACO 1	2x 0,375
DNA templát	3

3.4.4.2 Použité primery a jejich sekvence

Tabulka 10: Primery pro PCR a jejich sekvence

Primery S3 -R a S2-F jsou ve zbytku práce nazývány jako ITS 2 primery.

Primery	-Sekvence primeru 5'→3'	Citace
<i>ITS 2</i>		
S3-R	GAC GCT TCT CCA GAC TAC AAT	[55]Error! Reference source not found.
S2-F	ATG CGA TAC TTG GTG TGA AT	
<i>BHLH 3</i>		
BHLH 3-R	GGA ATC ATT AGG GAA ACT GGG TA	[56]
BHLH 3-F	AAA TG GATT TGC TGT TAT GGG TG	
<i>GAST 1</i>		
GAST 1-R	TTA AGG ACA CTT GCG TTT GC	[57]
GAST 1-F	GAC AAC ATG CTT CAC TTC TTG C	
<i>RiACO 1</i>		
RiACO 1-R	AAA CTC CTT CAT CAC CTT CCT GTA G	[58]

RiACO 1-F	AAT TGT TTG GAG CAG AGA TTC AAG G	
-----------	-----------------------------------	--

3.4.4.3 Teplotní profil PCR reakce

Tabulka 11: Teplotní profil PCR reakce

Krok		Teplota [°C]	Čas [s]
Úvodní denaturace		95	600
Denaturace	35 cyklů	95	2
Hybridizace primerů		52	15
Elongace		72	25
Závěrečná elongace		72	300

3.4.5 Detekce produktů PCR pomocí agarózové gelové elektroforézy

Gel na elektroforézu byl připraven z 0,5x TBE pufru a agarózy (54 g Tris báze; 27,5 g kyseliny borité; 40 ml 0,5 M EDTA; doplněno destilovanou vodou do objemu 1 litru a následně 10× zředěno). Byl připraven 1,2 % agarózový gel. V Erlenmeyerově baňce bylo smícháno 100 ml 0,5x TBE pufru a 1,2 g agarózy. Směs byla pomocí mikrovlnné trouby opakovaně přivedena k varu až do úplného rozpuštění agarózy. Takto připravený gel se nechal schládnout asi na 50 °C, následně bylo přidáno 10 µl fluorescenčního barviva GelRed, případně 5 µl barviva MidoriGreen.

Gel byl nalit do předem připravené formy a byl do něj vložen hřebínek. Po 30 minutách tuhnutí byl hřebínek vyjmut a do jedné z komůrek bylo nanášeno 5 µl délkového standardu. PCR produkty byly smíchány v poměru 5 ku 1 s nanášecím pufrům. Z této vytvořené směsi bylo pipetováno 15 µl do jednotlivých komůrek připravených v gelu.

Forma s gelem byla vložena do elektroforetické vany a zalita 0,5x TBE pufrům po rysku. Elektroforetická vana byla připojena ke zdroji napětí. Elektroforéza probíhala 90 minut při napětí 80 V. Po skončení elektroforézy byl gel vyfocen při vlnové délce 302 nm v UV transluminátoru Azure Imager.

3.4.6 Příprava extraktů pro HPLC

Z lyofilizovaného ovoce a směsi z postupu v kapitole (3.4.2) bylo odváženo 0,25 g do 2 ml mikrozkumavek. Následně bylo v digestoři přidáno 1,25 ml methanolu a víčko zkumavky bylo zaparafilováno. Mikrozkumavky byly umístěny do plováku do ultrazvukové lázně na 30 minut.

Dále byly vzorky centrifugovány při 12 000 rpm po dobu 10 minut. Poté byl supernatant přepipetován do čisté 1,5 ml mikrozkumavky. Do zcentrifugovaného sedimentu bylo znova v digestoři napipetováno 1,25 ml methanolu a celý proces se opakoval. Takto vzniklý supernatant byl přefiltrován přes 0,45 µm PTFE filtr a následně byl použit při HPLC analýze [59].

Parametry HPLC chromatografu

Kolona:	Kinetex F5 C18 150 × 4,6 mm, velikost částic 2,6 μm
Nástřík vzorku:	20 μl
Mobilní fáze (MF):	MF A: acetonitril MF B: 0,1 % TFA v deionizované vodě
Průtok mobilní fáze:	0,4 ml/min
Detektor:	ThermoScientific PDA detector
Teplota kolony:	35 °C
Doba analýzy:	30 minut
Eluce:	gradientová

Analýza byla provedena gradientovou elucí, jejíž parametry jsou uvedeny v (*Tabulka 12*). Kolona a autosampler byly vyhřívány termostatem na teplotu 35 °C. PDA detektor byl nastaven na vlnové délky 260, 280, 300 a 680 nm.

Tabulka 12: Parametry gradientové eluce

Čas [min]	MF A [%]	MF B [%]
0	10	90
1	10	90
5	12	88
10	25	75
15	40	60
20	55	45
22	70	30
30	10	10

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Molekulárně-biologické metody

4.1.1 Izolace DNA

Izolace DNA z malin, jahod a borůvek byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole (*Error! Reference source not found.*). Koncentrace a absorpční spektra izolované DNA byly proměřeny spektrofotometricky v UV oblasti na přístroji NanoDrop 2000. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 13. (*Tabulka 13*).

Výsledná koncentrace DNA maliny je $11,66 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, jahody $38,1 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, borůvky evropské $13,2 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ a borůvky kanadské $25,0 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Dle poměru absorbancí $A_{260/280}$ jsou u všechny vzorky mírně kontaminované RNA. Ideální hodnota pro čistou DNA se pohybuje okolo 1,85-1,88. Poměr absorbancí $A_{260/230}$ je u všech vzorků nižší než ideální hodnota (asi 1,8), což by mohlo značit přítomnost zbytků činidel z izolačního kitu, fenolických látek nebo proteinů [43].

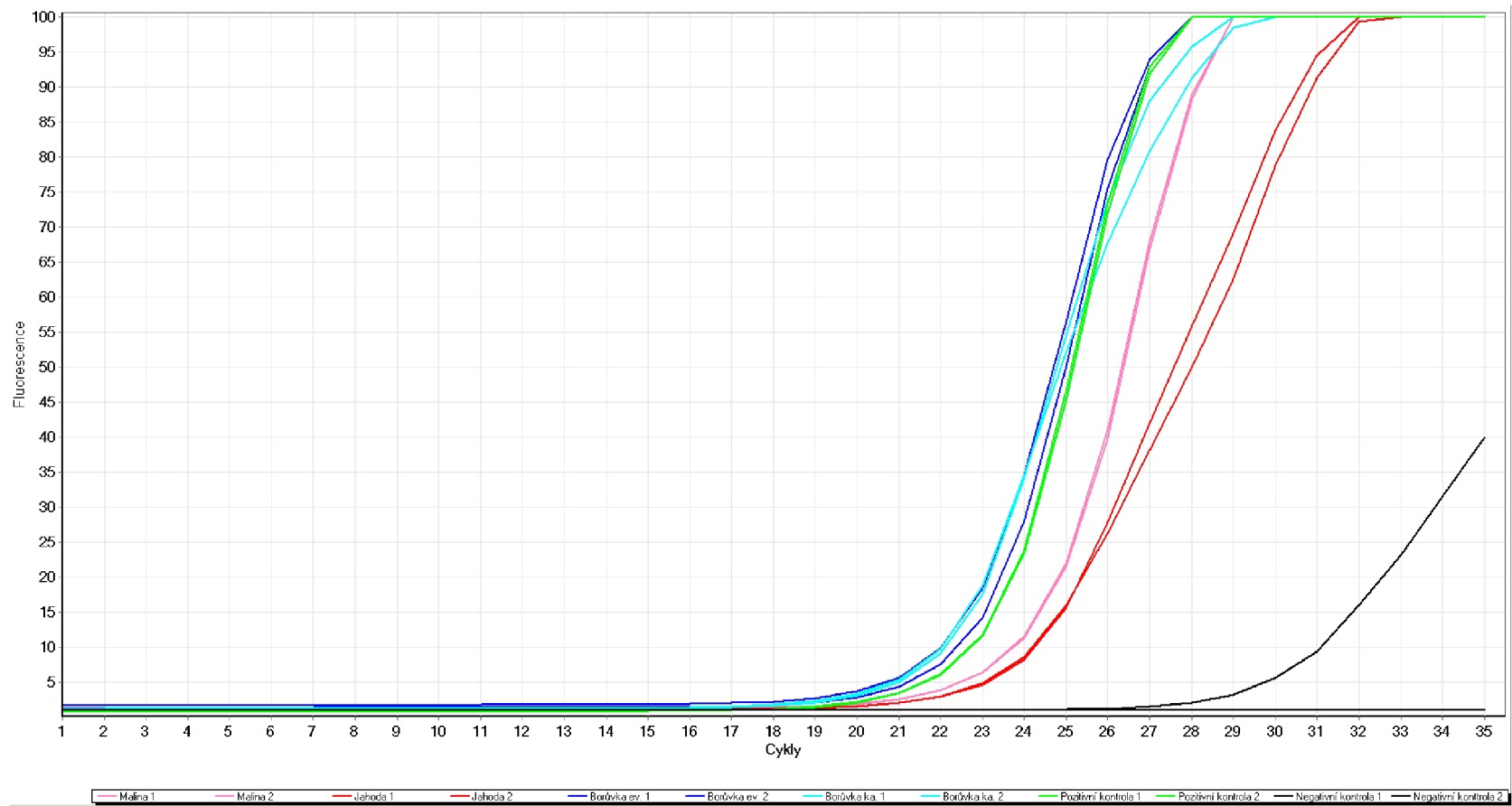
Tabulka 13: Výsledná koncentrace izolované DNA z plodů

Vzorek	Název	c [ng/μl]	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
1	Malina	11,66	1,99	0,90
2	Jahoda	38,1	2,07	1,45
3	Borůvka evropská	13,2	1,92	0,62
4	Borůvka kanadská	25,0	1,91	0,78

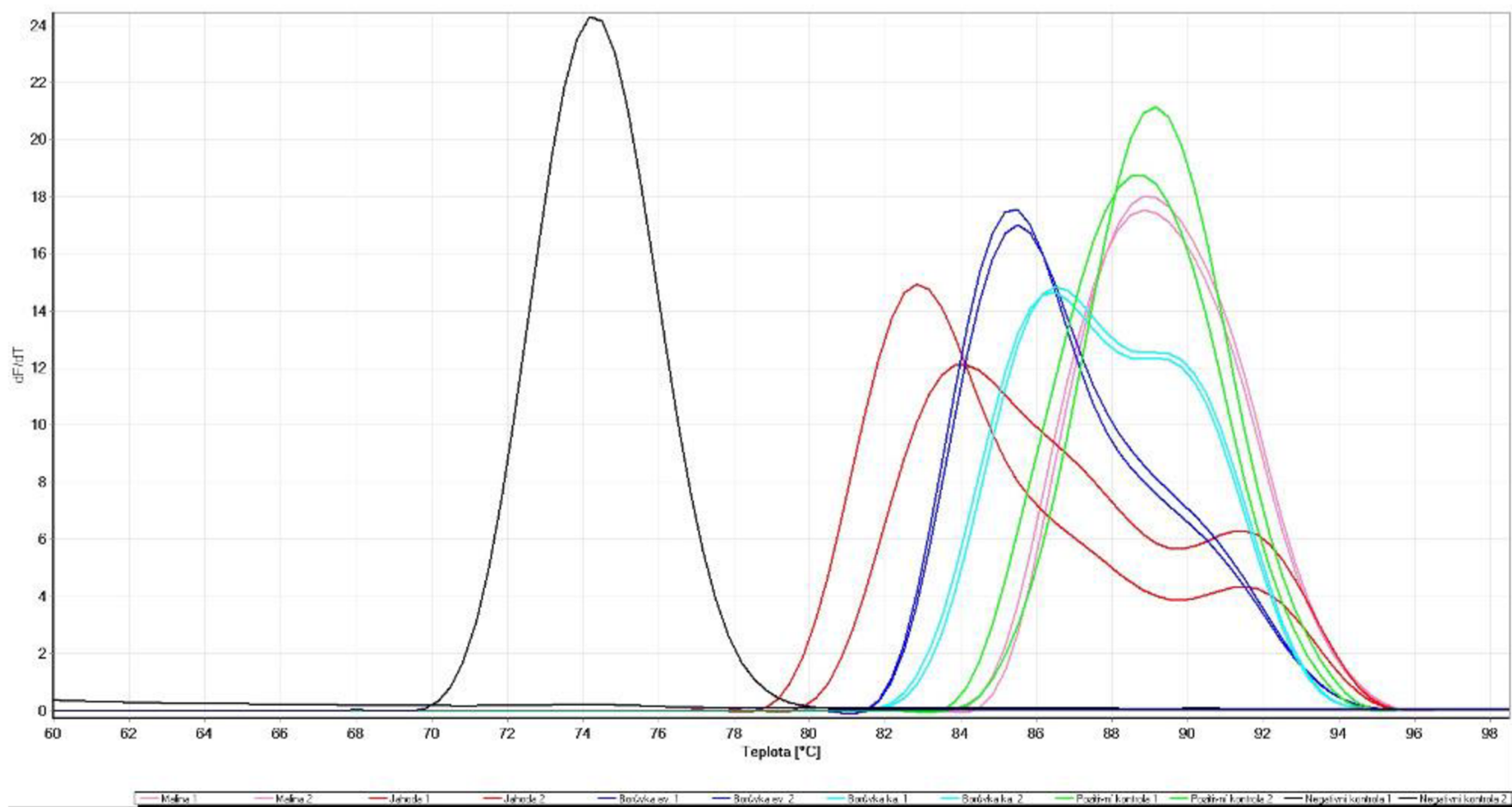
4.1.2 Ověření amplifikovatelnosti DNA

Pro ověření amplifikovatelnosti DNA izolované z plodů malin, jahod a borůvek byly využity primery ITS 2. Amplifikační křivky jsou zobrazeny na (*Obrázek 8*). K detekci produktů u pozitivní kontroly došlo v 19. cyklu. U vzorků maliny a jahody došlo k detekci produktů ve 20. cyklu, u evropské a kanadské borůvky v 18. cyklu. V pozitivních kontrolách (DNA z plodu maliny, u které byla dříve prověřena amplifikovatelnost) byl detekován pík pro specifický produkt s teplotou tání $89,2 \text{ }^\circ\text{C}$ a $88,9 \text{ }^\circ\text{C}$ (*Obrázek 9*).

