



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

TESTOVÁNÍ PRIMERŮ PRO REAL-TIME PCR-HRM ANALÝZU AUTENTICITY JEDNODRUHOVÝCH OVOCNÝCH VÝROBKŮ

TESTING OF PRIMERS FOR REAL-TIME PCR-HRM ANALYSIS OF FRUIT PRODUCTS CONTAINING ONE
FRUIT SPECIES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Barbora Boháčová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Lenka Fialová, Ph.D.

BRNO 2024

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1791/2022 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Barbora Boháčová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biochemická technologie
Vedoucí práce: **Ing. Lenka Fialová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Testování primerů pro real-time PCR-HRM analýzu autenticity jednodruhových ovocných výrobků

Zadání bakalářské práce:

- Literární rešerše (Izolace DNA, principy real-time PCR a vysokorozlišovací analýzy křivek tání)
- Příprava modelových jednodruhových výrobků z vybraného druhu ovoce, a výrobků s nahrazením části původní složky jiným druhem ovoce
- Izolace DNA z modelových výrobků a její charakterizace pomocí real-time PCR-HRM s využitím různých primerů
- Vyhodnocení a diskuse výsledků

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2024:

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

Barbora Boháčová
studentka

Ing. Lenka Fialová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Stanovení autenticity ovocných výrobků, u kterých často dochází k falšování náhradou části dražšího ovocného druhu levnějším, avšak druhově podobným ovocem, je aktuálním tématem potravinářského průmyslu. Ukázkovým příkladem je ředění výrobků z meruňek broskvovým pyré. Tato práce se zabývá testováním specifických primerů AGS18 a PdCass pro odhalení skutečného podílu meruňkové složky v modelových výrobcích ve směsi právě s broskvovým pyré pomocí PCR analýzy následované HRM analýzou.

Testování těchto primerů pro stanovení autenticity odhalilo malou využitelnost primerů AGS18 z důvodu tvorby malého nebo žádného množství specifických produktů při reakcích s ovocnou DNA. Primery PdCass vyžadovaly optimalizaci podmínek PCR, avšak poté s nimi bylo možné amplifikovat specifické sekvence DNA z ovocných listů v dostatečném množství.

PCR analýza DNA z modelových výrobků s primery PdCass poskytla specifické produkty v případě vzorků s obsahem meruňky 70 % a méně. HRM analýzou vzorků ani výpočtem GCP nebylo možné odlišit pyré s 0%, 10% a 30% obsahem meruňky. Pyré s 50% a 70% podílem meruňky poskytly křivky tání výrazně odlišné od ostatních vzorků.

ABSTRACT

Determining the authenticity of fruit products, which are often counterfeited by substituting part of a more expensive fruit with a cheaper but botanically similar fruit, is a current topic in the food industry. A prime example is the dilution of apricot products with peach puree. This study focuses on testing specific primers AGS18 and PdCass to reveal the true proportion of apricot content in model products mixed with peach puree using PCR analysis followed by HRM analysis.

Testing of these primers for authenticity determination revealed limited utility of AGS18 primers due to the formation of small amount or no specific products during reactions with fruit DNA. PdCass primers required PCR condition optimization, but subsequently, specific DNA sequences from fruit leaves could be amplified in sufficient quantities.

PCR analysis of DNA from model products with PdCass primers provided specific products in samples with apricot content of 70% or less. HRM analysis of samples and calculation of GCP did not distinguish purees with 0%, 10%, and 30% apricot content. However, purees with 50% and 70% apricot content exhibited significantly different melting curves compared to other samples.

KLÍČOVÁ SLOVA

broskev, meruňka, pyré, autenticita, polymerázová řetězová reakce, PCR, vysokorozlišovací analýza křivek tání, HRM, skóre podobnosti, GCP

KEYWORDS

peach, apricot, puree, authenticity, polymerase chain reaction, PCR, high resolution melting analysis, HRM, genotype confidence percentage, GCP

CITACE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

BOHÁČOVÁ, Barbora. *Testování primerů pro real-time PCR-HRM analýzu autenticity jednodruhových ovocných výrobků* [online]. Brno, 2024 [cit. 2024-05-04]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/149081>. 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.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce, Ing. Lence Fialové, PhD., za její trpělivost, ochotu a cenné rady.

Obsah

1	ÚVOD	7
2	TEORICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Rod <i>Prunus</i>	8
2.1.1	Broskvoň obecná (<i>Prunus persica</i>).....	8
2.1.2	Meruňka obecná (<i>Prunus armeniaca</i>).....	9
2.2	Technologie zpracování ovoce	10
2.2.1	Předběžné technologické operace	10
2.2.2	Technologie výroby ovocných pyré	11
2.3	Problematika falšování ovocných výrobků	12
2.4	Laboratorní metody ověřování autenticity potravin	15
2.4.1	Chromatografické metody.....	16
2.4.2	Spektrální metody	17
2.4.3	Elektroforetické metody.....	19
2.4.4	Polymerázová řetězová reakce	21
2.4.5	Vysokorozlišovací analýza křivek tání	24
2.5	Izolace DNA z rostlinných pletiv	26
2.5.1	Homogenizace rostlinného materiálu	27
2.5.2	Lyze rostlinných buněk	27
2.5.3	Odstranění inhibitorů.....	27
2.5.4	Závěrečná purifikace DNA	28
2.5.5	Detekce DNA.....	28
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	29
3.1	Materiál	29
3.1.1	Ovocné vzorky	29
3.1.2	Chemikálie	29
3.1.3	Přístroje a pomůcky	29
3.2	Metodika.....	30
3.2.1	Úprava vzorků pro analýzu	30
3.2.2	Izolace DNA.....	31
3.2.3	Stanovení koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky	33
3.2.4	PCR analýza.....	33
3.2.5	HRM analýza.....	38

3.2.6	Agarózová gelová elektroforéza.....	39
4	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	40
4.1	Analýza DNA z ovocných listů izolované CTAB protokolem	40
4.1.1	Spektrometrické stanovení koncentrace a čistoty	40
4.1.2	Ověření amplifikovatelnosti	41
4.2	Analýza DNA z ovocných listů izolované kitem EliGene Plant.....	42
4.2.1	Spektrometrické stanovení koncentrace a čistoty	42
4.2.2	Ověření amplifikovatelnosti	42
4.2.3	Amplifikace DNA se specifickými primery AGS18.....	44
4.2.4	Amplifikace DNA se specifickými primery PdCass.....	45
4.2.5	Optimalizace PCR – použití 0,5 µl primerů PdCass	46
4.2.6	Optimalizace PCR – změna teploty elongace na 65 °C	48
4.2.7	Optimalizace PCR – změna teploty hybridizace na 54–62 °C.....	49
4.3	Analýza DNA z pyré izolované CTAB protokolem s CaCl ₂	52
4.3.1	Spektrometrické stanovení koncentrace a čistoty	52
4.3.2	Ověření amplifikovatelnosti	53
4.4	Analýza DNA z pyré po přečištění kitem GenElute	55
4.4.1	Spektrometrické stanovení koncentrace a čistoty	55
4.4.2	Ověření amplifikovatelnosti	56
4.5	PCR analýza DNA z pyré se specifickými primery PdCass	58
5	ZÁVĚR.....	62
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	63
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	69
8	PŘÍLOHY.....	71

1 ÚVOD

V dnešním dynamickém a neustále se vyvíjejícím světě potravinářství se současně objevují i nové výzvy spojené s falšováním potravin. S narůstajícím globálním obchodem a komplexními dodavatelskými řetězci vstupuje do popředí potřeba účinného monitorování potravinářských produktů, aby bylo možné identifikovat jejich pravé složení a původ. V této sféře hraje rozbor autenticity potravin klíčovou roli, a to z hlediska ochrany spotřebitelů před podvody a zajištění kvality potravinových produktů na trhu.

Mezi nejnovější technologické nástroje, které umožňují rychlou a citlivou analýzu genetického materiálu, patří metoda real-time PCR-HRM (Polymerase Chain Reaction-High Resolution Melting). Tato technika kombinuje polymerázovou řetězovou reakci (PCR) s vysokorozlišovací analýzou křivek tání (HRM), což umožňuje nejen detekci specifických genových sekvencí, ale také jejich detailní charakterizaci. V rámci určení autenticity potravin se tato metoda stala klíčovým nástrojem pro identifikaci a kvantifikaci genetických odchylek mezi jednotlivými druhy potravinářských produktů.

Tato bakalářská práce se zaměřuje na testování primerů (oligonukleotidových sekvencí používaných pro amplifikaci konkrétních genových oblastí během PCR analýzy) s rodovou specifitou. Primery jsou zásadním prvkem této metody, a jejich správný výběr má klíčový vliv na citlivost, specifitu a spolehlivost detekce genetických markerů jednotlivých druhů potravin.

Cílem této práce je systematicky hodnotit a porovnávat účinnost vybraných primerů při analýze autenticity jednodruhových ovocných výrobků a zkoumat jejich schopnost rozlišit skutečně jednodruhový výrobek od výrobku s přidanou levnější rostlinnou složkou.

V kontextu rostoucího zájmu o bezpečnost potravin a zvyšující se riziko falšování potravinářských výrobků, má tato práce potenciál přinést praktické přínosy pro potravinářský průmysl, regulační orgány a spotřebitele, kteří se spoléhají na správnost a kvalitu potravin v dnešní globalizované společnosti.

2 TEOTERICKÁ ČÁST

2.1 Rod *Prunus*

Oficiálně spadá rod *Prunus* do řádu *Rosales* (růžotvaré), čeledi *Rosaceae* (růžovité) [1]. Na základě genetického výzkumu, realizovaného v r. 2013, byly v této čeledi rozeznány tři různé rody. Jedná se o následující: rod *Padus* (střemcha), rod *Cerasus* (mahalebka) a rod *Prunus* (slivoň), přičemž právě rod *Prunus* je z uvedených nejvýznamnější [2; 3; 4].

Fylogeneze tohoto rodu nasvědčuje, že v čase došlo ke zrodu sedmi sekcí: sekce *Amygdalus*, sekce *Armeniaca* (meruňka), sekce *Emplectocladus*, sekce *Microcerasus*, sekce *Persica* (broskvoň), sekce *Prunocerasus* a sekce *Prunus* [2; 5].

Tento rod v sobě zahrnuje asi 200 známých druhů stromů či keřů, z nichž většina pochází z mírného pásma. Z druhů významných pro české ovocnářství a sadařství lze konkrétně uvést slivoně, višně, švestky, meruňky, třešně, broskvoně, trnky či mandloně. Náleží sem však i kříženci jako švestkovišně, mandlobroskvoně a okrasné bobbkovišně [4].

Z důvodu značné celosvětové poptávky na produkci velkého množství peckového ovoce, je snaha vyvíjet nové odrůdy, které budou produkovat více ovocné masy a zároveň budou odolnější stále nepříznivějším podmínkám klimatu. Pro úspěšné šlechtění nových odrůd se využívají informace o genetice jednotlivých druhů a jejich kompatibilitě. Za modelovou rostlinu byla zvolena *Prunus persica*, která disponuje jedinečně malou velikostí genomu (265 Mb), zároveň však blízkou příbuzností s ostatními druhy tohoto rodu [6; 7].

2.1.1 Broskvoň obecná (*Prunus persica*)

Broskvoně náleží k opadavým stromům mírného až subtropického podnebného pásu [8]. Dle dochovaných záznamů lze jejich původ mapovat až do Číny, avšak dnes se pro ovocnou produkci pěstují hlavně ve státech jižní Evropy, v USA, Mexiku či Africe [9].

Pro plody je charakteristický kulatý tvar s plstnatou slupkou, jejíž barva se v závislosti na zralosti plodu mění od žluté po fialovou. Od stupně zralosti se také odvíjí barva a pevnost dužniny. V blízkosti pecky se pak zpravidla dužina barví výrazně červeně [10].

2.1.1.1 Nutriční význam broskví

Čerstvé zralé plody broskvoní se vyznačují vysokým obsahem vody (87,1 %), dále obsahem sacharidů (8,5 %), konkrétně sacharózou (6,7 %) a glukózou (1,5 %). Další živiny ve formě lipidů a bílkovin se nacházejí především v peckách [11]. Sušina je dále bohatá na rozpustnou i nerozpustnou vlákninu (28,4 g/kg) [9].

Z celkového množství minerálních látek (4,6 g/kg sušiny) v plodech dominuje draslík (2143 mg/kg), vápník (130 mg/kg), hořčík (106 mg/kg), bor (70 mg/kg) a železo (11 mg/kg). Z vitaminů: vitamin C (66 mg/kg), kyselina listová a další vitaminy skupiny B. Z bioaktivních látek je nejvíce zastoupen β -karoten (4,3 mg/kg), obsah polyfenolů v dužnině se pohybuje v rozmezí 400–800 mg/kg [9].

V broskvích se nachází vysoký podíl kyseliny jablečné (3000–7700 mg/kg), kyseliny citronové (do 2000 mg/kg) a další organické kyseliny [9].

Typické broskvové aroma pak zajišťuje výskyt γ -laktonů (C_6 – C_{12}) a δ -laktonů (C_{10} a C_{12}). Hlavní sloučeninou laktonové frakce je (R)-1,4-dekanolid, pro nějž je charakteristická jemná ovocná vůně. Jednotlivé druhy se pak liší obsahem monoterpenů a esterů. Významnou složkou ovocné pecky je benzaldehyd [12; 13].