U všech vzorků, kromě negativní kontroly došlo k amplifikaci. U vzorků maliny byl detekován specifický produkt se stejnou teplotou tání jako produkty v pozitivní kontrole. U vzorků jahody 1 a jahody 2 došlo k detekci specifického produktu s teplotou tání $91,5 \text{ }^\circ\text{C}$. U vzorků evropské borůvky jsou patrné píky se specifickým produktem a teplotou tání $85,5 \text{ }^\circ\text{C}$ u obou vzorků. U vzorku kanadské borůvky jsou patrné dva píky při teplotách tání $86,5 \text{ }^\circ\text{C}$ a $87,5 \text{ }^\circ\text{C}$.



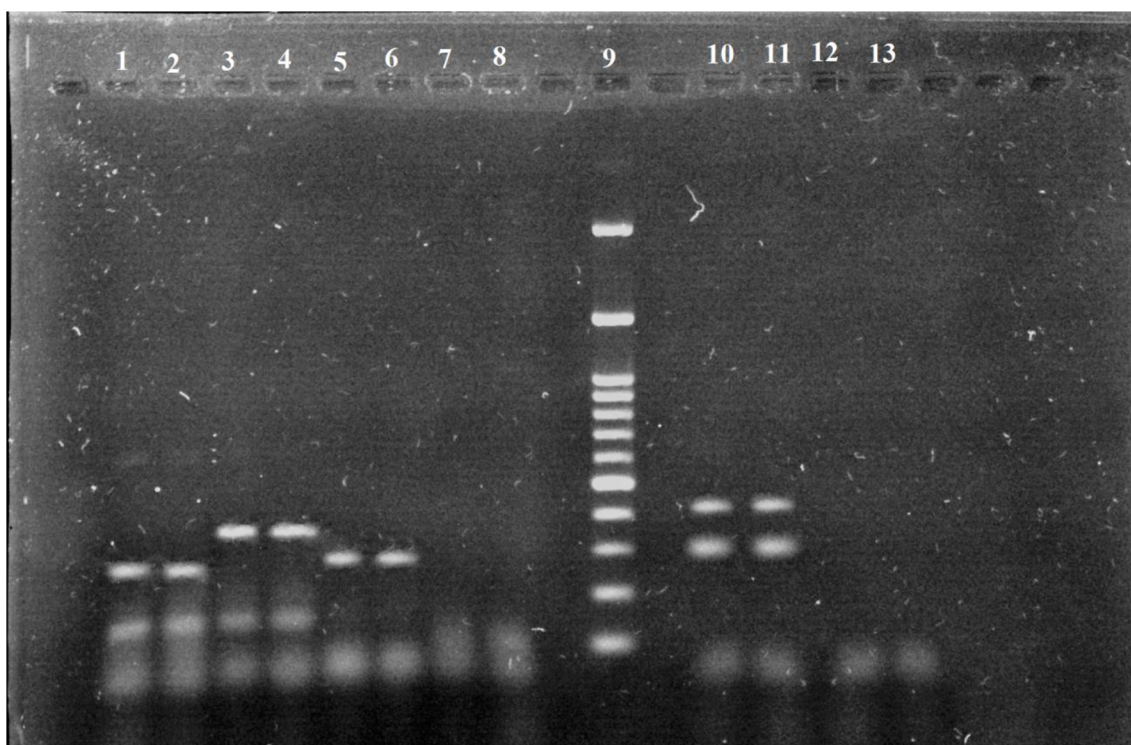
Obrázek 8: Amplifikační křivky DNA izolované z plodů, primery ITS 2



Obrázek 9: Křivka tání ampliconů DNA izolované z plodů, primery ITS 2

4.1.2.1 Elektroforéza real-time PCR produktů při použití ITS 2 primerů u DNA izolované z plodů

Následně po real-time PCR byla provedena elektroforéza produktů. V běhu 1 až 8 se nacházejí vzorky DNA izolované z plodů podle (Tabulka 14). V běžích 1 až 6 se vzorky amplifikovaly a vytvořily specifický produkt o délce přibližně 450 až 500 bp, což odpovídá délce produktů detekovaných v pozitivních kontrolách (běhy 10 a 11). V běhu číslo 10 a 11 se nachází pozitivní kontrola, dále v běhu 12 a 13 kontrola negativní, která zůstala čistá. Výsledek je zobrazen na (Obrázek 10).



Obrázek 10: Agarózový gel produktů za použití ITS 2 primerů

Tabulka 14: Výsledek elektroforézy u amplifikace DNA z plodů za použití ITS 2 primerů

Běh	DNA	Specifický produkt
1	Malina 1	+
2	Malina 2	+
3	Jahoda 1	+
4	Jahoda 2	+
5	Borůvka evropská 1	+
6	Borůvka evropská 2	+
7	Borůvka kanadská 1	-
8	Borůvka kanadská 2	-
9	DNA standard 50 bp	-
10	Pozitivní kontrola 1	+
11	Pozitivní kontrola 2	+
12	Negativní kontrola 1	-
13	Negativní kontrola 2	-

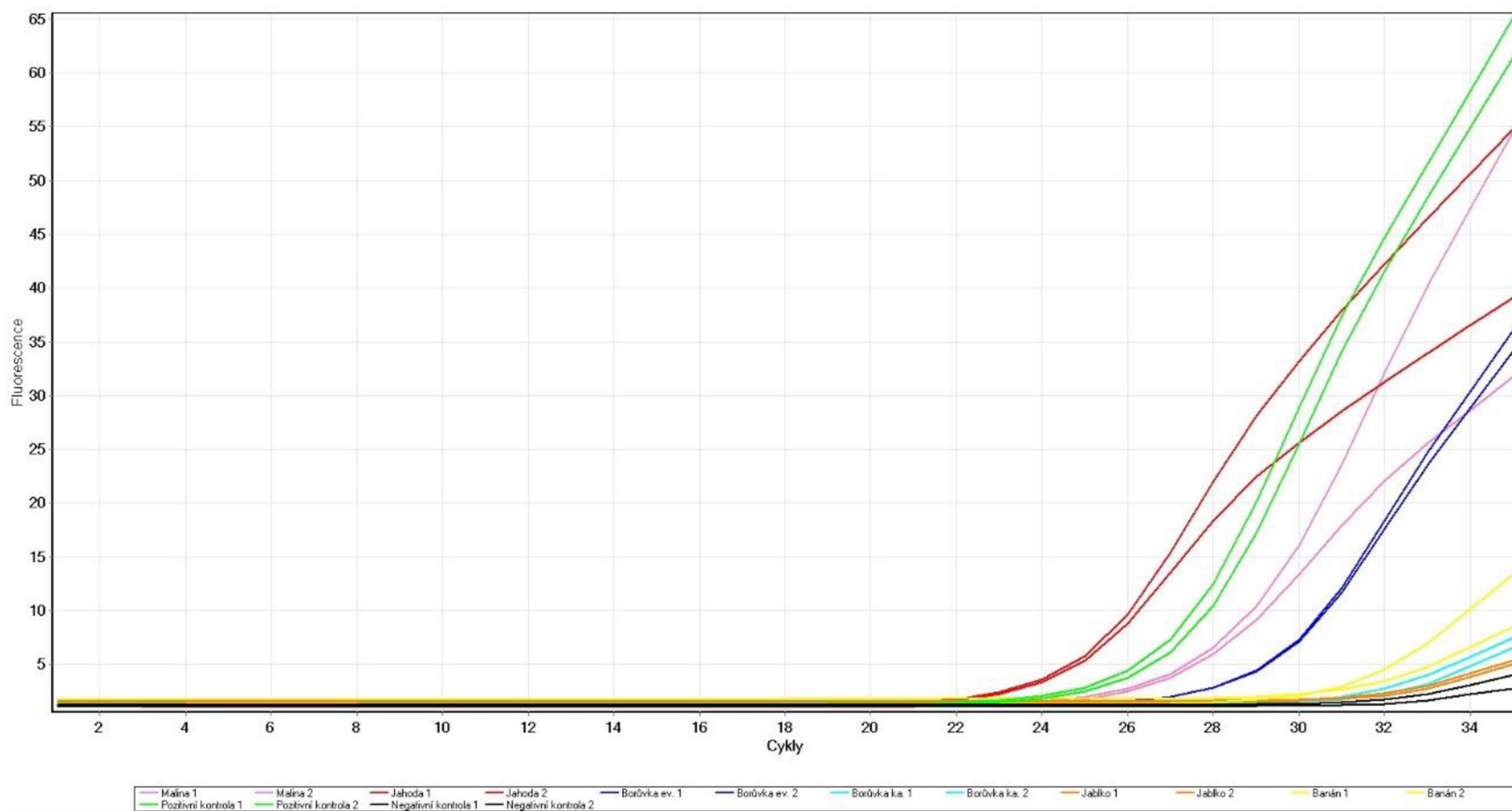
4.1.3 Ověření specifity primerů BLHL3, GAST1, RiACO1 a jejich funkčnosti v triplex PCR

Pro ověření funkčnosti primerů BLHL 3, GAST 1 a RiACO 1 byla s těmito primery provedena triplex real-time PCR. Sekvence těchto primerů jsou uvedené v (Tabulka 10). Složení reakční směsi je uvedeno v (Tabulka 9). Do PCR směsi pro pozitivní kontrolu bylo přidáno po 1 μ l DNA z maliny, jahody a evropské borůvky, vyředěné na 10 ng/ μ l. Do PCR směsi pro ověření specifity primerů byly přidány 3 μ l DNA z maliny, jahody, evropské borůvky, kanadské borůvky, jablka, nebo banánu opět zředěné na koncentraci 10 ng/ μ l. (Obrázek 11) zobrazuje amplifikační křivky real-time PCR produktů vzniklých ve výše uvedených reakčních směsích.

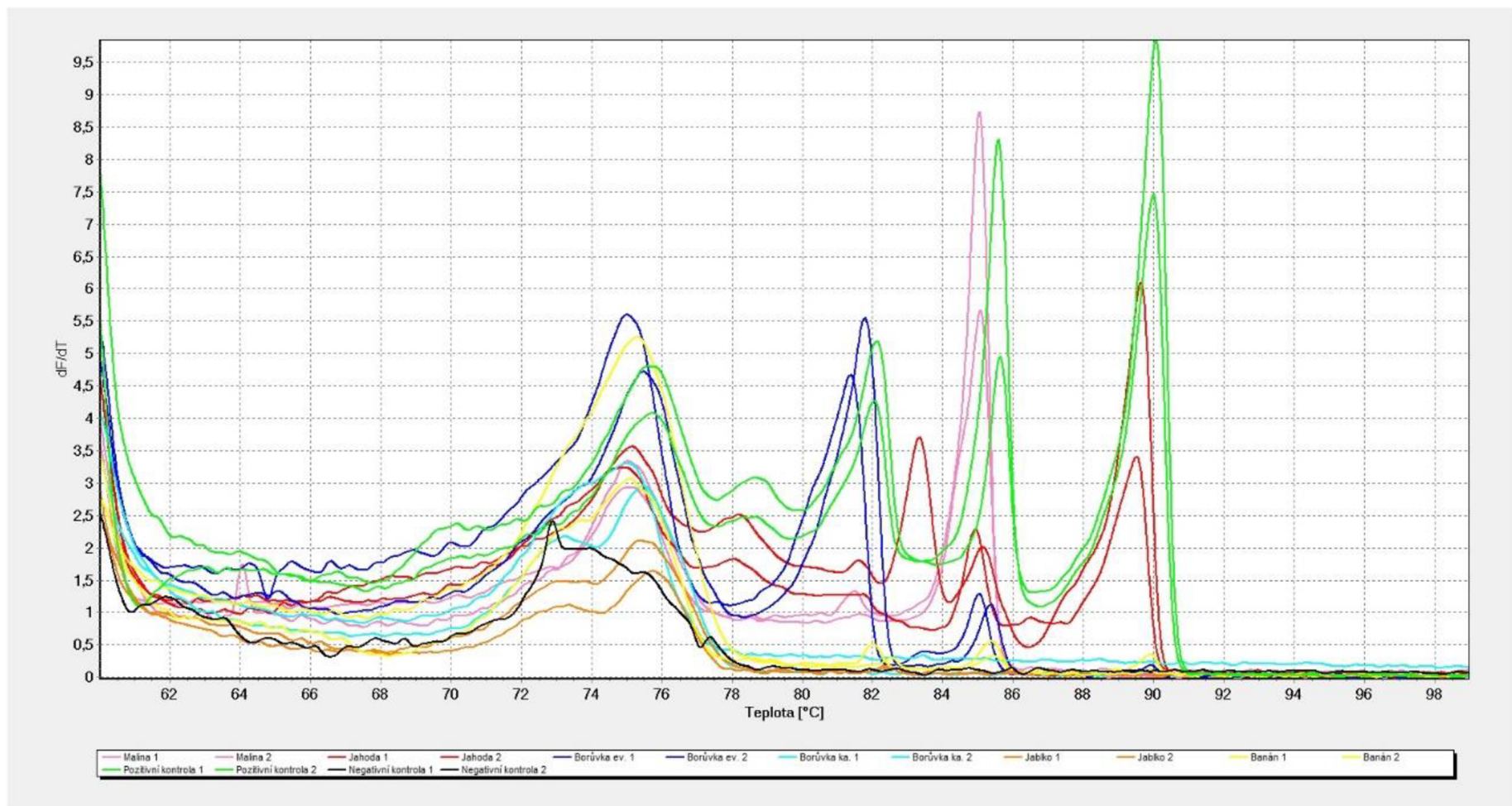
Začátek amplifikace byl pozorován ve 26. cyklu pro borůvku evropskou, zatímco pro borůvku kanadskou až ve 30. amplifikačním cyklu. Pro jahodu byl začátek amplifikace zaznamenán ve 22. amplifikačním cyklu a pro malinu byl zaznamenán ve 24. cyklu. Amplifikační křivka pro jablko a banán se začala mírně zvedat ve 30. cyklu. (Obrázek 11) zobrazuje křivky tání amplikonů vzniklých pomocí výše uvedených primerů. V pozitivní kontrole vidíme tři specifické píky pro tři specifické produkty. U maliny můžeme pozorovat dva píky, z nichž první má teplotu tání přibližně 75 °C a jedná se o dimery primerů (Obrázek 12), jak následně potvrzuje výsledek elektroforézy těchto vzorků. Druhý pik je specifický produkt, který se shoduje se specifickým produktem v pozitivní kontrole, teplota tání tohoto produktu je 87,2 °C V případě vzorků jahody také pozorujeme dva píky, z nichž první má u vzorku jahody 1 teplotu tání přibližně 74 °C a u vzorku jahody 2 přibližně 75 °C. Jedná se o dimery primerů. Druhý pik u jahod, je specifický produkt, který se shoduje specifickým produktem u pozitivní kontroly, teplota tání je 89,2 °C. U evropské borůvky také detekujeme dva píky, první z nich patří dimerům primerů, teplota tání je přibližně 75 °C. Druhý pik je specifický produkt,

s teplotou tání 81,2 °C, který je shodný se specifickým produktem v pozitivní kontrole. U borůvky kanadské nedošlo k tvorbě specifických produktů.

Tři páry primerů fungovaly pro DNA z maliny, jahody a evropské borůvky. V případě borůvky kanadské primer BHLH 3 nebyl dostatečně specifický, vhodnější by byl jiný primer ze skupiny BHLH. U jablka a banánu se také nevytvořil specifický produkt, což znamená, že tyto primery jsou specifické pouze pro jahodu, malinu a borůvku.



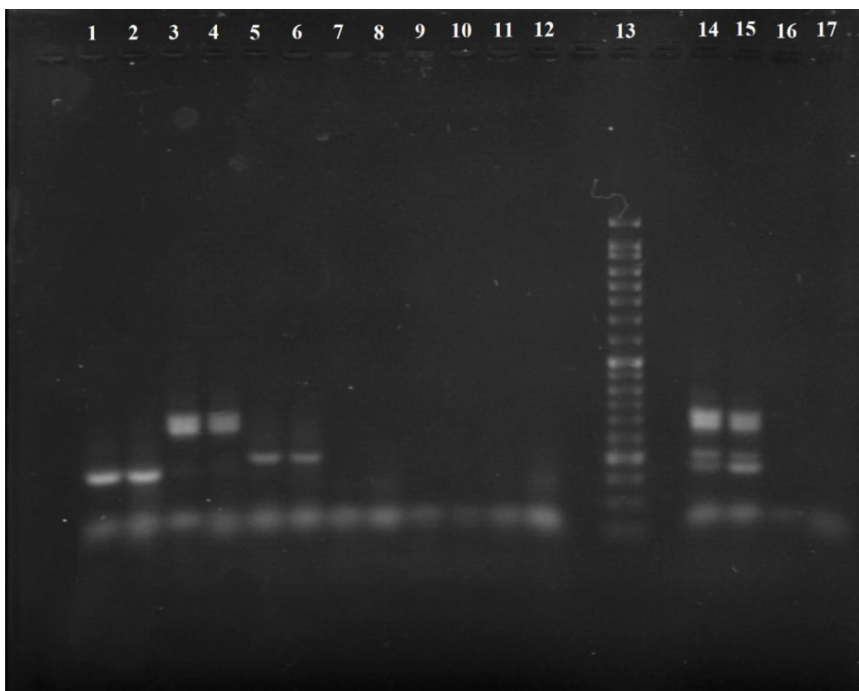
Obrázek 11: Amplifikační křivka reakčních směsí za použití primerů BHLH 3 GAST 1 a RiACO 1



Obrázek 12: Výsledek HRM analýzy funkčnosti primerů

4.1.3.1 Elektroforéza real-time PCR produktů po stanovení specifity

Následně po real-time PCR byla provedena elektroforéza produktů (Tabulka 15). Podle výsledků můžeme usoudit, že specifické produkty se vytvořily pouze u běhů 1 až 6, ale nedošlo k tvorbě trojbandů. V běhu 9 až 12 se nacházela jablková a banánová DNA, proto nejsou amplikony viditelné. Výsledek je zobrazen na (Obrázek 13).



Obrázek 13: Agarózový gel produktů za použití primerů BHLH 3, GAST 1 a RiACO 1

Tabulka 15: Agarózový gel pro ověření produktů druhově specifických primerů

Běh	DNA	Specifický produkt
1	Malina 1	+
2	Malina 2	+
3	Jahoda 1	+
4	Jahoda 2	+
5	Borůvka evropská 1	+
6	Borůvka evropská 2	+
7	Borůvka kanadská 1	-
8	Borůvka kanadská 2	-
9	Jablko 1	-
10	Jablko 2	-
11	Banán 1	-
12	Banán 2	-
13	DNA standard 50 bp	-
14	Pozitivní kontrola 1	+
15	Pozitivní kontrola 2	+
16	Negativní kontrola 1	-
17	Negativní kontrola 2	-

4.1.4 Stanovení citlivosti triplex PCR

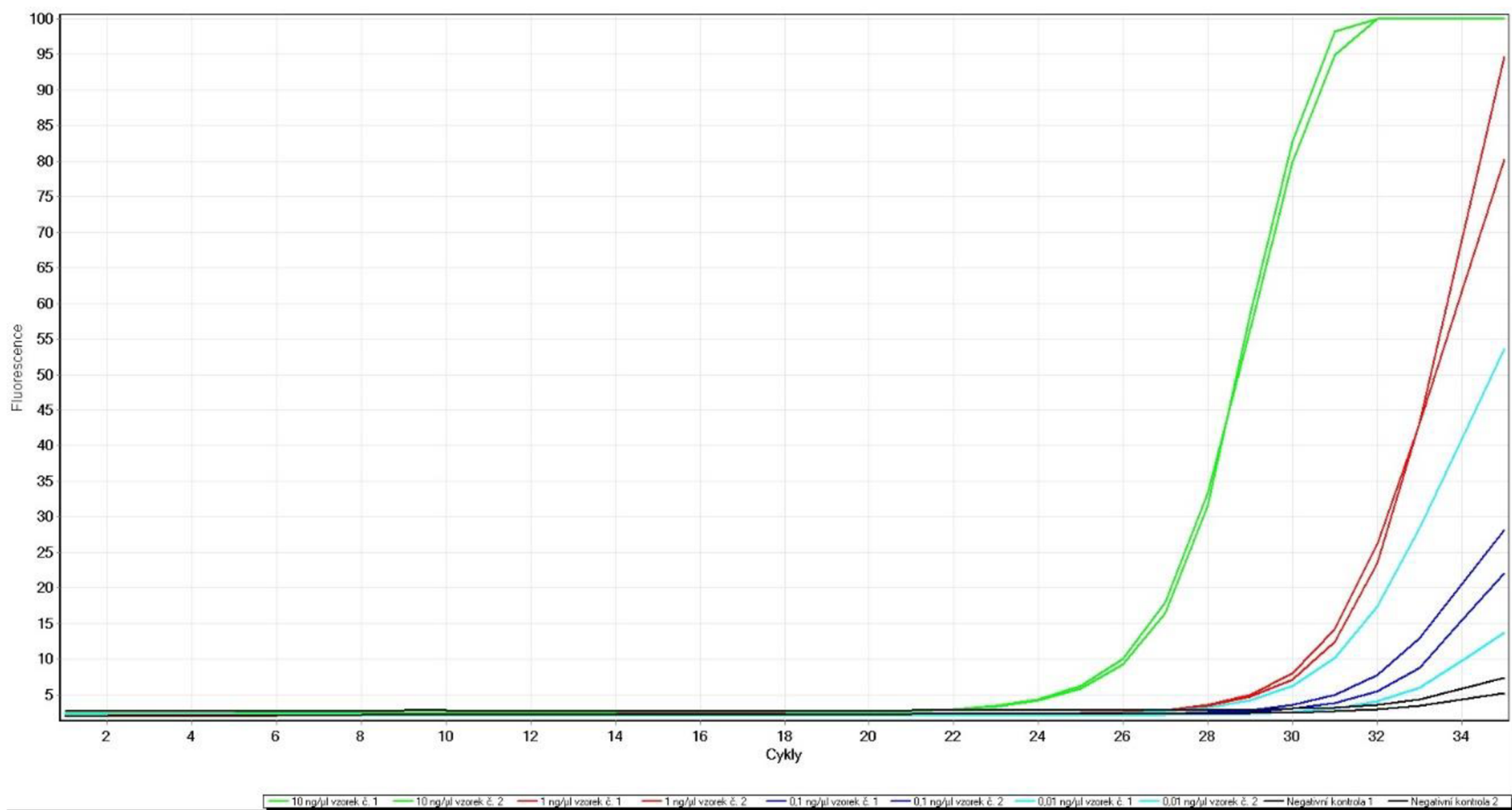
Pro stanovení citlivosti primerů BHLH 3, GAST 1 a RiACO 1 byla s těmito primery provedena triplex real-time PCR, při které se zjišťovalo, jaké nejnižší množství DNA dokážou tyto primery detekovat a amplifikovat ji. Nejprve byly vzorky jahody, maliny, borůvky evropské a kanadské rozředy na vzorky o koncentracích $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, $0,1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a $0,01 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

Vzorky o koncentraci $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ se začaly amplifikovat už v 22. cyklu. Ve 27. cyklu se začaly amplifikovat vzorky o koncentraci $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Vzorky o koncentraci $0,1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ se začaly amplifikovat až ve 29. cyklu. Vzorky s nejnižší koncentrací DNA, tedy $0,01 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ se také zdánlivě amplifikovaly. Vzorek č. 1 o koncentraci $0,01 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ se začal amplifikovat už ve 28. cyklu, zatímco vzorek č. 2 až v 32. cyklu (Obrázek 14).