2.1.1.2 Využití broskví v potravinářství

Společně s nektarinkami patří broskve celosvětově k nejžádanějším druhům ovoce. Pro své mimořádné chuťové vlastnosti jsou plody často konzumovány čerstvé i ve formě ovocných výrobků. Nejvíce se broskve zpracovávají na kompoty, kde jsou půlené loupané plody naložené ve sladkém nálevu. Ve výjimečných případech se plody zamrazují. Z přezrálých či poškozených plodů se vyrábí pálenka (broskvovice) [3].

2.1.2 Meruňka obecná (*Prunus armeniaca*)

Stejně jako u broskvoní je původ těchto stromů mapován až na území dnešní Číny, odkud se pak postupně rozšířily až do Evropy [9]. Meruňka je diploidní, většinou samosprašná, přičemž pro opylování jsou nutné včely [10]. Pro meruňky je charakteristická rozložitá koruna s opadavými vejčitými listy. Ještě před olistěním stromy kvetou bílými květy [8]. V České republice jsou meruňky nejčastěji pěstovány v oblastech Polabí a jižní Moravy [9].

Plody jsou kulaté typicky oranžové barvy, na povrchu krátce plstnaté s postranní brázdou. Uvnitř dužniny se nalézá velká hladká pecka [5; 14].

2.1.2.1 Nutriční význam meruněk

Čerstvé zralé plody meruněk se vyznačují vysokým obsahem vody (87,4 %), dále obsahem sacharidů (6,1 %), konkrétně sacharózou (4,4 %) a glukózou (1,9 %). Další živiny ve formě lipidů a bílkovin se nacházejí především v peckách [11]. Sušina je dále bohatá na rozpustnou i nerozpustnou vlákninu (39,8 g/kg) a pektinové látky (9,8 g/kg) [9].

Z minerálních látek v plodech dominuje draslík (2728 mg/kg), vápník (164 mg/kg), hořčík (107 mg/kg) a železo (7,8 mg/kg). Z vitamínů: vitamin C (105 mg/kg), vitamin B₃ (7,6 mg/kg), vitamin E (5 mg/kg) a další vitaminy skupiny B. Organické kyseliny jsou zde zastoupeny z 1–1,5 %, přičemž dominuje kyselina jablečná a citronová. Dále se v meruňkách vyskytuje kyselina chlorogenová, chinová a jantarová. Z bioaktivních látek je výrazně zastoupen β-karoten (19,8 mg/kg), dále karotenoidy či bioflavonoidy. Obsah polyfenolů se pohybuje v rozmezí 700–1000 mg/kg [9; 15].

Typické meruňkové aroma tvoří kombinace celé škály sloučenin, nejvíce jsou zastoupeny monoterpenové uhlovodíky (limonen, myrcen, terpinolen), γ- a δ- laktony (γ-kaprolakton, δ-oktalakton), alkoholy a aldehydy. Meruňky obsahují i malé množství kyseliny šťavelové (179 mg/kg), dále kyselinu 2-methylbutanovou a octovou [12; 13].

2.1.2.2 Využití meruněk v potravinářství

Meruňky patří mezi nejžádanější ovoce na trhu. Spotřebitelé je vyhledávají jako čerstvé plody i ve formě výrobků. Nejčastěji jsou plody zpracovávány na džemy a jednoplokové marmelády [16].

Ovocné pomazánky bývají často předmětem falšování, kdy je část meruňkové složky nahrazena levnějším ovocem. Mezi běžné praktiky lze zařadit přídavek dýně či broskví, u kterých je kvůli složení podobnému meruňkám problematická jejich detekce a kvantifikace [17; 18].

2.2 Technologie zpracování ovoce

Ovoce a zelenina se řadí k významným složkám zdravé vyvážené stravy. Velká rozmanitost druhů s sebou nese i mnoho způsobů jejich zpracování [19]. Této problematice se věnuje Zákon o potravinách a tabákových výrobcích č. 110/1997, konkrétní požadavky na konzervované ovoce dále upravuje vyhláška č. 397/2021 Sb.. Oblast potravinového práva obecně zastřešuje nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002 [20; 21; 22].

Čerstvým ovocem se rozumí jedlé plody a semena stromů, keřů a bylin, uváděné do oběhu bezprostředně po sklizni nebo po určité době skladování v syrovém stavu. Zpracovaným ovocem jsou výrobky, jejichž charakteristickou složku tvoří ovoce a které byly upraveny konzervováním [23].

Kapitoly níže budou věnovány kompletní technologii ovocných pyré od čerstvého ovoce po finální produkt ve formě ovocného pyré (protlaku).

Ovocným protlakem či pyré je míněna potravina řídké až kašovitě konzistence bez nepoživatelných částí rostlin, které jsou oddělovány propasírováním nebo jiným obdobným procesem. Technologie výroby těchto potravin v nezbytných případech dovoluje přidání přírodních sladidel; vody nebo ovocné šťávy ze stejného druhu ovoce. V konečném produktu by měla refraktometrická sušina tvořit nejvýše 29 %, kyselost (obsah kyseliny citronové) by se měla pohybovat v rozmezí 0,6–2,5 % [21].

2.2.1 Předběžné technologické operace

2.2.1.1 Sklizeň

Prvním krokem při procesu zpracování ovoce je jeho sklizeň. Nastává tehdy, když plody dosáhnou tzv. technologické zralosti, což je stupeň zralosti, při kterém je docíleno nejvyšší kvality daného výrobku. Přibližná zralost se poté určuje dle různých parametrů (znaky plodů sledované zrakem, tvrdost dužniny, chemické složení plodů). V závislosti na druhu ovoce je přístupováno k ruční nebo strojové sklizni [23].

Nařízení 1221/2008/ES definuje základní minimální požadavky na jakost ovoce a zeleniny, které musí být celé, zdravé, bez viditelných cizorodých látek, zbavené škůdců a dále jinak nezneškodnocené [19].

Pro výrobu ovocných pyré s meruňkovou a broskvovou složkou je kvůli snadnému znehodnocení plodů vyžadována jejich ruční sklizeň 3 dny před jejich plnou zralostí [23].

2.2.1.2 Skladování

V případě, že ihned po sklizni nedojde k okamžitému zpracování plodů, je nutné jejich správné uskladnění, které konkrétně definuje norma ČSN ISO 2169 (463002). Pro skladování sklizeného ovoce se využívají čisté prostory s regulovatelnou teplotou, řízenou relativní vlhkostí a řízenou atmosférou. Broskve i meruňky je potřeba skladovat při teplotách -0,5–1 °C a relativní vlhkosti okolo 90 %. U broskví by měla být kontrolována minimální koncentrace O₂ na 2 % a CO₂ na maximálně 10 %. Za těchto podmínek mohou být plody skladovány 3–6 týdnů. Důležité je však neustálé odvětrávání ethylenu (plynu podporující zrání), jež zralé ovoce přirozeně produkuje [23; 13].

2.2.1.3 Čištění

Během procesu čištění by mělo dojít k odstranění znečišťujících látek ze suroviny na úroveň vhodnou pro další zpracování. Znečišťujícími látkami se v tomto kontextu obecně míní kovy (kusy, špony), minerální látky (zemina), nepoživatelné části rostlin a zvířat (stonky, listy, hmyz), chemikálie, mikroorganismy a další produkty zemědělské činnosti [24].

Využívají se dva způsoby čištění: suché (vzduchové separátory) a mokré, tzv. praní (pračky) [24].

Praní je využíváno ve většině případů a zahrnuje v sobě kroky předmáčení, vlastního praní a konečného opláchnutí čistou vodou. Prací voda může přitom obsahovat různé detergenty a dosahovat různých teplot. Pro peckové ovoce nachází využití pračky vibrační či fluidní [24; 25].

2.2.1.4 Třídění

Tříděním dochází k separaci plodů dle měřitelných vlastností (barva, velikost, jakost, zralost). Dochází tak k zajištění požadované kvality konečných výrobků [25].

Hlavním sledovaným znakem u plodů určených pro výrobu protlaku je zralost, jež je u peckového ovoce hodnocena dle zbarvení pecky, tvrdosti dužniny a chemického složení plodů [23].

2.2.1.5 Odstranění nepoživatelných částí

Části rostlin nevhodné pro konečný produkt jsou označovány jako nepoživatelné. Volné nečistoty jsou zpravidla odstraňovány v kroku čištění (kapitola 2.2.1.3), nepoživatelné součásti plodů je však nutné odstranit konkrétními metodami [24].

Nejprve se přistupuje ke kroku odstopkování, jež má za cíl odstranění stopky u ovoce, které ze své povahy sklizeň se stopkou vyžaduje (rybíz, třešně) [24].

Poté se provádí odpeckování, jež je u menšího ovoce realizováno vyražením trnem (třešně), u větších plodů dochází k dělení a následnému vyjmutí pecky (broskve, meruňky) [24].

Loupáním nakonec dojde k zbavení plodů slupky (žádoucí pro broskve). Pro tento účel se využívají tři metody loupání. Mechanické loupání využívá stacionárních nožů, které zbavují slupky ovoce rotující na otočném trnu (jablka), či abrazivní loupání (brambory). Při termickém loupání dochází k působení zvýšené teploty na tenkou vrstvu pletiva na povrchu plodu, využívají se parní i vakuové přístupy. Chemické loupání je nejúčinnější ze všech metod, zahrnuje však práci s horkým louhem a likvidaci chemického odpadu. Na broskve se během chemického loupání zpravidla aplikuje 1–5% NaOH o teplotě 60–70 °C po dobu 1–3 min [24; 25].

2.2.2 Technologie výroby ovocných pyré

2.2.2.1 Dezintegrace

Dezintegrací je míněno rozrušení struktury ovoce způsobem vhodným pro konečný produkt. Zmenšením částí plodů lze navíc dosáhnout účinnějšího přestupu tepla, dosažení požadované granulace a sjednocení velikosti částic [25].

Pro výrobu ovocného protlaku je nezbytné, aby byl ovocný materiál nejprve vystaven jednoduché dezintegraci pomocí mlýnů či drtičů. Výstupný produkt tohoto kroku je označován jako dužnina [24].

2.2.2.2 Rozváření

Dužnina se dále zpracovává v rozvářecím kroku, kde dojde k odvodu vzdušného rostlinného pletiva a zároveň k inaktivaci enzymů, tím dojde k navýšení doby trvanlivosti. V praxi se jedná o krátké povaření díky vstříkované páře (přímý ohřev) či využití duplikátorových kotlů (nepřímý ohřev). Výstupní produkt tohoto kroku je pak označován jako pulpa [24].

2.2.2.3 Protírání

Pro získání ovocného protlaku se nakonec povařený materiál pasíruje přes sadu sít v zařízeních zvaných pasírky, též protěračky. Tímto způsobem dochází i k dodatečnému odstranění nepoživatelných částí, které se nepodařilo zachytit v předešlých krocích [24].

2.2.2.4 Plnění do obalů

V určitých případech je vhodné přejít k plnění produktu do obalů ihned po protírání. V závislosti na potravině lze využít konzervy, plastové či skleněné nádoby, kartonové krabice a další. Požadavkům na obaly určené pro styk s potravinami se věnuje vyhláška Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1935/2004. Při plnění je nutné dodržet správnou vsádkovou hmotnost, kterou reguluje vyhláška č. 328/2000 Sb. [25; 26; 27].

2.2.2.5 Konzervace

Cílem konzervace potravin je prodloužení jejich údržnosti. Toho je docíleno převážně díky vypuzení kyslíku z rostlinných pletiv, snížení vodní aktivity, inaktivaci enzymů a usmrcení nežádoucích mikroorganismů [23].

V otázce konzervace potravin se využívají tři postupy: chemické ošetření (přídavek SO₂), zmrazení (odnětí vody) či tepelná sterilace [24].

Sterilace kyselých potravin (ovoce, okyselená zelenina), kde pH nepřekračuje hodnotu 4,0, se provádí v rozmezí teplot 70–100 °C, a může probíhat v obalu či mimo něj. V případě sterilace v obalu jsou celá balení vložena do sterilátoru (vanový, sprchový). V případě sterilace mimo obal prochází materiál tepelným výměníkem (trubkový, deskový), kde probíhá samotná sterilace a až poté je přistoupeno k plnění do obalů. Po sterilaci je nutné nechat produkty samovolně zchladnout [23].

V konečné fázi je nezbytné obaly produktů očistit, osušit a vhodně označit etiketou obsahující všechny náležitosti (předmět vyhlášky č. 417/2016 Sb.) [28].

2.3 Problematika falšování ovocných výrobků

Falšování potravin je celosvětový problém, který má vážné důsledky pro veřejné zdraví, hospodářství a důvěru spotřebitelů v potravinový průmysl. Jedná se o úmyslnou manipulaci s potravinami, která zahrnuje změny v jejich složení, původu nebo kvalitě s cílem získat neoprávněný zisk nebo zvýšit jejich atraktivitu na trhu. Falšování potravin může mít různé formy, včetně přidávání levných náhražek, neoprávněného označování, upravování expiračních dat nebo přidávání nebezpečných látek. Mezi nejčastější cíle podvodníků pro falšování patří také ovocné výrobky (čiré šťávy, džusy, marmelády...), které jsou často terčem nekalých praktik kvůli jejich rozsáhlé spotřebě a oblibě mezi spotřebiteli [29].