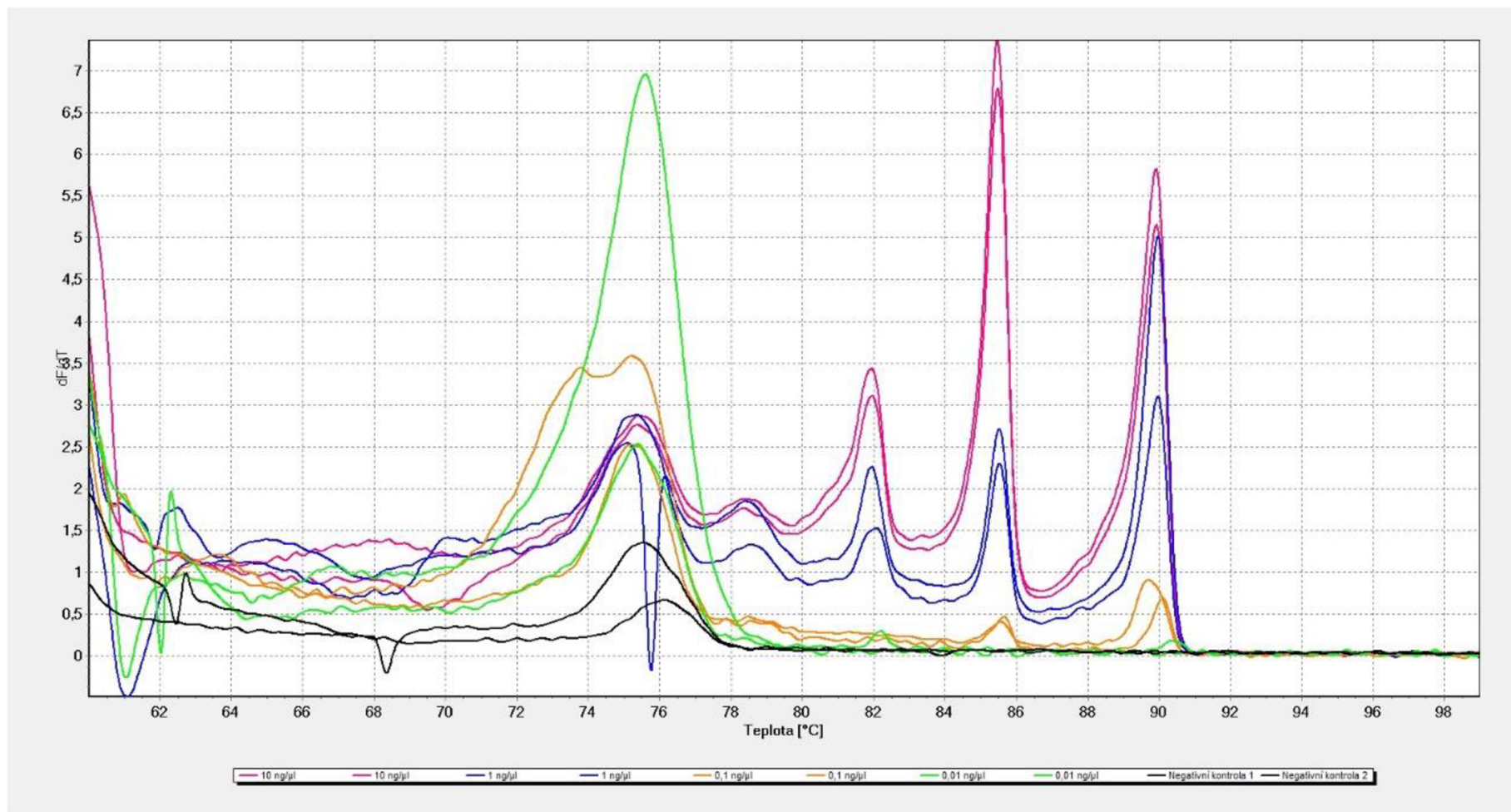
U koncentrace $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ můžeme pozorovat tři píky, pro specifické produkty, jejichž teplota tání je $81,9 \text{ }^\circ\text{C}$, $85,5 \text{ }^\circ\text{C}$ a $89,2 \text{ }^\circ\text{C}$. U vzorků s koncentrací $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ můžeme pozorovat 4 píky, z nichž první má teplotu tání přibližně $74 \text{ }^\circ\text{C}$ – $76 \text{ }^\circ\text{C}$ a jedná se o dimery primerů. Další tři píky patří specifickým produktům o teplotě tání $81,9 \text{ }^\circ\text{C}$, $85,5 \text{ }^\circ\text{C}$ a $89,2 \text{ }^\circ\text{C}$. Vzorky o koncentraci $0,1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ mají odlišné křivky tání, u obou vzorků můžeme pozorovat dva píky, ale nejedná se o specifické produkty. Vzorky o koncentraci $0,01 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ mají velmi odlišné křivky tání, u obou vzorků pozorujeme dva píky (Obrázek 15), ale nejedná se o specifické produkty, jak potvrzuje i výsledek následně elektroforézy těchto vzorků.

Obecně můžeme říci, že primery BHLH 3, GAST 1 a RiACO 1 dokáží zachytit i DNA o koncentraci $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Pro lepší posouzení této metody by bylo vhodnější použít DNA

vyizolovanou z mladých listů rostliny, než z plodů. Kontaminující látky v DNA z plodů mohly rušit stanovení a citlivost se tím pádem mohla zdát nižší, než ve skutečnosti byla.



Obrázek 14: Amplifikační křivka u stanovení citlivosti PCR za použití primerů BHLH 3, GAST 1 a RiACO1

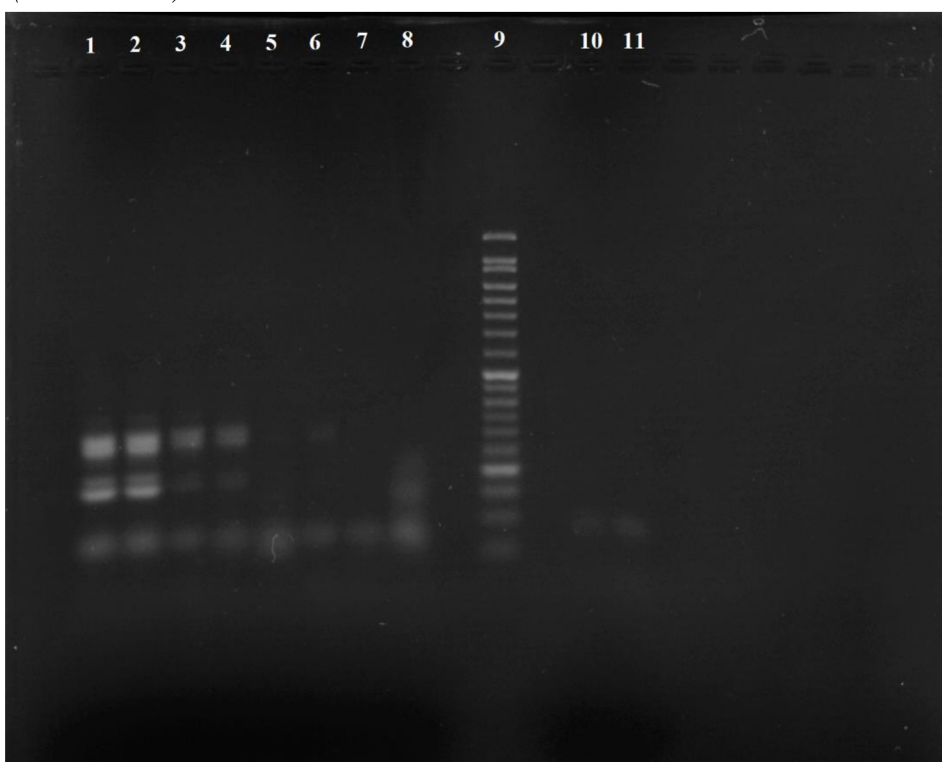


Obrázek 15: HRM analýza citlivosti primerů

4.1.4.1 Elektroforéza real-time PCR produktů po stanovení citlivosti

Po stanovení citlivosti PCR byla provedena elektroforéza produktů. V běžích 1 až 8 byly napipetované vzorky, uvedené v (Tabulka 16), se snižující se koncentrací DNA. V prvním a druhém běhu můžeme pozorovat trojbandy, jejichž velikost je 300 bp, což je specifický produkt primerů BHLH 3.

Specifický produkt pro primer GAST 1, má mírně delší a méně výrazný band a jeho délka je okolo 150 bp. Naopak specifický produkt pro primer RiACO 1, má band krátký a výrazný a jeho délka je 150 bp. Tyto tři bandy jsou viditelné i ve třetím a čtvrtém běhu. V běžích 5 a 6 vidíme pouze specifický produkt primerů BHLH 3. Negativní kontrola je v běžích 10 a 11, kde pozorujeme vznik dimerů primerů. Výsledek je zobrazen na (Obrázek 16).



Obrázek 16: Agarózový gel produktů za použití primerů BHLH 3, GAST 1 a RiACO 1

Tabulka 16: Agarózový gel po ověření produktů citlivosti PCR

Běh	DNA	Specifický produkt
1	10 ng/μl vzorek 1	+
2	10 ng/μl vzorek 2	+
3	1 ng/μl vzorek 1	+
4	1 ng/μl vzorek 2	+
5	0,1 ng/μl vzorek 1	+
6	0,1 ng/μl vzorek 2	+
7	0,01 ng/μl vzorek 1	-
8	0,01 ng/μl vzorek 2	-
9	DNA standard 100 bp	-
10	Negativní kontrola 1	-
11	Negativní kontrola 2	-

4.1.5 Izolace DNA z modelových a komerčních pyré

Byly připraveny modelové směsi z jahod, malin, borůvek a jablka (*Tabulka 7*), na základě složení zakoupených pyré a přeseňávek. Z těchto modelových a komerčních směsí byla izolována DNA podle postupu v kapitole (*Error! Reference source not found.*) Koncentrace a čistota izolované DNA byla stanovena spektrofotometricky na přístroji NanoDrop 2000. Výsledky jsou uvedeny v (*Tabulka 17*).

Koncentrace DNA se u modelových směsí pohybovala 1–4,6 ng·μl⁻¹, zatímco u komerčních směsí byla koncentrace DNA přibližně poloviční (Bio příkrm) až čtvrtinová (Babylove).

Poměry absorbancí A_{260/280} se u většiny vzorků pohybovaly v rozmezí 1,1–1,5, ideální hodnota pro čistou DNA se pohybuje okolo 1,85. Vzorky, které měly tento poměr vyšší mohly být kontaminované RNA, avšak pokud je tento poměr nižší vzorky mohou být kontaminované bílkovinami. Vzorek Bio příkrm měl jako jediný hodnotu blížíci se 1,85–1,88, což mohlo být způsobeno přítomností bílkovin. Poměry absorbancí A_{260/230} byly u všech vzorků nízké. Tyto hodnoty mohou být nízké kvůli přítomnosti polyfenolů, které mají maximum absorpance při vlnové délce 230 nm.

Tabulka 17: Spektrofotometricky stanovená koncentrace a čistota DNA u komerčních pyré

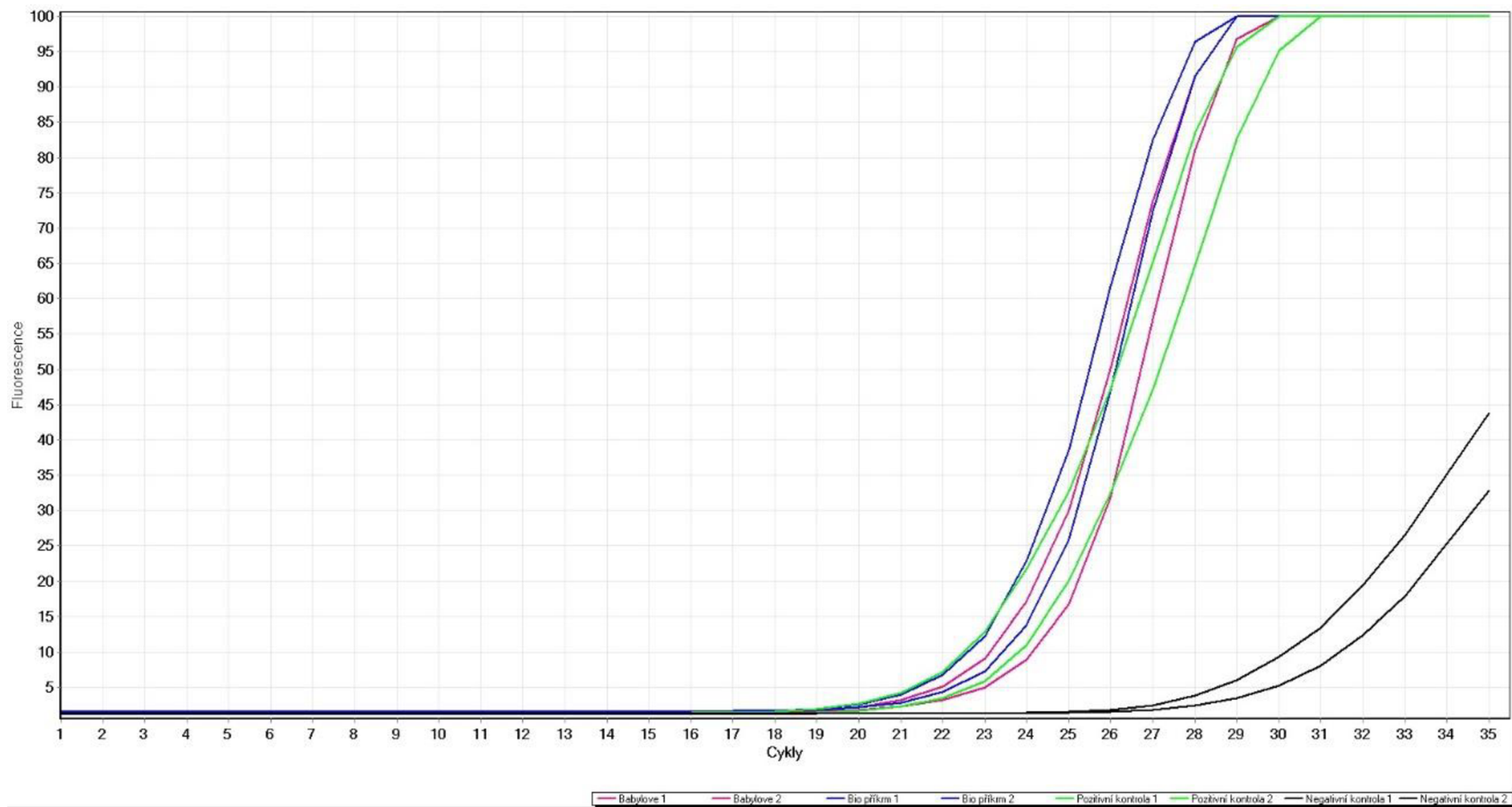
Vzorek	Název	c [ng/μl]	A _{260/280}	A _{260/230}
1	Babylove - komerční	1,0	1,11	0,06
2	Bio příkrm - komerční	2,4	1,67	0,26
3	Babylove - replika	4,5	1,07	0,12
4	Bio příkrm - replika	4,6	1,06	0,17

4.1.6 Ověření amplifikovatelnosti DNA izolované z komerčních výrobků za použití ITS 2 primerů

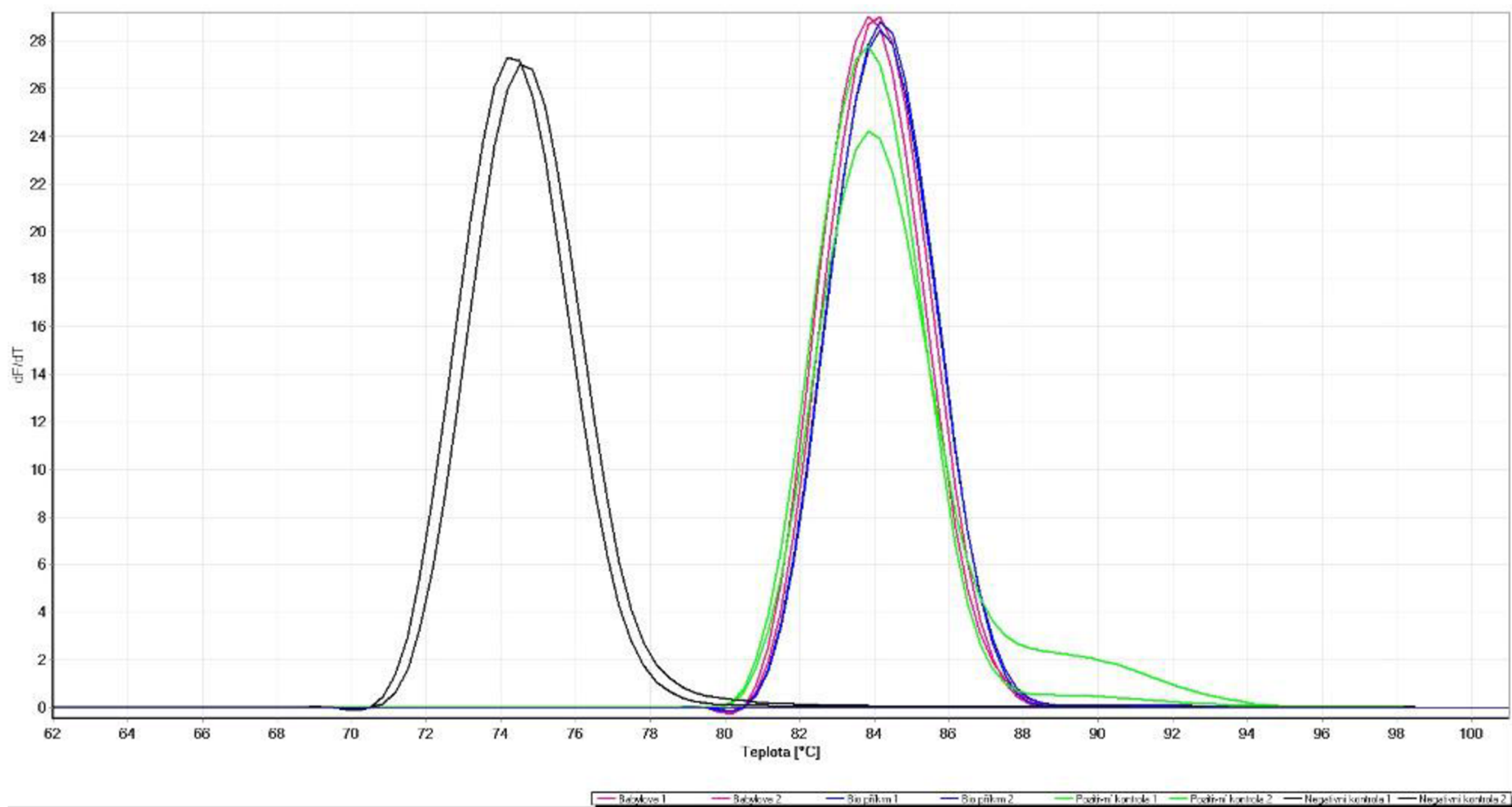
Pro ověření amplifikovatelnosti DNA izolované z komerčních výrobků byly opět využity primery ITS 2. Amplifikační křivky jsou zobrazeny na (*Obrázek 17*). U pozitivní kontroly byly PCR produkty detekovány v 19. amplifikačním cyklu. U komerčních vzorků došlo k detekci později, a to ve 20. amplifikačním cyklu.

Z (*Obrázek 18*) je patrné, že u komerčních vzorků sice došlo k amplifikaci DNA, ale z analýzy křivek tání vidíme, že množství specifických produktů je mnohem menší, než u DNA z maliny, která byla využita jako pozitivní kontrola.

Následná elektroforéza produktů ukázala, že specifických produktů se vytvořilo tak málo, že vůbec nebyly zachyceny. Elektroforéza také potvrdila čistotu negativní kontroly.



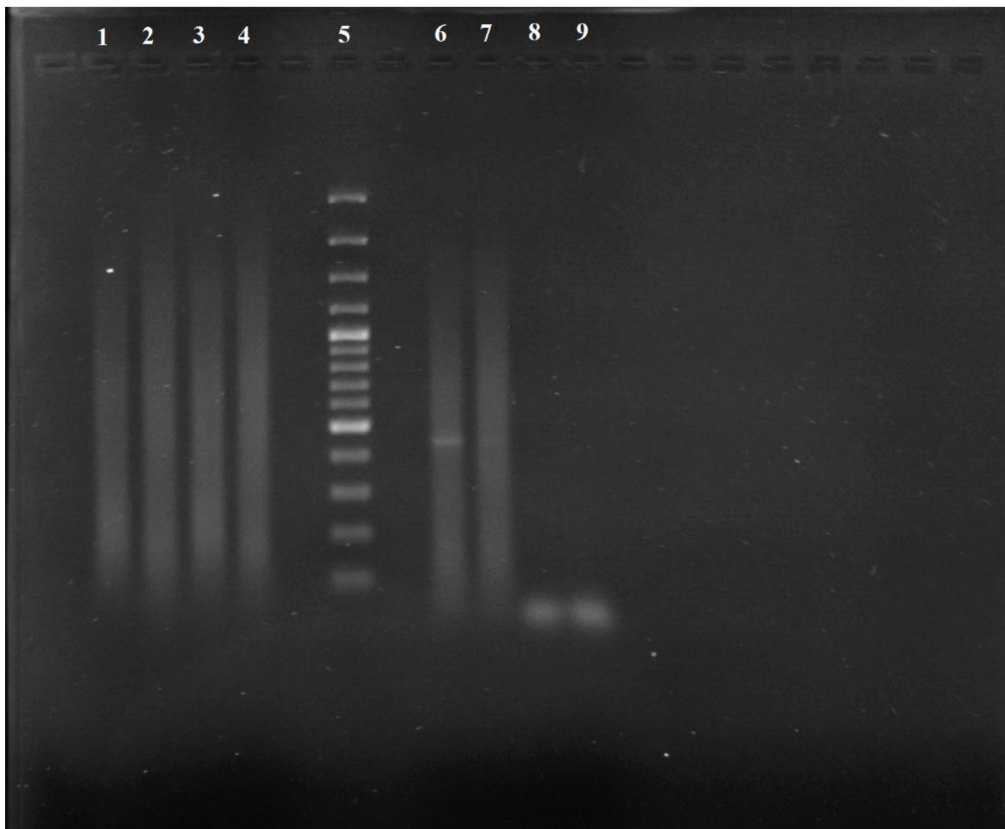
Obrázek 17: Amplifikační křivka komerčních výrobků za použití ITS 2 primerů



Obrázek 18: Analýza křivek tání amfikonů u komerčních výrobků

4.1.6.1 Elektroforéza real-time PCR produktů komerčních vzorků pyré

Na agarózovém gelu můžeme pozorovat pouze jeden specifický produkt u pozitivní kontroly a správné rozdělení žebříčku. U běhu 1 až 4 (Tabulka 18) nedošlo k detekci specifických produktů, nebo velmi malou tvorbou specifických produktů, že nebyly vůbec zachyceny. Výsledek je zobrazen na (Obrázek 19).



Obrázek 19: Agarózový gel produktů komerčních směsí za použití ITS 2 primerů

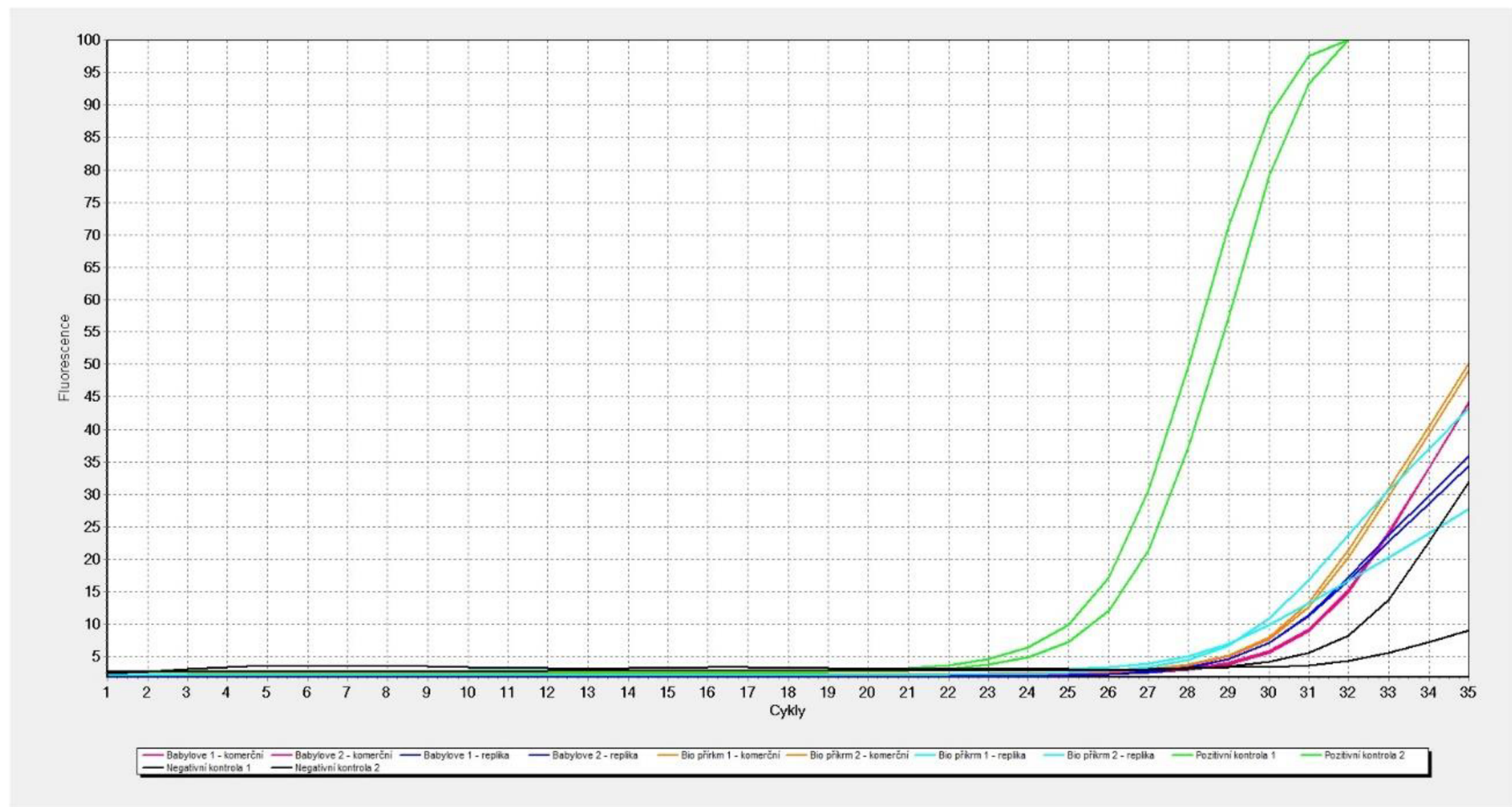
Tabulka 18: Agarózový gel po ověření produktů citlivosti