Národní i evropská legislativa týkající se ochrany spotřebitele před falšováním potravin vychází z nařízení (ES) č. 178/2002. Z tohoto nařízení pak vychází zákony o potravinách jednotlivých členských států EU. Bohužel platí, že požadavky na kvalitu, složení, původ a další parametry potravin nejsou v legislativě uváděny systematicky. Detailněji se směrnice zaměřují pouze na komodity, jež jsou vystaveny tlaku profesních sdružení a obchodních organizací [30].

Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI), která přímo spadá pod Ministerstvo zemědělství, již řadu let dohlíží na sledovatelnost potravin, provádí kontroly na odhalení falšování, kontroly chráněných označení atd. SZPI kontroluje, v rámci stanovených kompetencí, zemědělské výrobky, potraviny nebo tabákové výrobky, a rovněž předměty a materiály přicházející do styku s potravinami. Díky výše uvedeným kompetencím představuje potravinářská inspekce důležitý státní orgán v otázce bezpečnosti potravin na českém trhu [31].

I přes veškerou snahu odborníků o zamezení možnosti falšování rostlinných produktů byla v minulosti již několikrát veřejnost vystavena vlivu podvodníků. K nejznámějším podvodům patří např. umělé vracení aromat do ovocných šťáv vyrobených z ovocných koncentrátů, nahrazování dražší ovocné složky v ovocných pomazánkách levnějším ovocem, ředění produktů vodou nebo úmyslné zatajování skutečného složení produktů [29].

Problematiku klamání spotřebitelů a falšování potravin popisuje zákon č. 634/1992 Sb., který mimo jiné říká, že nikdo nesmí uvádět nepravdivé či nejasné údaje o vlastnostech a složení výrobků [32; 33].

Obecně lze vymezit tři hlavní způsoby falšování potravin:

- náhrada – částečná nebo úplná náhrada drahé suroviny složkou levnější,
- přídavek – přídavek adulterantu za účelem maskování nízké kvality produktu,
- odstranění – odstranění autentické a cenné složky [30].

Tab. 1 Způsoby falšování rostlinných výrobků [30]

Způsob falšování	Podskupina	Příklad
náhrada	přídavek či ředění levnější složkou	náhrada části jahodového pyré jablečnou složkou [32]
	nepravdivé označení geografického původu	náhrada italského olivového oleje španělským
	nepravdivé označení botanického druhu	náhrada pšenice tvrdé (<i>Triticum durum</i>) pšenicí setou (<i>Triticum aestivum</i>) v těstovinách [32]
	použití jiné než deklarované technologie produkce	vydávání rekonstituované šťávy z koncentrátu za šťávu čerstvě lisovanou [32]
	nepravdivá deklarace původu za účelem snížení daní a cla	deklarace importovaného cukerného sirupu s citronovým aromatem jako citrusového koncentrátu
přídavek	zlepšení barvy	barvení výrobků z červeného ovoce [32]
	zlepšení chuti a vůně	nedeklarovaná aromatizace ovocných šťáv
	zlepšení struktury	nadbytečný přídavek pektinů [19]
odstranění	odstranění autentické a cenné složky	izolace kapsaicinu z papriky pro jeho další průmyslové využití

V otázce autenticity ovocných šťáv a dalších výrobků z ovoce (džemy, marmelády, pomazánky, pyré...) se lze nejčastěji setkat s falšováním způsobem náhrady (Tab. 1) [30].

Z důvodu různorodé technologie zpracování rostlinných surovin je však náročné vypracovat metodiku stanovení jednotlivých rostlinných složek, která by byla aplikovatelná na více typů výrobků. Překážkami jsou především různé stupně průmyslového zpracování, rozdílné teplotní namáhání surovin po rozdílnou dobu a velká rozličnost ingrediencí používaných ve finálních výrobcích, které mohou způsobovat vzájemné zamezení detekce běžnými metodami [30].

Nejběžnější postup identifikace falšování vychází především z analýzy vybraných kritérií, chemických markerů, jejichž hodnoty jsou porovnávány s existujícími databázemi. V Evropě se nejčastěji používá A.I.J.N. Code of Practice Evropské asociace ovocných šťáv. Autentický produkt pak musí vyhovovat alespoň ve většině sledovaných parametrů [30].

Nejvýznamnějšími markery typickými pro posouzení pravosti výrobků z ovoce jsou: refraktometrická sušina, hustota, kyseliny (jablečná, citronová), cukry, formolové číslo, popel, fosfor, draslík, hořčík, sodík, vápník, prolin [30].

Markery typické pro určitý druh ovoce jsou: sorbitol (např. jablka, hrušky, meruňky), kyselina isocitronová (např. jahody, pomeranče, meruňky), floridzin (jablka), kyselina vinná (vinné hrozny), karotenoidy (např. pomeranče, meruňky), naringin (gřep), hesperidin (pomeranč, mandarinka), eriocitrin (citron), kyselina šikimová (např. mango), sacharóza, aminokyseliny či profil anthokyanů [30].

Markery pro detekci „maskovacích“ látek jsou: sacharóza (cukr), poměr glukóza/fruktóza (cukr), profil oligosacharidů (cukr), syntetická barviva, konzervační látky, kyselina fumarová (syntetická kyselina jablečná) atd. [30].

Při zavádění specifických markerů je nutné počítat s jejich robustností. Což je dle definice schopnost systému zachovat si svou funkčnost navzdory mírnému narušení a poskytuje informaci o jeho spolehlivosti během běžného používání. V potravinářské praxi se pod robustností markeru skrývá představa velmi stabilního chemického nebo fyzikálního parametru charakteristického pro konkrétní výrobek či naopak indikujícího konkrétní způsob falšování. Za robustní marker je považován parametr, který i při odchylce od běžného stavu (netradiční surovina, receptura, změna výrobních podmínek) poskytuje správný závěr. Pro posouzení celkové robustnosti je nutné znát informace o kritických mezních podmínkách, při kterých je sledování konkrétního markeru ještě vhodné a kdy je již vhodná kontrola jinými metodami [30].

Základní požadavky na konkrétní marker autenticity jsou:

- nízká přirozená variabilita jeho obsahu v surovinách,
- jedinečnost (přítomnost pouze ve sledované složce),
- stabilita během výroby a skladování finálního výrobku,
- dostupnost vhodné analytické metody a její spolehlivost pro kvantifikaci markeru [30].

Robustnost systému vůči změnám je vhodné otestovat prostřednictvím plánovaných experimentů (DOE – design of experiments) [30].

2.4 Laboratorní metody ověřování autenticity potravin

Pro posuzování autenticity potravin se využívá široká škála laboratorních metod, počínaje prostými sensorickými testy (posouzení chutě, vůně) až po sofistikované molekulárně-biologické techniky. Přehled nejběžnějších metod je podrobněji rozepsán v Tab. 2 [29].

Tab. 2 Přehled laboratorních metod využívaných pro stanovení autenticity potravin [30]

Princip	Metoda	Technika
senzorický		
fyzikální	strukturní	mikroskopie
	fyzikální parametry	analýza hustoty, rozpustnosti
fyzikálně-chemický	základní	volumetrie, gravimetrie
	chromatografická	LC, GC (+MS), TLC
	spektroskopická	UV/VIS, IR, AAS, NMR, Ramanova spektroskopie
	elektromigrační	elektroforéza
izotopový		SNIF-NMR
biologický	imunologická	ELISA, LFIA
	molekulárně-biologická	real-time PCR, PCR-HRM

K průkazu, že došlo k falšování zkoumaného produktu, je zpravidla potřebná kombinace několika technik. Jen ve výjimečných případech postačuje jediná technika. Záleží především na charakteru falšování a způsobu jeho provedení [29].

Odběry vzorků pro analýzy musí být prováděny pověřenou osobou v souladu s příslušnými pravidly EU. Používané techniky pak musí být charakterizovány dle následujících kritérií:

- pravdivost (nejčastěji charakterizovaná výtěžností),
- vhodnost (matrice a rozsah koncentrací),
- mez detekce,
- mez stanovitelnosti,
- preciznost (opakovatelnost a reprodukovatelnost),
- selektivita,
- citlivost,
- linearita,
- nejistota měření a případná další kritéria [19].

Dnes již existuje velké množství literatury popisující metodiky o průkazech autenticity potravin, soubor literárních odkazů k této problematice je zpracován např. ve Výzkumném ústavu potravinářském v Praze. Projekty na implementaci nových metod pro odhalení falšování potravin dnes řeší hlavně výzkumné instituce a specializované ústavy na vysokých školách [32].

V kapitolách níže je věnována pozornost nejčastěji využívaným metodám pro analýzu potravin (chromatografické, spektrální, elektroforetické) a podrobněji pak technikám využívaným v experimentální části práce (PCR, HRM, gelová elektroforéza).

2.4.1 Chromatografické metody

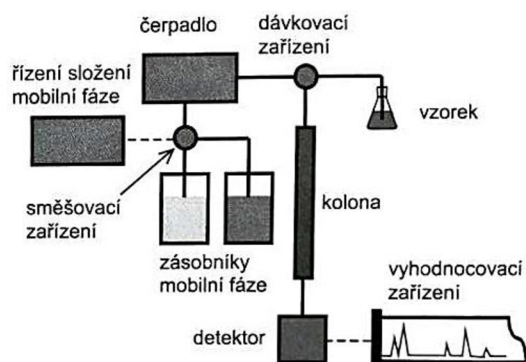
Chromatografické metody v sobě zahrnují velké množství různých separačních technik, které jsou však shodně založeny na rozdílné afinitě dělených látek ke stacionární (nepohyblivé) a mobilní (pohyblivé) fázi. Mobilní fázi (MF) bývá kapalina nebo plyn a podle toho se technika nazývá kapalinová či plynová chromatografie. Stacionární fáze (SF) je uložena v koloně, kde s ní interaguje analyt a je dělen na jednotlivé složky. Separované složky pak přechází z kolony do detektoru, kde jsou jejich látkové vlastnosti převedeny na elektrický signál. Výstup chromatografické analýzy se zaznamenává do grafu zvaného chromatogram [34; 35].

Volbou nejrůznějších detektorů lze stanovit široké množství látek od kontaminantů a pesticidů po jednotlivé složky potravin (sacharidy, mastné kyseliny, aminokyseliny, vitaminy, aromatické látky...). Metody jsou proto široce využívány i k ověřování autenticity [19].

2.4.1.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Přestože byla kapalinová chromatografie vyvinuta již v roce 1906, technika vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) započala svůj rozvoj teprve v šedesátých letech minulého století, kdy došlo ke značnému rozvoji moderního chemického průmyslu a kdy se technika uplatnila především pro analýzu cukrů [34; 36].

Díky široké variabilitě stanovení a vysoké citlivosti se z HPLC (Obr. 1) za krátkou dobu stala technika využívaná ve většině oblastí průmyslu. V potravinářství se metoda rutinně využívá v souvislosti s falšováním potravin rostlinného původu, např. při stanovování profilu anthokyanů (obarvení produktu nepřirozeným pigmentem) či profilu polyfenolů (odlišení citrusových šťáv) [32; 30].

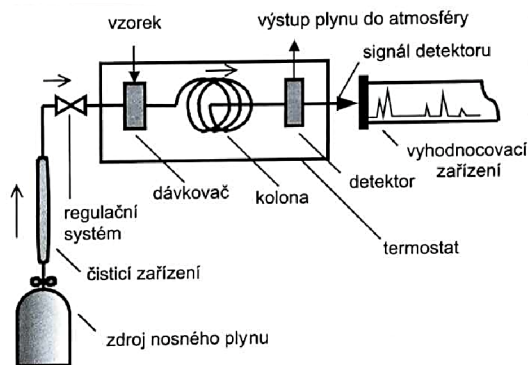


Obr. 1 Schéma uspořádání kapalinového chromatografu [37]

2.4.1.2 Plynová chromatografie

U plynové chromatografie (GC) dochází při nástřiku analytu na kolonu (Obr. 2) k jeho zplynění, proto je metoda nevhodná pro analýzu makromolekul, anorganických solí a dalších nezplynitelných látek. Analyt je během analýzy unášen nosným plynem (MF), který se na rozdíl od MF při HPLC nepodílí na separaci složek analytu. [37].

Běžně se lze setkat s technikou GC v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (MS). Tato kombinace se využívá zejména v oblasti stopové analýzy organických kontaminantů a pesticidů. Technika je však nezastupitelná i při analýze lipidů a stanovení profilu oligosacharidů (použití enzymu celulóza) [19; 30].



Obr. 2 Schéma uspořádání plynového chromatografu [37]

2.4.2 Spektrální metody

Spektrální metody jsou metody založené na výměně energie mezi látkou a zářením. Spektrum je závislost veličiny, která je mírou intenzity záření vysílaného nebo prošlého vzorkem, na vlnové délce záření λ . Přístroje, kterými se měří emisní či absorpční spektra látek, se nazývají spektrometry (Obr. 3) [37].