Běh	DNA	Specifický produkt
1	Babylove 1	-
2	Babylove 2	-
3	Bio příkrm 1	-
4	Bio příkrm 2	-
5	DNA standard 50bp	-
6	Pozitivní kontrola 1	+
7	Pozitivní kontrola 2	+
8	Negativní kontrola 1	-
9	Negativní kontrola 2	-

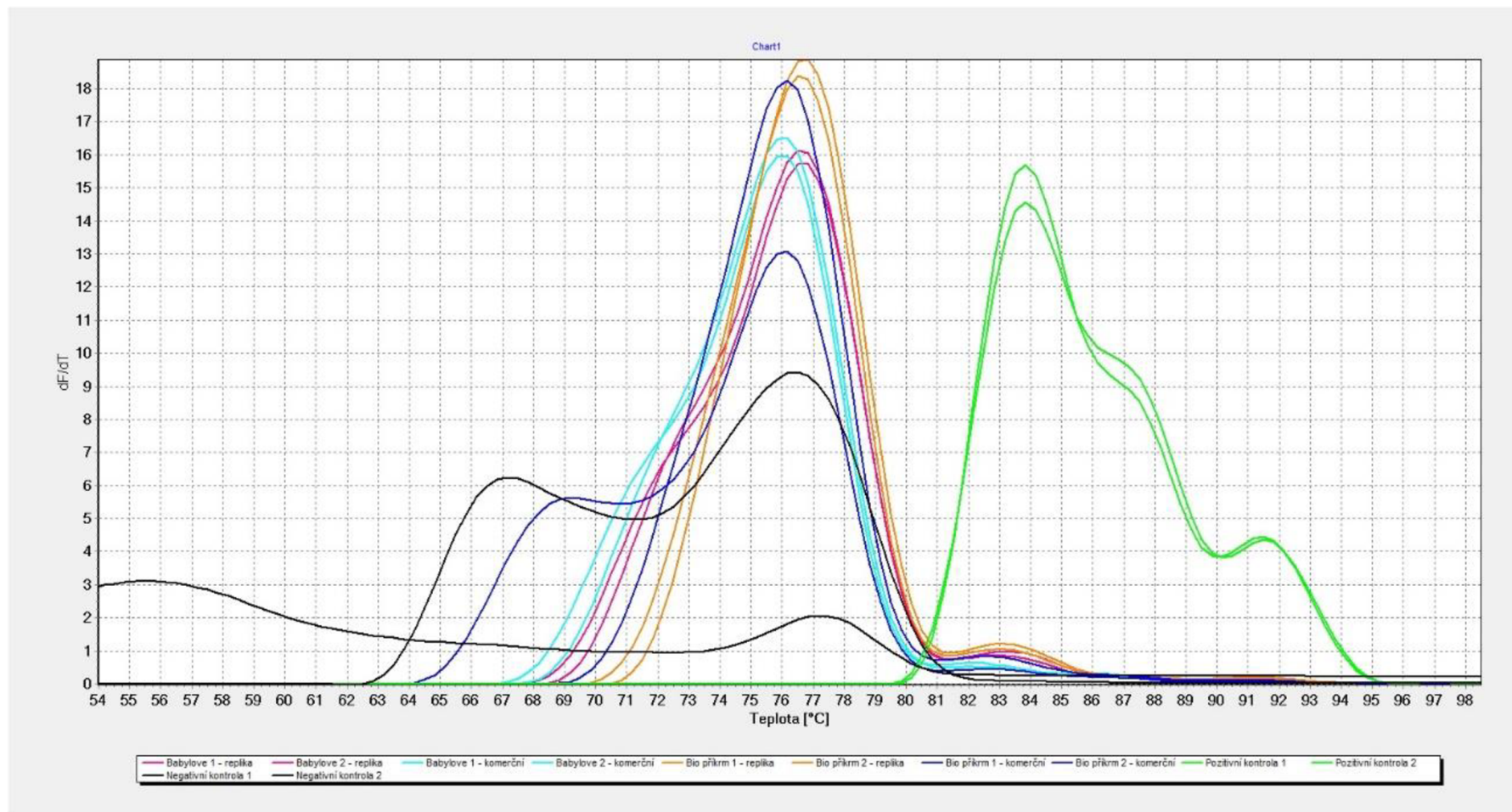
4.1.7 Průkaz malinové, jahodové a borůvkové složky v ovocných pyré pomocí druhově specifických primerů

S DNA z komerčních směsí i, modelových směsí byla provedena triplex real-time PCR analýza pomocí párů primerů BHLH 3, GAST 1 a RiACO 1. (*Obrázek 20*) zobrazuje amplifikační křivku, kde se pozitivní kontrola začala amplifikovat už v 21. amplifikačním cyklu. DNA z replik bio příkrmu se začala amplifikovat ve 26. cyklu, zatímco DNA z komerčního Bio příkrmu se začala amplifikovat až ve 28. cyklu. Komerční Babylove i jeho replika se začaly amplifikovat ve 28. cyklu. V negativní kontrole byla pozorována zdánlivá amplifikace, ale analýza křivek tání a následná elektroforetická kontrola ukázaly, že vznikly pouze dimery primerů.

Analýza křivek tání zobrazená na (*Obrázek 21*) ukázala, že se specifický produkt vytvořil u replik komerčních výrobků a u komerčního bio příkrmu 1. Píky specifických produktů replik mají teplotu tání přibližně 82,8 °C–83,2 °C. U pozitivní kontroly můžeme pozorovat tři píky pro tři specifické produkty s teplotami tání 83,8 °C, 86,2 °C a 91,5 °C. Na základě výsledků z analýzy křivek tání, můžeme uvést že v obou modelových směsích došlo k detekci jahody, maliny i borůvky. K detekci borůvky došlo i u komerčního Bio příkrmu. V komerčním produktu Babylove, se nepodařilo detekovat žádné maliny, jahody ani borůvky. Důvodem nevytvoření specifických produktů u komerčních vzorků může být kontaminace v izolátech DNA a následná inhibice PCR reakce s těmito primery.



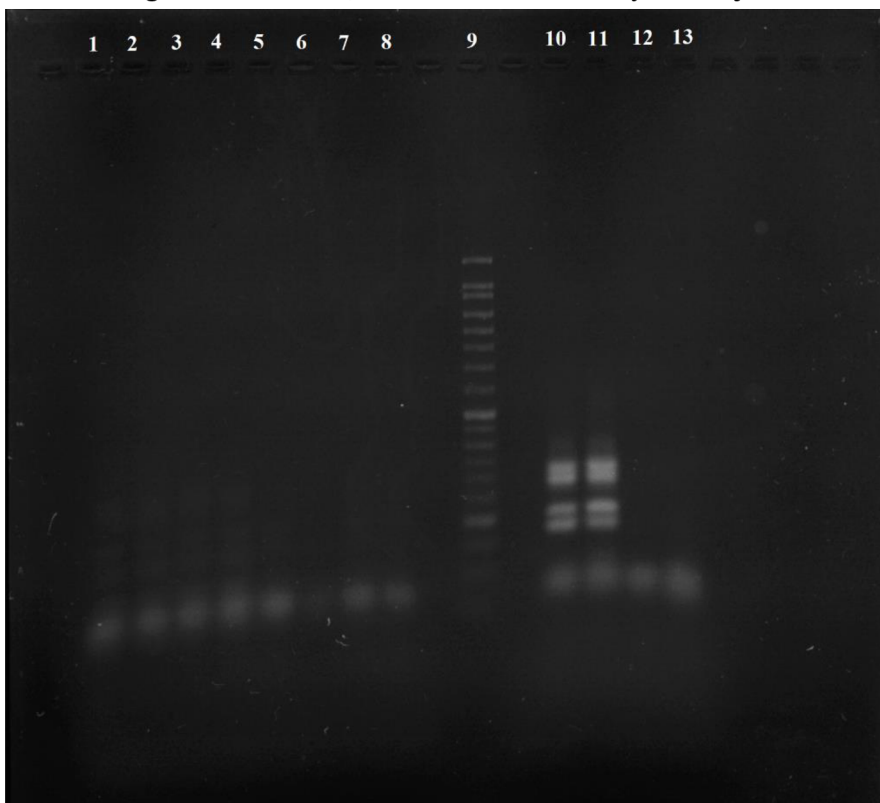
Obrázek 20: Amplifikační křivka modelových a komerčních směsí



Obrázek 21: Křivka tání modelových a komerčních směsí

4.1.7.1 Elektroforéza real-time PCR produktů u komerčních a modelových pyré

Elektroforéza komerčních a modelových pyré byla provedena v 1,5% agarozovém gelu. U běhů 1 až 5 můžeme pozorovat špatně viditelné specifické produkty pro všechny tři páry primerů. (Tabulka 19). U běhů 1 až 5 pozorujeme tvorbu specifických produktů o velikosti 150 až 100bp. V běhu číslo 10 a 11 se nachází pozitivní kontrola, dále v běhu 12 a 13 se nachází negativní kontrola, která zůstala čistá. Výsledek je zobrazen na (Obrázek 22).



Obrázek 22: Agarózový gel produktů komerčních a modelových pyré

Tabulka 19: Agarózový gel po ověření produktů PCR u komerčních a modelových pyré

Běh	DNA	Specifický produkt
1	Babylove 1 - replika	+
2	Babylove 2 - replika	+
3	Bio příkrm 1 - replika	+
4	Bio příkrm 2 - replika	+
5	Babylove 1 - komerční	+
6	Babylove 2 - komerční	-
7	Bio příkrm 1 - komerční	-
8	Bio příkrm 2 - komerční	-
9	DNA standard 50bp	-
10	Pozitivní kontrola 1	+
11	Pozitivní kontrola 2	+
12	Negativní kontrola 1	-
13	Negativní kontrola 2	-

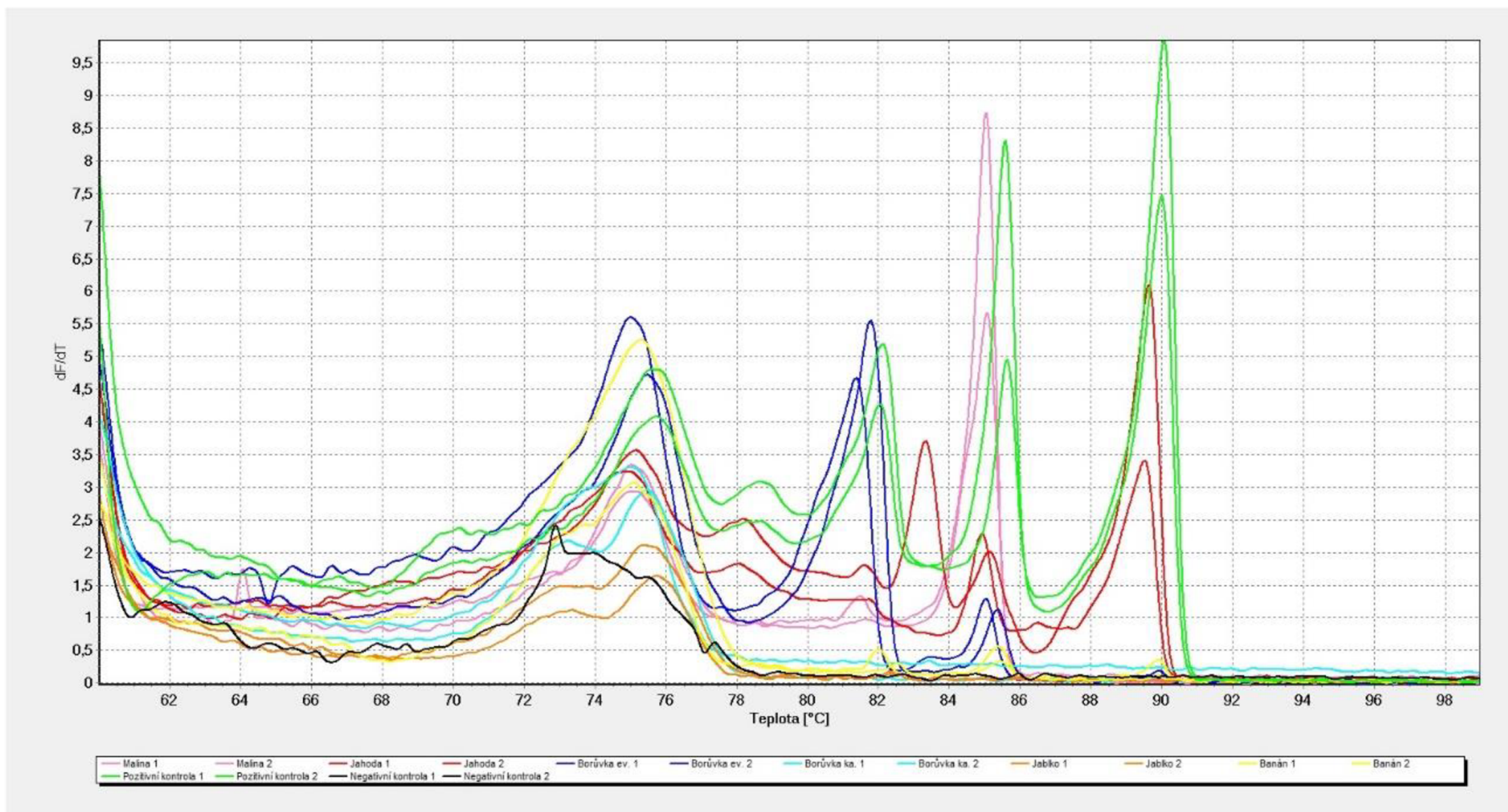
4.1.8 HRM analýza PCR produktů a stanovení specifity primerů a citlivosti

Amplikony byly podrobeny HRM analýze na přístroji LightCycler v rozsahu teplot 50–99 °C se zvyšující se teplotou po kroku 0,01 °C/s. Byla provedena HRM analýza PCR produktů ze stanovení funkčnosti specifických primerů a ze stanovení citlivosti PCR.

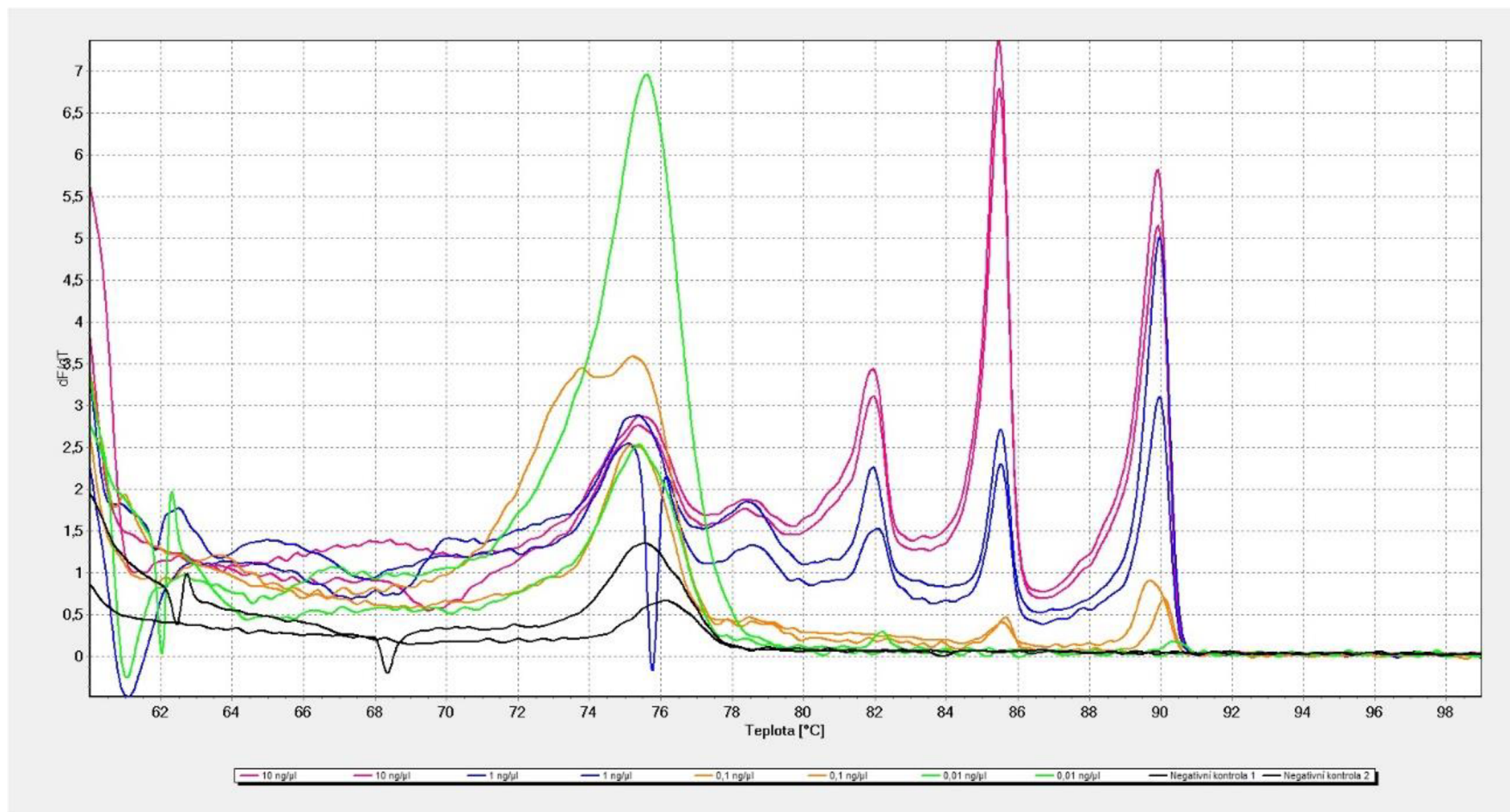
(Obrázek 23) zobrazuje HRM analýzu funkčnosti primerů. Na tomto obrázku jsou patrné 4 píky, z nichž první patří opět dimerům primerů, s teplotou tání přibližně 75–76 °C. Následující tři píky jsou specifické amplikony. Druhý pík je specifický produkt pro borůvku evropskou s teplotou tání 81,8 °C a 81,4 °C. Třetí pík je specifický produkt malinu s teplotou tání 85,0 °C. Poslední pík je specifický produkt pro jahodu s teplotou tání 89,6 °C. Specifické produkty pro jednotlivé ovoce se shodují se specifickými produkty v pozitivní kontrole.

HRM analýzu ze stanovení citlivosti PCR zobrazuje (Obrázek 24). Na tomto obrázku jsou patrné 4 píky, z nichž první patří dimerům primerů, s teplotou tání přibližně 75–76 °C. U koncentrace 10 ng·μl⁻¹ pozorujeme tři píky pro tři specifické produkty s teplotou tání 81,9 °C, 85,5 °C a 89,2 °C. U vzorků s koncentrací 1 ng·μl⁻¹ můžeme také pozorovat tři píky pro tři specifické produkty, se stejnou teplotou tání jako u vzorků s koncentrací 10 ng·μl⁻¹. U vzorků s koncentrací 0,1 ng·μl⁻¹ pozorujeme už jen dva píky pro dva specifické produkty, s teplotou tání 85,6 °C a u prvního vzorku 89,7 °C a u druhého vzorku 90,1 °C.

U vzorku s nejnižší koncentrací a to 0,01 ng·μl⁻¹ nelze říci, zda se jedná o specifické produkty, nebo o šum přístroje.



Obrázek 23: HRM analýza funkčnosti primerů



Obrázek 24: HRM analýza citlivosti primerů

4.2 Instrumentální metody

4.2.1 HPLC

Podle postupu v kapitole (3.4.6) byly z extraktů komerčních a modelových směsí připraveny vzorky a provedena HPLC analýza.

Tato část práce byla zaměřena na porovnání tvaru spekter (chromatogramů) všech směsí se spektry jednodruhových pyré a bylo zkoumáno, jestli se tímto způsobem podaří ve směsích odhalit jahodu, malinu a borůvku. Všechny chromatogramy jsou uvedeny v Příloze.

Pomocí retenčních časů a UV byly ve vzorcích identifikovány látky, které jsou uvedeny v (Tabulka 20), (Tabulka 21).

Tabulka 20: Seznam analyzovaných vzorků a jejich číslování

Vzorek č.	Vzorek
1	Babylove - replika
2	Bio příkrm - replika
3	Malina
4	Jahoda
5	Borůvka
6	Jablko
7	Babylove - komerční
8	Bio příkrm - komerční

Tabulka 21: Látky detekované ve vzorcích („x“ detekce látky ve vzorku)

Detekovaná látka	Vzorek							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Kyselina gallová	x	x	x	x	x	x	x	
Kyselina chlorogenová	x	x			x	x	x	x
Kyselina ferulová								x
Kyselina vanilová					x			
Kyselina kumarová				x	x		x	
Hesperidin	x	x			x	x		x
Epikatechin		x		x	x		x	
Katechin					x			
Phloridzin	x	x					x	x
Pelargonidin-3-glukosid	x	x		x				
Quercetin-3-glukosid	x			x			x	
Naringerin	x							

V extraktech komerčních, modelových a jednodruhových pyré byla zjištěna celá řada fenolických látek.

U modelových směsí byly detekovány většinou stejné látky jako u jednodruhových pyré, nejvíce se odchyloval vzorek borůvky. U borůvky jako jediné byly detekovány látky jako katechin a kyselina vanilová.

U jahody můžeme zaregistrovat přítomnost pelargonidinu-3-glukosidu, který je typický pro jahodu. U komečnicích výrobků tato látka může pocházet z jahody, použité pro výrobu rostlinných složek těchto produktů.

U komerčních výrobků byla detekována kyselina chlorogenová a kyselina ferulová, která zřejmě pochází z jiných ovocných pyré obsažených v ovocné složce produktů, pravděpodobně z jablečného pyré. U komerčního Bio příkrmu nebyla jako u jediného pyré detekována kyselina gallová a bylo u něj detekováno nejméně fenolických látek.

Možným důvodem, proč se nepodařilo stanovit více fenolických látek, může být, že tento výrobek obsahuje příliš málo rostlinných složek ve své ovocné matici, nebo by také mohl problém v extrakčním postupu.

Při použití jiných extrakčních postupů došlo k detekci většího množství látek. U borůvek došlo k detekci kyseliny kávové a resveratrolu, které tato metoda nedetekovala[60].

5. ZÁVĚR

Předložená práce byla zaměřena na srovnání možnosti využití instrumentálních metod a molekulárních metod ke stanovení autenticity potravin s ovocnou složkou.

V experimentální části jsme se zabývali analýzou vzorků pomocí HPLC, a pomocí triplex real-time PCR. Nejdříve byla testována specifita primerů BHLH 3, GAST 1 a RiACO1. Z výsledků triplex PCR můžeme říci, že u všech ovocných vzorků došlo k amplifikaci a k tvorbě specifického produktu. Na základě tohoto výsledku můžeme říci, že primery jsou dostatečně specifické. Následně byla stanovena citlivost druhově specifických primerů. Podařilo se zachytit jahodovou, malinovou a borůvkovou DNA o koncentraci $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Při nižších koncentracích nelze říci, zda se jedná o specifický produkt, nebo je to šum přístroje. Triplex PCR byla využita k důkazu jahod, malin a borůvek v dětských příkrmech. U komerčního Babylove se nepodařilo detekovat ani jeden druh ovoce, ale u komerčního Bio příkrmu došlo k detekci borůvek. U obou modelových pyré došlo k detekci všech tří druhů ovoce.

Dalším z cílů bylo stanovení fenolických sloučenin komerčních, modelových a jednodruhových pyré pomocí HPLC. U komerčního Babylove byla stanovena jahodová složka, zatímco u pyré Bio příkrmu, bylo detekováno nejméně fenolických látek, což může být způsobeno malým obsahem rostlinných složek.

Z výsledků vyplývá, že jak instrumentální, tak i molekulárně-biologické metody jsou použitelné k analýze autenticity potravin s deklarovanou ovocnou složkou. Oba přístupy vedly k prokázání přítomnosti specifických složek charakterizující jahody, maliny a borůvky v extraktech z ovoce, tak i v komerčních vzorcích s obsahem ovocné složky. Obecně se molekulárně-biologické metody jeví jako jednoznačnější a přesnější. Obě metody je však dále třeba optimalizovat a zohlednit typ matrice při návrhu extrakčního či izolačního postupu.