Jestliže dochází k absorbování záření analytem, mluvíme o absorpční spektrometrii, pokud analyt záření emituje, mluvíme o emisní spektrometrii. V případě interakce záření s celými molekulami mluvíme o molekulové spektrometrii, pokud interagují jen atomy, mluvíme o atomové spektrometrii [35].

2.4.2.1 Nukleární magnetická rezonance

Metoda nukleární magnetické rezonance (NMR) umožňuje stanovení přesné struktury molekul až na úroveň izotopů prvků. Při ověřování autenticity potravin nachází využití při určování geografického původu vzorku. Dále je možné zjišťovat nedeklarované ředění vína či ovocné šťávy (studium poměru cukr-voda), lze rozlišit syntetický či zemědělský původ vzorku [19; 38].

2.4.2.2 UV/VIS spektroskopie

Podstatou UV/VIS spektroskopie je schopnost absorpce aplikovaného záření o určité vlnové délce (od 200 do 800 nm) zředěnými roztoky molekul. Absorpcí záření dochází k excitaci valenčních elektronů uvnitř molekulových orbitalů na vyšší energetické hladiny. V závislosti na typu analytu, druhu jeho interakce se zářením a použité vlnové délce záření je možné identifikovat konkrétní sloučeniny [37; 39].

Principem metody je měření rozdílu intenzity mezi zářením dopadajícím na vzorek a zářením, které vzorkem prošlo. Podíl těchto hodnot se označuje jako transmitance T a je popsána rovnicí (1)

$$T = \frac{\Phi}{\Phi_0}, \quad (1)$$

kde Φ_0 značí dopadající tok záření a Φ je prošlý tok [37].

Při této technice se však využívá absorpčních vlastností vzorku, proto je zavedena absorbance A , která je popsána vztahem (2)

$$A = -\log T = \log \frac{\Phi_0}{\Phi}, \quad (2)$$

ze kterého platí, že pokud bude absorpce záření nulová, bude nulová i absorbance, a bude-li se transmitance blížit nule, absorbance se bude blížit nekonečnu. Pro praktické měření v laboratoři nachází využití pouze hodnoty A nepřekračující jedničku [37].

Ve spojitosti s molekulovou spektrometrií se v praxi často využívá Lambert-Beerův zákon vyjádřený vztahem (3)

$$A = \varepsilon_{\lambda} c l, \quad (3)$$

který popisuje vzájemné vztahy mezi látkovou koncentrací vzorku c v $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, tloušťkou absorbující vrstvy l v cm a molárním absorpčním koeficientem ε o dané vlnové délce λ . Koeficient je látkově specifickou konstantou, jež se mění i v závislosti na vlnové délce a je vyjadřován v $\text{dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [37].

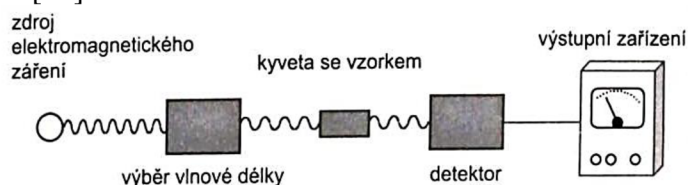
Při analýze, kde spolu složky obsažené ve vzorku neinteragují, je využíváno aditivních vlastností absorbance, při kterých platí, že pokud více složek absorbuje aplikované záření, je celková A součtem absorbancí jednotlivých složek, jak popisuje vztah (4)

$$A = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \varepsilon_1 c l_1 + \varepsilon_2 c l_2 + \dots + \varepsilon_n c l_n, \quad (4)$$

který zobrazuje součet absorbancí složek s indexem 1 až n [39].

Lambert-Beerův zákon lze však aplikovat jen na zředěné roztoky do maximální koncentrace kolem $10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Koncentrované roztoky totiž nesplňují lineární závislost mezi koncentrací roztoku a hodnotou jeho absorbance [37].

Samotná analýza vzorků pomocí metody UV/VIS spektrometrie v první fázi zahrnuje přípravu kalibračních roztoků o přesné koncentraci. U vzorku se střední koncentrací je proměřeno absorpční spektrum, což je závislost $A=f(\lambda)$, díky kterému je zjištěna vlnová délka λ_{max} , při které analyt absorbuje nejvíce záření A_{max} . Při této vlnové délce jsou pak proměřeny absorbance i ostatních kalibračních vzorků a je sestrojena tzv. kalibrační křivka, což je závislost $A = (c)$. U vzorků s neznámou koncentrací analytu je po proměření absorbance možné zpětně dopočítat koncentraci [35].



Obr. 3 Schéma uspořádání jednopaprskového spektrometru pro měření absorpce [37]

Pro potravinářský průmysl je metoda významná především pro stanovení barevných látek a komplexů, nebo barevných produktů specifických reakcí (stanovení bílkovin Bradfordovou metodou, stanovení fenolických látek Folin-Ciocalteuovým činidlem...) [19; 36].

Při analýze potravin molekulárně-biologickými metodami se pro stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA nejčastěji používá právě technika UV/VIS spektrometrie (více v kapitole 2.5.4) [40].

2.4.3 Elektroforetické metody

Zónovou, kapilární, papírovou či gelovou elektroforézu řadíme mezi elektroforetické metody, které pro dělení látek využívají stejnosměrný elektrický proud s konstantním napětím. Složky analytu jsou děleny na základě jejich migrační rychlosti, která se odvíjí od velikosti, tvaru a náboje částic. Obecně platí, že složky o malé molekulové hmotnosti a látky s větším nábojem migrují médiem rychleji než látky o vysoké molekulové hmotnosti a o malém náboji [39; 37; 32].

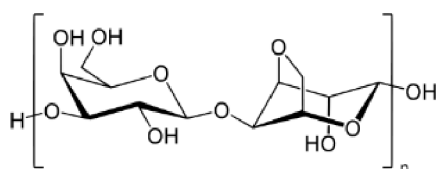
Elektroforéza nachází využití při různých obtížných analytických separacích. Dříve se běžně používala pro analýzu sacharidů, vitaminů a dalších biochemicky zajímavých látek. Do dnešních dní stále nachází velký význam v analýze proteinů (enzymů, hormonů, protilátek) a nukleových kyselin (DNA, RNA), pro něž nabízí bezkonkurenční rozlišení [39].

2.4.3.1 Gelová elektroforéza

Jak již název napovídá, gelová elektroforéza využívá jako dělicí médium gel. V závislosti na charakteru analýzy může být z polyakrylamidu nebo agarózy. Pro preparativní účely se pracuje s gelem v podobě sloupce, pro analytické účely je vhodnější plošné uspořádání [35].

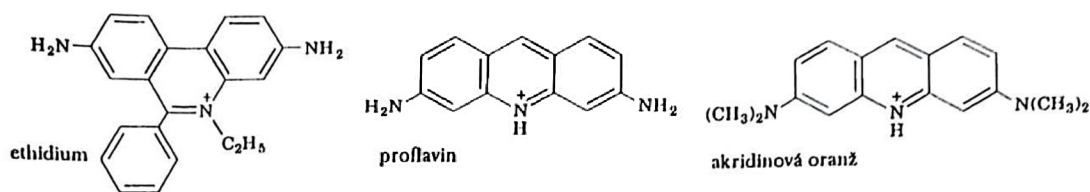
Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE) se nejvíce využívá pro separaci bílkovin. Pro vyrovnání rozdílů v nábojích proteinů, které u jednotlivých aminokyselin závisí na pH prostředí, se ke vzorkům přidává anionaktivní detergent dodecylsulfát sodný (SDS), který sám nese poměrně velký záporný náboj. Jeho reakcí pak dojde k vyrovnání náboje napříč bílkovinným spektrem a ty jsou pak separovány pouze na základě vlastní velikosti [34].

Elektroforéza v agarózovém gelu je určena pro separaci fragmentů DNA. Samotná agaróza je přírodní polysacharid produkovaný mořskými řasami rodu *Gelidium*, konkrétně se jedná o kopolymer 1,3- β -D-galaktopyranózy a 1,4-3,6-anhydro- α -galaktopyranózy (Obr. 4) [35].



Obr. 4 Strukturální vzorec agarózy [41]

Agarózové gely se obvykle připravují v koncentracích 0,3–2 %, volba se odvíjí od velikosti separovaných fragmentů (1,2% gel je vhodný pro separaci fragmentů o délkách 0,3–7 kb). Na rozdíl od bílkovin disponují molekuly DNA stejným specifickým záporným nábojem, který zajišťují zejména zbytky kyseliny fosforečné, proto separace přirozeně probíhá jen na základě velikosti molekul. Pro přípravu gelu se agarózový prášek rozpouští v Tris-borátovém (TBE), Tris-acetátovém (TAE) či Tris-fosfátovém (TPE) pufru v rozmezí pH 7–8. K potlačení agregace DNA ionty Ca^{2+} a Mg^{2+} se obvykle využívá standardní přídavek ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid). Pro vizualizaci fragmentů (z angličtiny často označovaných jako bandy) slouží tzv. interkalační činidla, nejběžněji ethidiumbromid, proflavin či akridinová oranž (Obr. 5), která po vmezeření mezi páry bází pod UV světlem poskytují fluorescenci. Práce s nimi však musí probíhat za přísných podmínek, neboť jsou prokázány mutageny, proto dnes mnoho laboratoří přechází na nemutagenní barviva jako GelStar[®], SYBR[®] Green I, SYBR[®] Gold nebo YOYO-1 [35; 34; 42; 43; 44; 45].

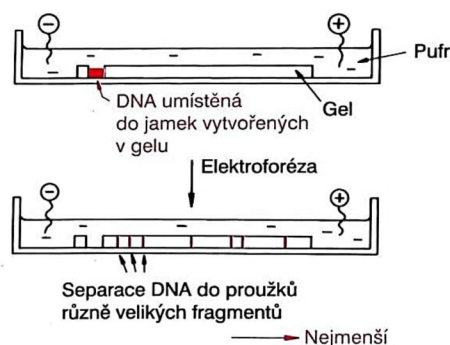


Obr. 5 Strukturální vzorce nejběžnějších interkalačních činidel [34]

Vzorky DNA je vhodné před samotnou aplikací na gel smísit s nanášecím pufrem, který má hned dvě funkce: zvyšuje hustotu vzorku (udrží vzorky při přelévání pufrem v jamkách) a obarvuje jej (snadnější manipulace). Přítomná barviva (nejčastěji bromofenolová modř) jsou navíc slabě negativně nabitá, což umožňuje jejich migraci k anodě společně s DNA [44].

Po převedení DNA do jamek v gelu následuje přelití gelu pufrem použitým při přípravě gelu. Soustava se poté připojí ke zdroji stejnosměrného elektrického proudu. Protože je DNA na povrchu záporně nabitá, bude se pohybovat ke kladně nabitě elektrodě. Agarózový gel zde zastává funkci síta, kde malé fragmenty prochází rychleji než fragmenty velké, kterým v postupu brání právě póry gelu. [42; 34].

Celkové uspořádání gelové elektroforézy a chování vzorku po aplikaci stejnosměrného proudu ukazuje Obr. 6.



Obr. 6 Schéma gelové elektroforézy při separaci fragmentů DNA [42]

Po skončení samotné elektroforézy je důležité určit velikost separovaných fragmentů. V zásadě existují dva způsoby: matematický výpočet či porovnání se standardem.

Matematický výpočet zahrnuje použití vzorce (5)

$$D = a - b(\log M), \quad (5)$$

kde D je vzdálenost, kterou molekula urazila, M je molekulová hmotnost a a a b jsou konstanty závislé na podmínkách elektroforézy [42].

Přesné stanovení je však nutné jen ve výjimečných případech. Nejčastěji se ke každému elektroforetickému gelu přidává délkový standard obsahující fragmenty o známé velikosti. Porovnáním bandů mezi analyzovaným vzorkem a standardem pak lze velikost separovaných fragmentů snadno odhadnout [42].

2.4.4 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je základní technika v molekulární biologii, která umožňuje rychlé namnožení konkrétního úseku DNA.

Při procesu PCR se v cyklech opakují tři klíčové kroky: denaturace, hybridizace a elongace. Opakováním těchto cyklů (obvykle 20–40krát) je specifická sekvence templátové DNA exponenciálním trendem namnožena, což se projevuje velkým nárůstem koncentrace specifických sekvencí za poměrně krátkou dobu. Docela malé množství vzorku lze tak lehce převést na množství detekovatelné např. elektroforézou (více níže). Analýza PCR je velmi všestranná a může být přizpůsobena různým aplikacím úpravou různých parametrů, jako jsou počty cyklů, sekvence primerů a podmínky reakce. Navíc existuje celá řada modifikací vhodných pro rozličné účely [32].

Například při multiplex-PCR je do reakční směsi přidáváno hned několik párů primerů, zpětná PCR (RT-PCR) je určena pro amplifikaci RNA, odstupňovaná PCR (nested PCR) jedním párem primerů amplifikuje specifický úsek templátové DNA a druhým amplifikuje specifický fragment amplikonu vzniklého v předchozím kroku [46].

Kapitoly níže budou pojednávat především o real-time PCR, která umožňuje sledování procesu amplifikace v reálném čase pomocí zaznamenávání fluorescenčního signálu v každém cyklu reakce.

PCR analýza se rychle stala zásadní pro různé aplikace jako např. genetické testování, sekvenování DNA, forenzní vědy a lékařskou diagnostiku. V masném průmyslu lze touto technikou rozlišit jednotlivé živočišné druhy masa, v rostlinném odvětví je důležitá kontrola přítomnosti geneticky modifikovaných rostlin (sója, brambory, rýže, rajčata...), rozlišení různých druhů ovoce a speciálních cereálií či odlišení odrůd kávy Arabika a Robusta u mleté a instantní kávy [32; 13].

2.4.4.1 Komponenty PCR směsi

Aby PCR mohla správně fungovat, musí reakční směs obsahovat několik komponent:

- Templátová DNA (DNA matrice) – představuje celou genomickou DNA či jen její fragment, jenž je předmětem analýzy. PCR je natolik citlivá technika, že umožňuje amplifikaci již od dvou molekul matrice [47].
- Primery – ohraničují požadovaný úsek řetězce templátové DNA pro amplifikaci (amplikon) s vysokou specifitou. Vždy musí být v reakční směsi přítomny v páru (primer F – forward, primer R – reverse). Jejich délka by měla dosahovat 20–30 nukleotidů, přičemž obsah G a C by měl být přibližně vyrovnaný. Pro jejich sekundární strukturu je typická nízká stabilita. V závislosti na druhu použitých primerů je volena teplota hybridizace T_a , která se odvíjí od znalosti teploty tání primerů T_m [44; 46].

Ideální T_a musí být přiměřeně nízká, aby mohly primery nasednout na matici, avšak zároveň dostatečně vysoká, aby nedocházelo k tvorbě dimerů primerů. Obecně platí, že T_a během experimentu odpovídá T_m ponížené o 1–2 °C. Výpočet T_m se řídí vztahem (6)

$$T_m = (4 \times [G + C]) + (2 \times [A + T]), \quad (6)$$

kde $[G+C]$ a $[A+T]$ jsou počty jednotlivých bazí v sekvenci primerů, jednotka výsledné teploty je ve °C [42].

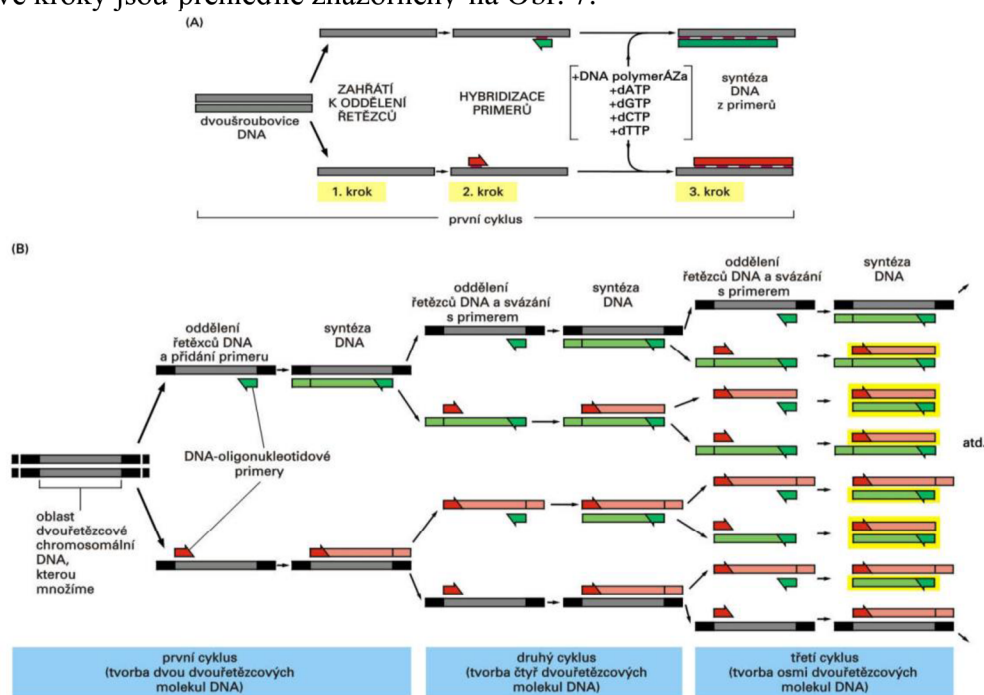
- DNA polymeráza – zajišťuje syntézu samotných amplikonů. Využívá se tzv. *Taq*-polymeráza pocházející z termofilních bakterií *Thermus aquaticus*, jejíž předností je zachování aktivity i při denaturačním kroku. Její použití je ovšem omezeno pouze na syntézu úseků do několika tisíců párů bází. Pro úseky do 35 kb se používají jiné polymerázy, nad tuto hranici není syntéza fragmentů metodou PCR možná [48].
- Deoxynukleotid trifosfáty (dNTP) – zastávají úlohu stavebních jednotek, ze kterých DNA polymeráza syntetizuje nové řetězce amplikonů. Reakční směs musí obsahovat ekvimolární množství dATP, dTTP, dCTP i dGTP o koncentraci každé složky v rozmezí 200–250 μM při použití *Taq*-polymerázy [44].
- Dvojmocné kationty – zpravidla Mg^{2+} , jsou přítomny pro zachování aktivity DNA polymerázy. Koncentrace iontů by měla vždy převyšovat koncentraci dNTP a primerů. Přesná množství však závisí na volbě primerů i DNA matrici [44].
- Jednomocné kationty – zpravidla Na^+ či K^+ , jsou, při amplifikaci fragmentů do 500 bp, v PCR pufru v koncentraci kolem 50 mM, koncentrace 70–100 mM zvyšuje výtěžnost amplifikace úseků kratších [44].
- Pufr – poskytuje prostředí o stabilním pH, kde jsou rozpuštěny výše uvedené komponenty [44].

2.4.4.2 Kroky při amplifikaci

Při procesu PCR dochází k opakování tří základních kroků, během kterých probíhají tři odlišné děje s odlišnými nároky na teplotu a doby její trvání:

- denaturace – oddělení řetězců DNA (94 °C po dobu 30 s),
- hybridizace – připojení primerů k odděleným řetězcům (30–65 °C po dobu 30 s),
- elongace – syntéza nových řetězců DNA-polymerázou (72 °C po dobu až 1 min) [46; 49; 44].

Jednotlivé kroky jsou přehledně znázorněny na Obr. 7.



Obr. 7 Schéma průběhu polymerázové řetězové reakce [49]

2.4.4.3 Detekce a kvantifikace amplikonů

Převládajícím způsobem detekce produktů amplifikace je měření a kvantifikace fluorescenčního signálu v reálném čase. Provádí se třemi různými způsoby:

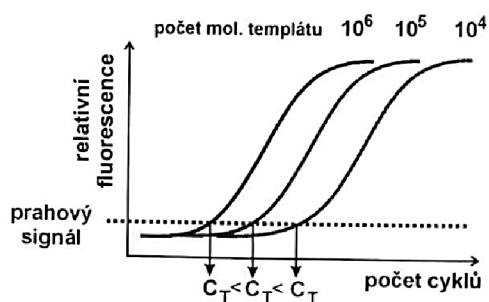
- použitím interkalačního barviva vázajícího se na DNA,
- použitím fluorescenčně značených sond vázající se na střední část amplikonů,
- nebo použitím fluorescenčně značených primerů [46].

Látky pro značení sond a primerů jsou obecně označovány jako fluorofory a jejich vlastnosti jim dovolují emitovat světlo jiné (vyšší) vlnové délky, než kterou absorbovaly [46].

Pro kvantifikaci se běžně používají fluorescenční kyaninová barviva SYBR[®] Green, jež po navázání na menší žlábek dsDNA poskytují až 1000× větší fluorescenci. Intenzita záření je přitom přímo úměrná množství amplikonů. Bohužel dochází k vazbě tohoto barviva i na nespecifické produkty, čímž se zkresluje signál na výstupu [46].

Jako další lze pro detekci produktů využít technologii TaqMan, molekulární majáky a další [46].

Při real-time PCR se za kvantitativní údaj považuje počet cyklů, které jsou potřebné k dosažení prahového detekovatelného signálu (C_T), což je hodnota úměrná původní koncentraci matrice DNA. Celkový výstup závislosti relativní fluorescence na počtu cyklů je graficky znázorňován ve formě amplifikační křivky (viz Obr. 8) [34].



Obr. 8 Schéma amplifikační křivky [34]

Pro optickou vizualizaci produktů PCR se využívají elektroforetické metody. Gelová elektroforéza dokáže fragmenty DNA dělit podle jejich velikosti, což se na gelu projevuje v podobě výrazných bandů. Nejběžnějším gelovým médiem bývá agaróza, která je vhodná pro dělení delších úseků, a polyakrylamid, který tvoří menší póry a dokáže tak oddělit krátké fragmenty lišící se i pouhou jednou bází. Více o elektroforéze v kapitole 2.4.3.1 [34].

2.4.4.4 Optimalizační operace

Celkový výtěžek a specifita výsledných ampliconů závisí na řadě faktorů, z nichž nejčastější je manipulace s výběrem primerů, volba hybridizační teploty T_a , koncentrace Mg^{2+} iontů a další. Podrobný výpis faktorů a jejich vliv na průběh analýzy je uveden v Tab. 3 [34].

Tab. 3 Faktory pro optimalizaci PCR [34]

Faktor pro optimalizaci	Vliv na PCR analýzu
teplotní profil PCR	malý výtěžek = vysoká T_a , krátká doba nespecifické produkty = nízká T_a
koncentrace Mg^{2+} (obvykle 0,5–5 mM)	malý výtěžek = nízká koncentrace nespecifické produkty = vysoká koncentrace
volba a koncentrace primerů (obvykle 1 μ M)	nespecifické produkty = sekvence částečně či úplně komplementární k jinému úseku matrice, vysoká koncentrace
kvalita templátu a jeho koncentrace (obvykle ng– μ g)	malý výtěžek = nízká koncentrace, přítomnost inhibitorů nespecifické produkty = kontaminace jiným templátem
koncentrace dNTP (obvykle 100–500 μ M)	vliv na výtěžek a správnost sekvence ampliconů
eliminace inhibitorů	rozebráno v kapitole 2.5.3
použití techniky „hot-start“ nebo „nested PCR“	ovlivnění citlivosti, výtěžku a specifity

2.4.5 Vysokorozlišovací analýza křivek tání

V roce 1997 byla poprvé představena technologie LightCycler, která zkombinovala standardní PCR analýzu se stálým měřením fluorescenčního signálu a analýzou křivek tání. Doposud totiž bylo běžné, že obě analýzy probíhaly na samostatných přístrojích. Jejich sloučením se dosáhlo zjednodušení při manipulaci se vzorky a výrazného snížení celkového času potřebného pro analýzu [50].

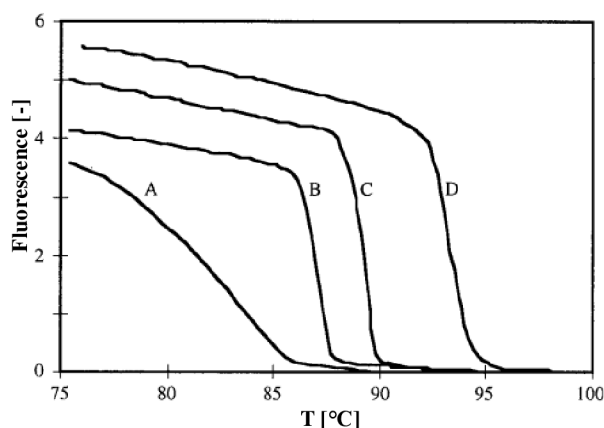
Podstatou vysokorozlišovací analýzy křivek tání (HRM) je postupné kontrolované zahřívání produktů PCR za současného měření fluorescence. Nejpoužívanějším fluorescenčním barvivem se stal SYBR[®] Green I, který na rozdíl od ostatních interkalačních barviv disponuje nízkou mutagenitou a silným fluorescenčním efektem. Vlastností interkalačních barviv je prudký nárůst jejich schopnosti fluoreskovat při vmezeření do struktury DNA. Pokud postupným zahříváním ampliconů dochází k jejich denaturaci, začne se ze struktury barvivo uvolňovat, což se projeví klesající intenzitou fluorescence. Grafická závislost (relativní) intenzity fluorescence na teplotě se označuje jako křivka tání. Při HRM nabývá teplotní krok v rozmezí 0,01–0,2 °C/s, při nastavení vyššího kroku se již zpravidla hovoří o standardní analýze křivek tání [51; 52].

Technika PCR-HRM dnes nachází významné uplatnění při analýze a odhalování geneticky modifikovaných rostlinných druhů a toxických kontaminantů [53].

2.4.5.1 Metody vyhodnocení dat

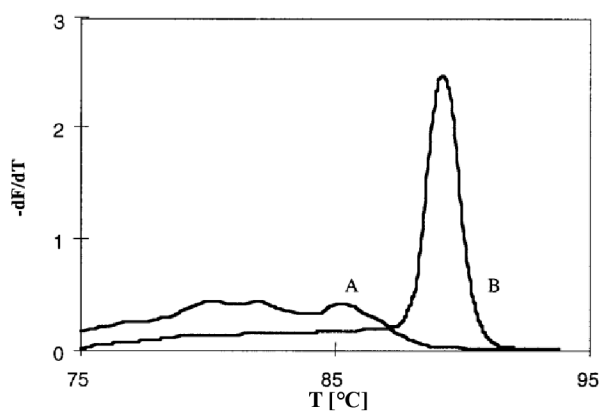
Při studiu tání ampliconů se vychází ze znalostí síly vodíkových můstků mezi dusíkatými bázemi (A, T, C, G) uvnitř helixu DNA. G/C páry jsou spojeny třemi vodíkovými můstky, zatímco A/T páry jen dvěma, proto drží G/C páry pohromadě silněji, což se projeví na tání ampliconů a vzhledu jejich křivek tání (Obr. 9). Tvar křivek je závislý na konkrétní sekvenci

bazí a zastoupení C/G a A/T párů, již jediná odchylka v sekvenci nukleotidů může výrazně ovlivnit tvar křivek a odhalit rozdíly ve zkoumaných vzorcích [51].



Obr. 9 Vliv koncentrace CG párů v amplikonu na tvar křivky tání (A – NK, B – 50,0 %, C – 53,2 %, D – 60,3 %). Upraveno dle [51]

Teplota, při které je přesně 50 % dvoušroubovice amplikonu disociováno na jednotlivá vlákna, se označuje jako teplota tání T_m . T_m amplikonu závisí především na jeho délce a obsahu C/G párů, kde s jejich rostoucím obsahem roste i T_m . Lze ji odečíst z inflexního bodu křivky tání nebo z píku funkce první záporné derivace fluorescence podle teploty ($-dF/dT$) na teplotě (T) (Obr. 10) [52].

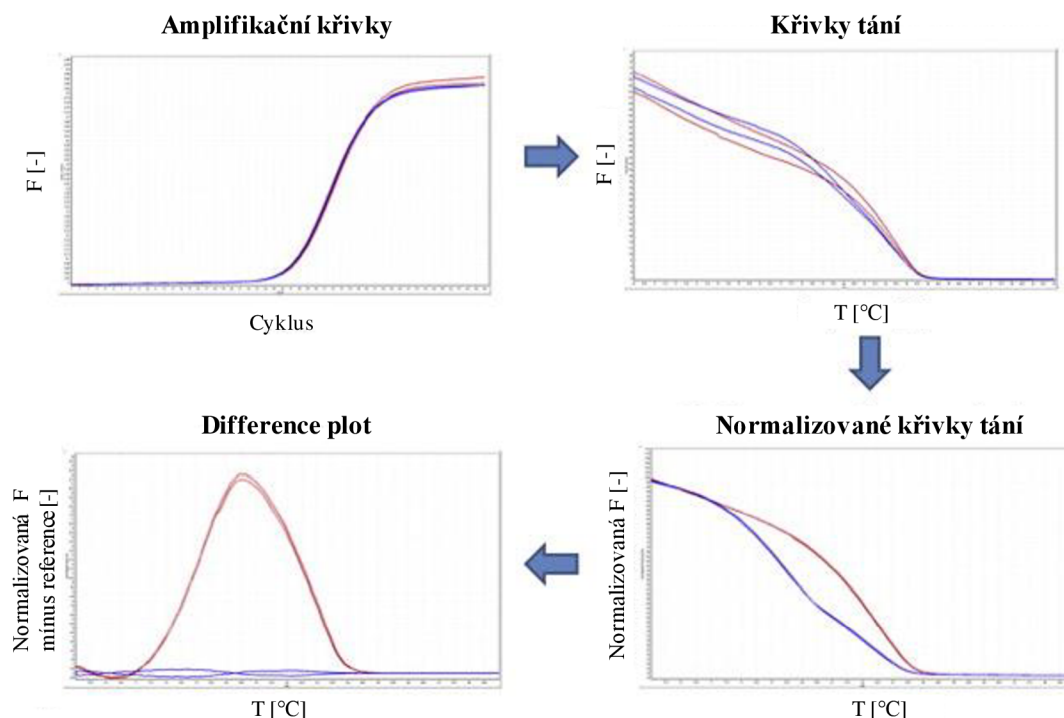


Obr. 10 Derivované křivky tání (A – NK, B – vzorek s DNA). Upraveno dle [51]

Při HRM analýze jsou kladeny vysoké nároky na přesné odměřování komponent (množství barviva, templátu...), protože i malé odchylky v množství mohou ovlivnit průběh PCR a následně i samotnou podobu křivek tání [54]. Zvolené primery by měly účinně amplifikovat konkrétní úseky DNA, současně by však měly být křivky tání amplikonů tvarem dostatečně specifické pro rozdílné matrice. Celková délka amplikonu by neměla přesáhnout 300 bp [52].

Avšak i přes přesné odměřování komponent mohou nastat rozdíly v detekci fluorescenčního signálu. Tyto rozdíly je možné eliminovat normalizací dat, čímž se zvýší přehlednost mezi jednotlivými křivkami [52; 54]. Normalizací dat dojde k nastavení hodnot absolutní fluorescence před táním na 100 % (resp. 1) a po tání na 0 % (resp. 0) (Obr. 11). Zbylá data jsou z normalizované křivky odstraněna. Je důležité správně zvolit normalizovaný úsek, jinak mohou být ztracena zásadní data [54].

Pro výraznější odlišení rozdílů ve tvaru mezi porovnávanými křivkami se využívají tzv. difference plots (zkráceně difference), které zobrazují míru rozdílnosti křivek ostatních vzorků ku vzorku referenčnímu (základně). Interval použitých dat se shoduje s intervalem použitým při normalizaci [52].



Obr. 11 Obvyklý postup při vyhodnocování dat HRM analýzy. Upraveno dle [52]

Pro přesné určení a přehlednou orientaci v podobnostech mezi křivkami tání byl odvozen vzorec, kterým lze spočítat tzv. skóre podobnosti (GCP). Ze své podstaty nabývají výsledné hodnoty rozmezí 0 až 1, kde 1 značí absolutní podobnost mezi křivkami tání srovnávaných vzorků. Vzorcem (7)

$$S_{rt} = 1,05[-0,02 \times \sum_{i=a}^z (F_{ri} - F_{ti})^2] \quad (7)$$

se počítá tzv. hodnota podobnosti S , kde v exponentu figuruje součet druhých mocnin rozdílů mezi fluorescencí F vzorků r a t při teplotě i . Hodnota podobnosti se počítá pro všechny body křivky, proto a značí počáteční teplotu tání a z konečnou teplotu tání [55].

Při opakujících se měřeních se GCP počítá jako průměr hodnot S mezi těmito měřeními. Průměry je vhodné doplnit směrodatnými odchylkami [55]. Křivky jsou považovány za shodné, jestliže GCP nabývá hodnoty 0,9 a výše [56].

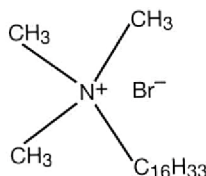
2.5 Izolace DNA z rostlinných pletiv

Pro úspěšnou extrakci čisté DNA z rostlinných pletiv se zachovanou biologickou aktivitou je nutné provést několik purifikačních kroků: rozmělnit rostlinný materiál, narušit přítomné buňky a očistit DNA od inhibitorů [57].

2.5.1 Homogenizace rostlinného materiálu

Rostlinné části (listy, plody) je nejprve nutné za mírných podmínek převést do formy homogenního vzorku, kde budou zastoupeny všechny složky studované části rovnoměrně napříč celým objemem. Homogenizace se nejčastěji provádí ručně (tloučkem, kopístem) nebo strojově. Důležité je použití vhodného homogenizačního média [57].

K pletivům s vysokým obsahem polysacharidů se často při homogenizaci přidává cetyltrimethylamonium bromid (CTAB), což je kationtový detergent schopný, z roztoků s nízkou iontovou silou, vysrážet nukleové kyseliny a kyselé polysacharidy, čímž je oddělí od proteinů a neutrálních polysacharidů, které zůstanou rozpuštěné. Jeho strukturní vzorec je zobrazen na Obr. 12. V roztocích s vysokou iontovou silou vytvoří CTAB komplex s proteiny, nukleové kyseliny zůstávají rozpuštěné. Při izolaci DNA se pracuje v roztoku s vysokou iontovou silou. Komplexy CTAB s proteiny a polysacharidy jsou z roztoku extrahovány a po jejich vysrážení je provedena centrifugace. Ze supernatantu je DNA vysrážena isopropanolem nebo ethanolom. CTAB navíc stabilizuje helix dsDNA [44].



Obr. 12 Strukturní vzorec CTAB [44]

2.5.2 Lyze rostlinných buněk

Po homogenizaci pletiva následuje narušení buněčných membrán za následného vyplavení buněčných organel (lyze). Kvůli přítomnosti buněčné stěny je prostá osmotická lyze nevhodná a zpravidla se využívá přídavek lyzačního (extrakčního) pufru [58]. Složení tohoto pufru se mění v závislosti na použitém protokolu, avšak nejčastěji obsahuje polyvinylpyrrolidon (PVP), CTAB, Tris-HCl, hydrogensíran sodný, NaCl, EDTA či β -merkaptoethanol [59].

Samotná lyze začíná mechanickým rozrušením buněk v přítomnosti extrakčního pufru následovaným krátkou inkubací za zvýšené teploty. Během inkubace by měl být vzorek promícháván. Pro oddělení pevného podílu od roztoku následuje centrifugace [59].

2.5.3 Odstranění inhibitorů

Buňky jsou složeny z pěti hlavních tříd biomolekul: DNA, RNA, proteinů, polysacharidů a lipidů. Většina těchto složek přechází po rozrušení buněk do extrakčního roztoku. Analýzu jedné biomolekuly však obvykle narušuje výskyt ostatních biomolekul, proto byly vyvinuty postupy pro specifické odstranění jednotlivých tříd látek [57].

- DNA – může být odbourána enzymem DNáza, aktivitu tohoto enzymu naopak inhibuje přítomnost EDTA [58]. Přítomnost NH_4^+ iontů podporuje vznik krystalů DNA [60].
- RNA – může být odbourána enzymem RNáza [58].
- Proteiny – dokážou být rozloženy specifickými enzymy zvanými proteázy, které hydrolyticky štěpí peptidové vazby [36; 58]. Vysoká koncentrace solí (NaCl, CaCl_2 , CH_3COONa) má za následek vysolování proteinů [61]. Přídavek organického rozpouštědla (ethanol, aceton) proteiny sráží. Na rozpustnost má také vliv pH prostředí [58].

- Polysacharidy – se v přítomnosti iontů Ca^{2+} začnou srážet a vytvářet segregáty, které je možné centrifugací oddělit [62].
- Lipidy – lze odstranit přidávkem detergentu (např. SDS) nebo extrakcí vhodným organickým rozpouštědlem (směs chloroform:methanol) [42; 36].
- Fenolické látky – se snadno rozpouští v polárních rozpouštědlech, vhodné je např. použití 80% ethanolu, který fenolické látky udrží v roztoku a zároveň sráží většinu polysacharidů a proteinů [36]. Rozpustnost fenolů podporuje i přidavek β -merkptoethanolu, který, jakožto silné redukční činidlo, brání jejich oxidaci [63; 64].

2.5.4 Závěrečná purifikace DNA

Přestože existuje řada komerčních kitů sloužících pro konečné dočištění DNA, většina protokolů využívá vlastní kombinace chemikálií. Nejčastěji se používá ledový 95% ethanol či isopropanol, méně časté je použití soli (CH_3COONa). Tímto postupem je docíleno očištění DNA od látek užitých v předchozích izolačních krocích.

Následuje odstranění alkoholu z izolovaného vzorku. Toho je dosaženo slitím supernatantu a samovolným vypařením zbývajících ethanolu z otevřené zkumavky za zvýšené teploty [59].

DNA je ihned poté resuspendována ve vhodném roztoku, nejčastěji $1 \times \text{TE}$ pufru. Pokud by došlo k přílišnému přesušení DNA, následkem by byl zisk poničeného nebo nízkomolekulárního vzorku [59].

2.5.5 Detekce DNA

Pro detekci a kvantifikaci izolované DNA se nejčastěji využívají tři metody: spektrometrie, fluorimetrie a gelová elektroforéza [56].

Spektrometrické měření využívá vlastností aromatických struktur bazí DNA, které specificky absorbují UV záření určitých vlnových délek. Izolací nukleových kyselin z buněk často dochází ke kontaminaci analytu bílkovinami, které však nejvíce absorbují záření v jiné části spektra než analyt. Ukazateli čistoty izolované směsi jsou pak poměry mezi absorbancemi vzorku při vlnových délkách:

- 260 nm – A_{max} u DNA a RNA (konjugovaný systém dvojných vazeb v bazích),
- 230 nm – A_{max} u fenolických látek a látek použitých při izolaci (soli, Tris-báze, EDTA...),
- 280 nm – A_{max} u proteinů (aromatická část tyrosinu a tryptofanu) [40; 39; 65; 66; 59].

Pro DNA platí, že pokud je absorbance při 260 nm rovna 1,0, odpovídá to 50 μg dsDNA na 1 ml vzorku. Pokud je hodnota poměru A_{260}/A_{280} nižší než 1,80, pak je vzorek kontaminován proteiny, pokles hodnoty poměru A_{260}/A_{230} pod 2,00 indikuje přítomnost zbytků činidel použitých pro izolaci DNA či kontaminaci látkami, které se izolačním protokolem nepodařilo odstranit (RNA, fenoly, polysacharidy) [40; 42; 59].

Pro stanovení koncentrace DNA je možné použít i fluorimetr [59]. Jedná se o jednoduchou, nedestruktivní a relativně levnou techniku s nízkým detekčním limitem. Na rozdíl od spektrometru dokáže měřit přímo koncentraci DNA měřením množství fluorescenčního záření emitovaného strukturami polyaromatických uhlovodíků a heterocyklů [67].

Nejběžnějšími technikami pro detekci molekul však zůstávají UV/VIS spektrometrie a gelová elektroforéza. Obě techniky jsou podrobněji popsány v kapitolách 2.4.2.2 a 2.4.3.1.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Veškerá laboratorní praxe byla realizovaná v prostorách FCH VUT, převážně pak v Laboratoři molekulární biotechnologie.

3.1 Materiál

3.1.1 Ovocné vzorky

Pro pozitivní kontroly byla použita DNA z listů jabloně, broskvoně a meruňky. Analyzovaná pyré byla připravena ze zralých plodů broskví a meruněk. Listy i plody broskvoně navíc pocházely ze stejného stromu.

3.1.2 Chemikálie

- Agaróza pro gelovou elektroforézu (Sigma-Aldrich, USA)
- Cetyltrimethylamonium bromid – CTAB (Sigma-Aldrich, USA)
- DNA standard FastGene 100 bp DNA Ladder (Malamité, ČR)
- EliGene Plant DNA Isolation Kit (Elisabeth Pharmacon, ČR)
- Ethanol (Penta, ČR)
- Ethylendiaminotetraoctová kyselina – EDTA (Penta, ČR)
- GenElute-E Organic Solvent DNA Cleanup Kit (Sigma-Aldrich, USA)
- Chlorid sodný (Lachner, ČR)
- Chlorid vápenatý (Penta, ČR)
- Chloroform:isoamyl-alkohol (Serva, Německo)
- Isopropanol (Carlo Erba, Německo)
- Kyselina boritá (Penta, ČR)
- Midori Green Advance DNA Stain (NIPPON Genetics EUROPE, Německo)
- Octan amonný (Lachema, ČR)
- Octan sodný (Lachema, ČR)
- PCR Loading buffer Red load (Top-Bio, ČR)
- PCR ultra H₂O (Top-Bio, ČR)
- Primery – Tab. 5 (Generi Biotech, ČR)
- qPCR 2x SYTO-9 Master Mix (Top-Bio, ČR)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan – Tris-báze (Serva, Německo)
- β-merkptoethanol (Sigma-Aldrich, USA)

3.1.3 Přístroje a pomůcky

- Centrifuga Z216 MK (Hermle, Německo)
- Combi-spin FVL-2400N Mini centrifuge (Biosan, Německo)
- DNA/RNA UV-cleaner box UVC/T-AR (Biosan, Lotyšsko)
- Elektroforetické vany B2 a D2 (Owl Separation systems, Inc., USA)
- Laboratorní váhy KERN CM 60-2N (UNIPRO-ALPHA, ČR)
- LightCycler® Nano Instrument (Roche, Švýcarsko)
- Lyofilizátor FreeZone Triad (Labconco, USA)
- Mikropipety Acura® Manual 825 (Socorex, Švýcarsko)
- Mikropipety Discovery comfort (HTL, Polsko)
- Mikropipety Finnpiette F2 (Thermo Scientific, USA)

- Mikrovlnná trouba (SENCOR, ČR)
- Mikrovlnný autokláv Microjet (Rodwell, Spojené království)
- Mikrozkuřavky různých velikostí (Eppendorf, Německo)
- Mini incubator 230 V (Labnet, USA)
- Mraznička a chladnička (Gorenje, Slovinsko)
- MS2 Minishaker Vortexer (IKA Works, Německo)
- NanoDrop Spectrophotometer 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Termocykler Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Nizozemsko)
- Transluminátor Azure Biosystems c200 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Zdroj elektrického napětí na elektroforézu Enduro 300 V (Labnet, USA)
- Další laboratorní pomůcky (špičky, buničina, pinzeta, váženka, lžička...)

3.2 Metodika

3.2.1 Úprava vzorků pro analýzu

3.2.1.1 Úprava listů z ovocných stromů

Všechny vzorky listů z jabloně (J), broskvoně (B) i meruňky (M) (viz Obr. 13) byly před samotnou izolací DNA zbaveny nánosů nečistot pod tekoucí vodou a byly vysušeny buničinou. Poté byly skladovány v chladničce při teplotě -4 °C.



Obr. 13 Listy broskvoně (vlevo) a meruňky (vpravo) připravené pro izolaci DNA

3.2.1.2 Příprava ovocných pyré a jejich úprava

Celé plody byly řádně omyty vodou. Následně byly na 1 min ponořeny do vroucí vody a po vyjmutí byly vloženy do ledové lázně. Po zbavení plodů slupek a pecky bylo provedeno jejich úplné rozmělnění. V průběhu celého procesu bylo dbáno na zamezení vzájemné kontaminace.

Z čistých pyré broskve a meruňky pak bylo připraveno 7 vzorků o různých poměrech ovocných složek o celkové hmotnosti 50 g. Konkrétní poměry složek v pyré popisuje Tab. 4. Směsi byly uchovány v chladničce.

Tab. 4 Složení směsí pyré v závislosti na podílu ovocných složek

Označení	100B	10M	30M	50M	70M	90M	100M
podíl broskve [%]	100	90	70	50	30	10	0
podíl meruňky [%]	0	10	30	50	70	90	100

Ovocná pyré bylo nezbytné před samotnou izolací DNA zlyofilizovat. Proto bylo připraveno sedm 50ml sterilních zkumavek, do kterých bylo vždy převedeno asi 15 ml homogenního vzorku (Obr. 14). Zkumavky byly řádně uzavřeny a uloženy ke zmrazení při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 72 hodin. Následně byly vzorky vloženy do lyofilizátoru, kde byly ponechány 1–2 dny do úplného vysušení.



Obr. 14 Lyofilizovaná pyré připravená na izolaci DNA

3.2.2 Izolace DNA

3.2.2.1 Izolace DNA z ovocných listů CTAB protokolem

Do 2ml mikrozkušavky bylo naváženo 0,05 g rostlinného materiálu (listu broskvoně či meruňky) a 200 mg homogenizačního písku. Dále byl do zkumavky přidán 1 ml CTAB pufru a 1 μl β -merkaptóethanolu. Vzorek byl třen kopístem a poté inkubován po dobu 30 minut při $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, během inkubace byl vzorek každých 10 min promíchán převrácením zkumavky. Po inkubaci byl vzorek ponechán 10 minut vychladnout a následně bylo přidáno 800 μl směsi chloroform:isoamylalkohol v poměru 24:1. Vzorek byl znovu převrácením promíchán a poté byl centrifugován 10 minut při $10\,000 \times g$.

Přibližně 800 μl supernatantu (horní vodné fáze) bylo přeneseno do čisté 2ml mikrozkušavky a k němu bylo přidáno 480 μl isopropanolu. Vzorek byl několikerým převrácením zkumavky promíchán a byl inkubován 1 minutu při laboratorní teplotě. Dále byl vzorek centrifugován 5 minut při $10\,000 \times g$. Opatrným převrácením zkumavky byl supernatant odlit a k sedimentu bylo přidáno 500 μl 10 mM octanu amonného v 70 % ethanolu (pro přípravu 10 mM octanu amonného bylo smícháno 38,5 mg octanu amonného a 50 ml 70 % ethanolu). Po přidání octanu amonného k sedimentu byl vzorek inkubován 30 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí požadovaného času byl vzorek centrifugován 5 minut při $10\,000 \times g$.

Supernatant byl znovu odstraněn a sediment byl vysušen v otevřené zkumavce 15 minut při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně bylo k sedimentu přidáno 250 μl TE pufru a sediment byl resuspendován. Obsah zkumavky byl krátce stočen a následně bylo přidáno 250 μl 5M chloridu sodného (pro přípravu 5 M chloridu sodného bylo naváženo jeho množství 48,83 g a bylo přidáno 150 ml destilované vody, poté byl roztok sterilizován v autoklávu). Po přidání chloridu sodného byl roztok promíchán, krátce stočen a následně k němu bylo přidáno 25 μl 3 M octanu sodného a 1250 μl studeného 96 % ethanolu. Poté byl roztok promíchán několikerým převrácením zkumavky a byl inkubován 15 minut při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po uplynulé době byl roztok centrifugován 15 minut při $10\,000 \times g$.

Nakonec byl supernatant odlit, sediment byl při 37 °C dosušen a následně rozpuštěn v 100 µl TE pufru – (TE pufr byl připraven smícháním 1 ml 1 M Tris-báze s 0,2 ml 0,5 M EDTA a doplněn sterilní destilovanou vodou do objemu 100 ml).

3.2.2.2 Přečištění DNA z ovocných listů kitem GenElute

Protože izolaci podle CTAB protokolu nebyla získána amplifikovatelná DNA, bylo přistoupeno k přečištění vzorků pomocí přečišťovacího kitu GenElute-E Organic Solvent DNA Cleanup Kit [68] a bylo postupováno dle návodu níže.

Kolonka GenElute byla zvortexována a po odtržení jejího konce byla vložena do 2ml mikrozkušavky. Víčko kolonky bylo lehce uvolněno a byla provedena centrifugace kolonky při 1000 × g po dobu 1 minuty. Po odstranění 2ml zkumavky s GenElute pufrům byla kolonka převedena do nové 1,5ml mikrozkušavky. Na kolonku pak bylo pomalu převedeno 50–100 µl přečišťované DNA. Po aplikaci vzorku byla kolonka s uvolněným víčkem vložena do centrifugy při 1000 × g po dobu 1 minuty. Přečištěná DNA zachycená v 1,5ml mikrozkušavce byla poté připravena k spektrofotometrickému stanovení koncentrace a čistoty.

3.2.2.3 Izolace DNA z ovocných listů kitem EliGene Plant

Protože po izolaci DNA z listů broskvoně i meruňky CTAB protokolem a následným přečištěním GenElute kitem byly spektrofotometricky naměřeny velmi nízké koncentrace nukleové kyseliny, bylo přistoupeno k izolaci kitem EliGene Plant DNA Isolation Kit [69]. Pro izolaci DNA z listů jabloně, broskvoně a meruňky bylo postupováno podle níže vypsáního návodu.

Do 1,5ml Eppendorfovy zkumavky bylo odváženo 0,2 g homogenizačního písku, 0,05 g vzorku listu a bylo odměřeno 450 µl homogenizačního pufru P1. Plastovým tloučkem pak byla směs třena do úplného rozmělnění vzorku listu. Po homogenizaci bylo přidáno 50 µl lyzačního pufru P2 a po krátkém zvortexování byla směs 10 minut inkubována při 65 °C s občasným promícháním. Poté byla směs 3 minuty centrifugována při 10 000 × g za pokojové teploty. Přibližně 450 µl supernatantu bylo přeneseno do čisté 1,5 ml Eppendorfovy zkumavky. K němu bylo přidáno 175 µl inhibitory odstraňujícího pufru P3 a směs byla 5 s vortexována. Vzorek byl 4–5 minut inkubován při -4 °C. zkumavka byla 3 minuty centrifugována při 10 000 × g za laboratorní teploty.

Nejvýše 500 µl supernatantu bylo převedeno do čisté 2ml Eppendorfovy zkumavky bez narušení pelety. K supernatantu bylo přidáno 500 µl pufru P4. Roztok byl 5 s vortexován a poté krátce stočen pro odstranění roztoku z víčka zkumavky. Ke směsi bylo přidáno 500 µl pufru P5 a roztok byl opět 5 s vortexován a krátce stočen pro odstranění roztoku z víčka zkumavky. Maximálně 750 µl supernatantu bylo převedeno do Eppendorfovy zkumavky s kolonkou a byla provedena centrifugace 1 minutu při 10 000 × g za pokojové teploty. Po centrifugaci byl odstředěný roztok ve 2ml zkumavce odstraněn a na kolonku bylo přidáno zbylých 750 µl supernatantu. Znovu byla provedena centrifugace 1 minutu při 10 000 × g za pokojové teploty. Kolonka s izolovanou DNA byla přemístěna do nové 2 ml Eppendorfovy zkumavky. Na kolonku bylo přidáno 500 µl promývacího pufru P6. Poté byla provedena centrifugace 1 minutu při 10 000 × g. Po centrifugaci byla kolonka vyjmuta a byl odstraněn roztok pod filtrem. Po navrácení kolonky do 2ml zkumavky na ni bylo převedeno 500 µl promývacího pufru P7 a zkumavka byla vložena do centrifugy na 1 minutu při 10 000 × g. Po centrifugaci byl roztok opět vylit. Pro vysušení kolonky byla provedena opětovná

centrifugace po dobu 2 minut při $12\,000 \times g$. Po ukončení procesu byla kolonka opatrně vyjmuta a přesunuta do nové 2ml Eppendorfovy zkumavky. Na kolonku bylo přidáno 100 μ l elučního pufru P8 a byla provedena centrifugace po dobu 1 minuty při $10\,000 \times g$. Poté byla kolonka vyjmuta a izolovaná DNA, jež byla převedena do roztoku ve zkumavce, byla následně připravena k použití.

3.2.2.4 Izolace DNA z ovocných pyré CTAB protokolem s CaCl_2

Do 2ml mikrozkušavky bylo naváženo 0,05 g rostlinného materiálu a 200 mg homogenizačního písku. Dále byl do zkumavky přidán 1 ml CTAB pufru a 1 μ l β -merkaptoethanolu. Vzorek byl třen kopístem a poté inkubován po dobu 30 minut při $65\text{ }^\circ\text{C}$, během inkubace byl vzorek každých 10 min promíchán převrácením zkumavky. Po inkubaci byl vzorek ponechán 10 minut vychladnout a následně bylo přidáno 800 μ l směsi chloroform:isoamylalkohol v poměru 24:1. Vzorek byl znovu převrácením promíchán a poté byl centrifugován 10 minut při $10\,000 \times g$.

Přibližně 800 μ l supernatantu (horní vodné fáze) bylo přeneseno do čisté 2ml mikrozkušavky a k supernatantu bylo přidáno 200 μ l 300 mM CaCl_2 . Následně byl roztok zvortexován a poté byl inkubován 15 minut při laboratorní teplotě. Dále byl roztok centrifugován 3 minuty při $10\,000 \times g$.

Po centrifugaci byl odebrán supernatant a k němu bylo přidáno 480 μ l isopropanolu, znovu byl několikerým převrácením zkumavky vzorek promíchán a byl inkubován 1 minutu při laboratorní teplotě. Dále pak bylo postupováno stejně jako v kapitole 3.2.2.1.

Nakonec byla izolovaná DNA rozpuštěna v 100 μ l TE pufru.

3.2.2.5 Přečištění DNA z pyré s obsahem meruňky 30 % a více kitem GenElute

Protože při PCR analýze s ITS-2 primery nedošlo k účinné amplifikaci DNA izolované z pyré s obsahem meruňky 30, 50, 70, 90 a 100 %, bylo přistoupeno k jejímu přečištění kitem GenElute [68]. Postup přečištění byl identický jako při přečišťování DNA z ovocných listů (kapitola 3.2.2.2).

3.2.3 Stanovení koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky

Koncentrace a čistota izolované DNA byla stanovena pomocí UV-VIS spektrofotometrie, konkrétně pomocí spektrofotometru NanoDrop 2000. Při měření absorbance byl jako blank použit roztok, ve kterém byla při finálním kroku izolovaná DNA rozpuštěna. Blankem u měření DNA izolované CTAB protokolem byl TE pufr, u DNA izolované kitem EliGene pufr P8, u DNA přečišťované kitem GenElute $1 \times$ Tris pufr. Pro měření byly vždy použity 2 μ l vzorku či blanku, které byly nanесeny na čočku přístroje ve třech opakováních. Po proměření absorpčního spektra v UV oblasti od 220 nm do 350 nm, byla programem NanoDrop 2000 při 260 nm vypočítána koncentrace izolované DNA. Z poměrů absorbancí A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230} byla určena čistota izolované DNA.

3.2.4 PCR analýza

3.2.4.1 Příprava reakční směsi pro PCR

Komponenty PCR směsi byly uchovávány v mrazničce. Před každou přípravou směsí bylo nutné jejich úplné rozmrazení. Příprava pak probíhala v jednom ze sterilních boxů. V jiném boxu probíhala manipulace se zředěnou DNA obsahující $10\text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ nukleové kyseliny.

Boxy bylo nutné vždy před i po použití dezinfikovat pomocí UV záření po dobu 15 minut. Celkový objem směsi pro PCR analýzu odpovídal 25 μl .

3.2.4.2 Sekvence použitých primerů

Pro ověřování amplifikovatelnosti izolované DNA byly vždy použity primery specifické pro ITS-2 region jaderné DNA [70]. V tabulce níže jsou nazvané jako S2 F a S3 R, což je jejich oficiální označení, ovšem v práci bude použito souhrnné označení ITS-2 primery.

Primery AGS18 a PdCass byly zvoleny z důvodu schopnosti specificky amplifikovat DNA z broskvoně i meruňky při stejném teplotním profilu. Experimenty prokazující tuto vlastnost byly provedeny v laboratoři na Fakultě chemické VUT.

Tab. 5 Přehled konkrétních primerů použitých při analýze

Primer	Sekvence 5' → 3'	Délka amplikonů [bp]	Zdroj
S2 F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	500	[71]
S3 R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT		
AGS18 F	CAATGGACGAGTAGGGGTGT	373	[72]
AGS18 R	TTGGGTTTGGAGAGGTTTTG		
PdCass F	CCGTGAGGGCAGAGAGGGGG	364	[73]
PdCass R	GCTCCCAAAGGCCTCGTGCT		

3.2.4.3 Ověření amplifikovatelnosti DNA

Ověření amplifikovatelnosti izolované DNA bylo provedeno metodou PCR, kde jako pozitivní kontrola (PK) sloužila DNA s již ověřenou amplifikovatelností. V případě kontroly amplifikovatelnosti DNA z listů broskvoně a meruňky byla využita DNA z listu jabloně či maliníku, při ověřování amplifikovatelnosti DNA z pyré představovala PK DNA z listů broskvoně a meruňky. Při každé analýze byla připravena i negativní kontrola (NK). Všechny vzorky byly připraveny ve dvou opakováních.

Vzorky, u kterých byla spektrometricky změřena koncentrace nukleové kyseliny vyšší než 10 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, byly na tuto koncentraci naředěny. Pokud byl izolační výtěžek nižší, byly do PCR směsi převedeny 2 μl této DNA.

Zastoupení jednotlivých komponent při použití 1 μl a 2 μl DNA je rozepsáno v tabulce níže.

Tab. 6 Komponenty PCR směsi při ověřování amplifikovatelnosti

Komponenta	V [μl]	V [μl]
PCR ultra H ₂ O	9,5	8,5
SYTO-9 Master Mix	12,5	12,5
ITS-2 F	1	1
ITS-2 R	1	1
templátová DNA	1	2
celkem	25	25

Po odměření celkem 24 μl čisté PCR směsi do Eppendorfovy zkumavky byl ke směsi převeden 1 nebo 2 μl analyzované DNA (celkový obsah nukleové kyseliny 10 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). Práce probíhala v samostatném sterilním boxu. Každý vzorek byl připraven ve dvou opakováních. Jako další byly ve dvou opakováních připraveny i zkumavky s negativní a pozitivní kontrolou.

Dobře uzavřené a popsané Eppendorfovy zkumavky s celkem 25 μl kapaliny byly vloženy do zásobníku přístroje Termocycler Rotor-Gene 6000. Po vyvážení zásobníku a uzavření víka přístroje byl v programu Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7 nastaven teplotní profil analýzy rozepsaný v následující tabulce. Po ukončení procesu amplifikace bylo přistoupeno ke standardní analýze křivek tání.

Tab. 7 Teplotní profil při ověřování amplifikovatelnosti DNA

Fáze		T [°C]	t [s]
počáteční denaturace		95	300
denaturace	35–40 cyklů	95	30
hybridizace		52	30
elongace		72	45
závěrečná elongace		72	600

3.2.4.4 Amplifikace DNA z listů broskvoně a meruňky specifickými primery

Amplifikace ovocné DNA se specifickými primery byla provedena metodou PCR ve spojení s vysokorozlišovací analýzou křivek tání. Pro experimenty byly zvoleny specifické primery AGS18 a PdCass.

Po odměření celkem 24 μl čisté PCR směsi s jedním párem specifických primerů do Eppendorfovy zkumavky byl ke směsi převeden 1 μl DNA zředěné na koncentraci 10 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Přesné složení PCR směsi popisuje tabulka níže.

Tab. 8 Komponenty PCR směsi při použití specifických primerů

Komponenta	V [μl]
PCR ultra H ₂ O	9,5
SYTO-9 Master Mix	12,5
Primer F	1
Primer R	1
templátová DNA	1
celkem	25

Práce probíhala v samostatném sterilním boxu. Každý vzorek byl připraven ve třech opakováních. Jako další byly ve třech opakováních připraveny i zkumavky s negativní kontrolou. Postup byl proveden zvlášť pro primery AGS18 a primery PdCass.

Dobře uzavřené a popsané Eppendorfovy zkumavky s celkem 25 μl kapaliny byly vloženy do zásobníku přístroje LightCycler® Nano Instrument. Po uzavření víka přístroje byl v programu LightCycler® Nano SW 1.1 nastaven teplotní profil analýzy rozepsaný v Tab. 9. Po ukončení procesu amplifikace bylo přistoupeno k vysokorozlišovací analýze křivek tání.

Tab. 9 Teplotní profil PCR-HRM analýzy při použití specifických primerů

Fáze		T [°C]	t [s]
počáteční denaturace		95	600
denaturace	45 cyklů	95	20
hybridizace		52	15
elongace		72	25
závěrečná elongace		72	300
temperace vzorků před HRM		50	60
počátek tání		50	60
konec tání		97	1
			ΔT [°C/s]
			0,05

3.2.4.5 Optimalizace amplifikace DNA z listů – použití 0,5 μ l primerů PdCass

Z důvodu výrazně nižší tvorby specifických produktů při použití primerů AGS18 bylo další experimentování s těmito primery ukončeno a pokračovalo se výhradně s primery PdCass. U nich však při teplotním profilu uvedeném v Tab. 9 docházelo k tvorbě nemalého množství nespecifických produktů. Proto bylo přistoupeno k úpravě zastoupení komponent v PCR směsi a nastavení teplotního profilu s cílem snížení množství nespecifických reakcí.

Jedním ze způsobů bylo snížení koncentrace použitých specifických primerů. V rámci přípravy PCR směsi bylo proto navrženo snížení objemu primerů PdCass z původního 1 μ l na 0,5 μ l. Konečné rozvržení komponent pak popisuje tabulka níže.

Tab. 10 Komponenty PCR směsi při použití 0,5 μ l primerů PdCass

Komponenta	V [μ l]
PCR ultra H ₂ O	10,5
SYTO-9 Master Mix	12,5
PdCass F	0,5
PdCass R	0,5
templátová DNA	1
celkem	25

Po odměření celkem 24 μ l čisté PCR směsi do Eppendorfovy zkumavky byl ke směsi převeden 1 μ l DNA zředěné na koncentraci 10 ng \cdot μ l⁻¹. Práce probíhala v samostatném sterilním boxu. Každý vzorek byl připraven ve třech opakováních. Jako další byly ve třech opakováních připraveny i zkumavky s negativní kontrolou.

Dobře uzavřené a popsané Eppendorfovy zkumavky s celkem 25 μ l kapaliny byly vloženy do zásobníku přístroje LightCycler® Nano Instrument. Po uzavření víka přístroje byl v programu LightCycler® Nano SW 1.1 nastaven teplotní profil analýzy rozepsaný v Tab. 9. Po ukončení procesu amplifikace bylo přistoupeno k vysokorozlišovací analýze křivek tání.

3.2.4.6 Optimalizace amplifikace DNA z listů – teplota elongace 65 °C

Pro další snížení množství nespecifických produktů bylo přistoupeno ke snížení teploty při elongačním kroku z původních 72 °C na 65 °C. K tomuto kroku bylo přistoupeno až po vyhodnocení předchozích výsledků.

Příprava vzorků proběhla stejně jako v kapitole 3.2.4.5.

Dobře uzavřené a popsané Eppendorfovy zkumavky s celkem 25 µl kapaliny byly vloženy do zásobníku přístroje LightCycler® Nano Instrument. Po uzavření víka přístroje byl v programu LightCycler® Nano SW 1.1 nastaven teplotní profil analýzy rozepsaný v tabulce níže. Po ukončení procesu amplifikace bylo přistoupeno k vysokorozlišovací analýze křivek tání.

Tab. 11 Teplotní profil PCR-HRM analýzy při teplotě elongace 65 °C

Fáze		T [°C]		t [s]
počáteční denaturace		95		600
denaturace	45 cyklů	95		20
hybridizace		52		15
elongace		65		25
závěrečná elongace		72		300
temperace vzorků před HRM		50	60	ΔT [°C/s]
počátek tání		50	60	0,05
konec tání		97	1	

3.2.4.7 Optimalizace amplifikace DNA z listů – teplota hybridizace 54–62 °C

Pro další snížení výskytu nespecifických produktů bylo experimentováno s teplotou při hybridizačním kroku. Byly provedeny analýzy se složením PCR směsi identickým jako v kapitole 3.2.4.5, avšak v teplotním profilu bylo experimentováno s teplotami hybridizace.

Konkrétně byly zvoleny teploty 54, 56, 58, 60 a 62 °C, přičemž zbylé parametry teplotního profilu zůstaly zachovány. Konkrétní provedené změny zobrazuje tabulka níže. Po ukončení procesu amplifikace bylo přistoupeno k vysokorozlišovací analýze křivek tání.

Tab. 12 Teplotní profil PCR-HRM analýzy při rozpětí teplot hybridizace 54–62 °C

Fáze		T [°C]		t [s]
počáteční denaturace		95		600
denaturace	