LITERATURA

- [1] KHOO, Hock Eng, Azrina AZLAN, Sou Teng TANG a See Meng LIM. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. 2017, 61(1). ISSN 1654-6628. Dostupné z: doi:10.1080/16546628.2017.1361779
- [2] OBÓN, J.M., M.C. DÍAZ-GARCÍA a M.R. CASTELLAR. Red fruit juice quality and authenticity control by HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2011, 24(6), 760-771. ISSN 08891575. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfca.2011.03.012
- [3] BIGGS, Matthew, Jekka MCVICAR a Bob FLOWERDEW. *Velká kniha zeleniny, bylin a ovoce*. Praha: Volvox Globator, 2004. ISBN 80-720-7537-3.
- [4] CARLSEN, Monica H, Bente L HALVORSEN, Kari HOLTE, et al. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutrition Journal*. 2010, 9(1). ISSN 1475-2891. Dostupné z: doi:10.1186/1475-2891-9-3
- [5] BLAŽEK, Jan. *Ovocnictví*. Praha: Květ, 1998. ISBN 80-853-6233-3.
- [6] IQBAL, Shahid, Xiaopeng NI, Muhammad Saqib BILAL, et al. Identification and expression profiling of sugar transporter genes during sugar accumulation at different stages of fruit development in apricot. *Gene*. 2020, **742**. ISSN 03781119. Dostupné z: doi:10.1016/j.gene.2020.144584
- [7] SINGH, Awantika, Vikas BAJPAI, Sunil KUMAR, Brijesh KUMAR, Mukesh SRIVASTAVA a K.B. RAMESHKUMAR. Comparative profiling of phenolic compounds from different plant parts of six Terminalia species by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with chemometric analysis. *Industrial Crops and Products*. 2016, **87**, 236-246. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2016.04.048
- [8] RUSSO, Marina, Chiara FANALI, Giusy TRIPODO, Paola DUGO, Rosario MULEO, Laura DUGO, Laura DE GARA a Luigi MONDELLO. Analysis of phenolic compounds in different parts of pomegranate (*Punica granatum*) fruit by HPLC-PDA-ESI/MS and evaluation of their antioxidant activity: application to different Italian varieties. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2018, **410**(15), 3507-3520. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-018-0854-8
- [9] PAREDES-LÓPEZ, Octavio, Martha L. CERVANTES-CEJA, Mónica VIGNA-PÉREZ a Talía HERNÁNDEZ-PÉREZ. Berries: Improving Human Health and Healthy Aging, and Promoting Quality Life—A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2010, **65**(3), 299-308. ISSN 0921-9668. Dostupné z: doi:10.1007/s11130-010-0177-1
- [10] MANGANARIS, George A, Vlasios GOULAS, Ariel R VICENTE a Leon A TERRY. Berry antioxidants: small fruits providing large benefits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2014, **94**(5), 825-833. ISSN 00225142. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.6432
- [11] *Recent Advances in the Recombinant Biosynthesis of Polyphenols - Scientific Figure on ResearchGate*. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Flavonoid-core-structure_fig1_321103504

- [12] *Basic chemical structure of anthocyanins*. Dostupné z: https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-B9780444626158000084-u08-02_9780444626158.gif
- [13] CASTAÑEDA-OVANDO, Araceli, Ma. de Lourdes PACHECO-HERNÁNDEZ, Ma. Elena PÁEZ-HERNÁNDEZ, José A. RODRÍGUEZ a Carlos Andrés GALÁN-VIDAL. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. 2009, **113**(4), 859-871. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2008.09.001
- [14] Benzoic acid. *Wikipedia: the free encyclopedia*. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-. Dostupné z: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/84/Benzoic-acid.svg/1200px-Benzoic-acid.svg.png>
- [15] Cinnamic acid. *Wikipedia: the free encyclopedia*. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2021-7-28]. Dostupné z: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/41/Cinnamicacid2.png/240px-Cinnamicacid2.png>
- [16] ZADERNOWSKI, Ryszard, Marian NACZK a Jarosław NESTEROWICZ. Phenolic Acid Profiles in Some Small Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, **53**(6), 2118-2124. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf040411p
- [17] HELENO, Sandrina A., Anabela MARTINS, Maria João R.P. QUEIROZ a Isabel C.F.R. FERREIRA. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds. *Food Chemistry*. 2015, **173**, 501-513. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.057
- [18] SKROVANKOVA, Sona, Daniela SUMCZYNSKI, Jiri MLCEK, Tunde JURIKOVA a Jiri SOCHOR. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015, **16**(10), 24673-24706. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms161024673
- [19] *Fruit and vegetables: Better Health Channel*. Dostupné z: <https://www.betterhealth.vic.gov.au/health/healthyliving/fruit-and-vegetables>
- [20] PILÁT, Albert. Kapesní atlas rostlin. 7. vydání. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1976. ISBN 14-166-76.
- [21] RANDUŠKA, Dušan; ŠOMŠÁK, Ladislav; HÁBEROVÁ, Izabela. Barevný atlas rostlin. 3. vydání. Bratislava: Obzor, 1986.
- [22] GIAMPIERI, Francesca, Sara TULIPANI, José M. ALVAREZ-SUAREZ, José L. QUILES, Bruno MEZZETTI a Maurizio BATTINO. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*. 2012, **28**(1), 9-19. ISSN 08999007. Dostupné z: doi:10.1016/j.nut.2011.08.009
- [23] AABY, Kjersti, Sebastian MAZUR, Arnfinn NES a Grete SKREDE. Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during ripening. *Food Chemistry*. 2012, **132**(1), 86-97. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2011.10.037

- [24] *Nutrition Data: Know what you eat*. US: Condé Nast, 2018. Dostupné z: <https://nutritiondata.self.com/facts/fruits-and-fruit-juices/2053/2>
- [25] NILE, Shivraj Hariram a Se Won PARK. Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*. 2014, **30**(2), 134-144. ISSN 08999007. Dostupné z: doi:10.1016/j.nut.2013.04.007
- [26] ČÍŽKOVÁ, Helena. *Falšování potravin*. Praha: Verlag Dashöfer, [2019]. ISBN 978-80-87963-88-3.
- [27] BARNES, Jeremy S., Hien P. NGUYEN, Sijia SHEN a Kevin A. SCHUG. General method for extraction of blueberry anthocyanins and identification using high performance liquid chromatography–electrospray ionization-ion trap-time of flight-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2009, **1216**(23), 4728-4735. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2009.04.032
- [28] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- [29] SINGLETON, Paul. *Dictionary of DNA and genome technology*. 2nd ed. Chichester [u.a.]: Wiley-Blackwell, 2010. ISBN 978-0-470-74731-5
- [30] VARMA, Astha, Harish PADH a Neeta SHRIVASTAVA. Plant genomic DNA isolation: An art or a science. *Biotechnology Journal*. 2007, **2**(3), 386-392. ISSN 18606768. Dostupné z: doi:10.1002/biot.200600195
- [31] CASTAÑEDA-OVANDO, Araceli, Ma. de Lourdes PACHECO-HERNÁNDEZ, Ma. Elena PÁEZ-HERNÁNDEZ, José A. RODRÍGUEZ a Carlos Andrés GALÁN-VIDAL. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. 2009, **113**(4), 859-871. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2008.09.001
- [32] WALKER, John M. a Ralph RAPLEY, 2000. *Molecular biology and biotechnology*. 4th ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry. ISBN 0-85404-606-2
- [33] KOH, Rhosener Bhea L., Cris Francis C. BARBOSA, Vermando M. AQUINO a Leny C. GALVEZ. Extraction of high molecular weight DNA suitable for next-generation sequencing from the fiber crop abaca. *Industrial Crops and Products*. 2021, **161**. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2020.113194
- [34] BUCHANAN, Bob B., Wilhelm GRUISSEM a Russell L. JONES. Rockville: American Society of Plant Physiologists, c2000. ISBN 978-0-943088-39-6.
- [35] ZVÁROVÁ, J. a I. MAZURA. *Metody molekulární biologie a bioinformatiky*. Praha: Karolinum, 2012. Biomedicínská informatika. ISBN 9788024621500
- [36] BENDICH, Arnold J., Robert S. ANDERSON a Bernard L. WARD. *Plant DNA: Long, Pure and Simple. Genome Organization and Expression in Plants*. Boston, MA: Springer US, 1980, 1980, , 31-33. ISBN 978-1-4613-3053-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4613-3051-6_3
- [37] ROGERS, Scott O. a Arnold J. BENDICH. Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1989, 1989, , 73-83. ISBN 978-94-010-6918-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-009-0951-9_6

- [38] DHALIWAL, Anandika. DNA Extraction and Purification. *Materials and Methods*. 2013, **3**. ISSN 2329-5139. Dostupné z: doi:10.13070/mm.en.3.191
- [39] HORÁK, Daniel, Bohuslav RITTICH a Alena ŠPANOVÁ. Carboxyl-functionalized magnetic microparticle carrier for isolation and identification of DNA in dairy products. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2007, **311**(1), 249-254. ISSN 03048853. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmmm.2006.10.1157
- [40] HORÁK, Daniel a Nataliya BENEDYK. Magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres prepared by dispersion polymerization in the presence of electrostatically stabilized ferrofluids. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 2004, **42**(22), 5827-5837. ISSN 0887624X. Dostupné z: doi:10.1002/pola.20406
- [41] TRACHTOVÁ, Štěpánka. Studium reversibilní adsorpce nukleových kyselin na pevných nosičích. Brno, 2011. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce doc.Ing. Bohuslav Rittich, CSc.
- [42] SINDEN, R.R. DNA structure and function. San Diego: Academic Press, c1994. ISBN 0126457506
- [43] KOETSIER, Giron a Eric CANTOR, 2019. A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers. In: Bioke. Ipswich: New England Biolabs. Dostupné z: <https://www.bioke.com/support/appnotes/1345/a-practical-guide-to-analyzing-nucleicacid-concentration-and-purity-with-microvolume-spectrophotometers.html>
- [44] CLARK, David P., Nanette J. PAZDERNIK a Michelle R. MCGEHEE, 2019. Polymerase Chain Reaction. *Molecular Biology*. Elsevier, 2019, 168-198. ISBN 9780128132883. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-813288-3.00006-9
- [45] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [46] PCR Setup—Six Critical Components to Consider. Thermofisher. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cloning/cloninglearning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagentsenzymes/pcr-component-considerations.html>
- [47] Absolute Quantification of Gene Expression using SYBR Green in the Eco™ Real-Time PCR System, 2010. In: Illumina. San Diego. Dostupné z: https://www.illumina.com/Documents/products/technotes/technote_eco_absolute_quantification_using_sybrgreen.pdf
- [48] IBARRONDO, Oliver, Andrés LOPEZ-OCEJA, Miriam BAETA a Marian M. DE PANCORBO. A Statistical Method to Enhance the Analysis of the Differences Among High-Resolution Melting (HRM) Curves of PCR-Amplified DNA Fragments. *Journal of Food Science*. 2019, **84**(10), 2719-2728. ISSN 0022-1147. Dostupné z: doi:10.1111/1750-3841.14814

- [49] DURAZZO, Alessandra, Massimo LUCARINI, Eliana B. SOUTO, Carla CICALA, Elisabetta CAIAZZO, Angelo A. IZZO, Ettore NOVELLINO a Antonello SANTINI. Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*. 2019, **33**(9), 2221-2243. ISSN 0951-418X. Dostupné z: doi:10.1002/ptr.6419
- [50] SINGLETON, Vernon L., Rudolf ORTHOFER a Rosa M. LAMUELA-RAVENTÓS. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Oxidants and Antioxidants Part A*. Elsevier, 1999, 1999, , 152-178. *Methods in Enzymology*. ISBN 9780121822002. Dostupné z: doi:10.1016/S0076-6879(99)99017-1
- [51] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [52] NOVÁKOVÁ, Lucie, Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [53] DOHNAL, Vlastimil a Ivana KADLEČKOVÁ. *Analýza látek pomocí HPLC: KCH/P422*. 2013, 30. Dostupné z: https://chemistry.ujep.cz/userfiles/files/Analýza_latek_pomoci_HPLC_Mevapox17102013.pdf
- [54] WU, Xianli, Jianghao SUN, Jaspreet AHUJA, David B. HAYTOWITZ, Pei CHEN, Britt BURTON-FREEMAN a Pamela R. PEHRSSON. Anthocyanins in processed red raspberries on the US market^{1,2}. *Journal of Berry Research*. 2019, **9**(4), 603-613. ISSN 18785093. Dostupné z: doi:10.3233/JBR-190405
- [55] CHEN, Shilin, Hui YAO, Jianping HAN, et al. Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant *Species*. *PLoS ONE*. 2010, **5**(1). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0008613
- [56] SONG, Yang, Hong-di LIU, Qiang ZHOU, Hong-jun ZHANG, Zhi-dong ZHANG, Ya-dong LI, Hai-bo WANG a Feng-zhi LIU. High-throughput sequencing of highbush blueberry transcriptome and analysis of basic helix-loop-helix transcription factors. *Journal of Integrative Agriculture*. 2017, **16**(3), 591-604. ISSN 20953119. Dostupné z: doi:10.1016/S2095-3119(16)61461-2
- [57] SARGENT, D. J., A. RYS, S. NIER, D. W. SIMPSON a K. R. TOBUTT. The development and mapping of functional markers in *Fragaria* and their transferability and potential for mapping in other genera. *Theoretical and Applied Genetics*. 2006, **114**(2), 373-384. ISSN 0040-5752. Dostupné z: doi:10.1007/s00122-006-0441-9
- [58] FUENTES, Lida, Liliam MONSALVE, Luis MORALES-QUINTANA, Mónica VALDENEGRO, Juan-Pablo MARTÍNEZ, Bruno G. DEFILIPPI a Mauricio GONZÁLEZ-AGÜERO. Differential expression of ethylene biosynthesis genes in drupelets and receptacle of raspberry (*Rubus idaeus*). *Journal of Plant Physiology*. 2015, **179**, 100-105. ISSN 01761617. Dostupné z: doi:10.1016/j.jplph.2015.02.005

- [59] STEFOVA, Marina, Ana PETKOVSKA, Sonja UGARKOVIC a Jasmina Petreska STANOEVA. Strategy for optimized use of LC-MS for determination of the polyphenolic profiles of apple peel, flesh and leaves. *Arabian Journal of Chemistry*. 2019, **12**(8), 5180-5186. ISSN 18785352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2016.12.009
- [60] TOMÍŠEK, Martin. *Charakterizace rostlinné složky vybraných potravin pomocí technik molekulární biologie a instrumentálních metod*. Brno, 2020. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně.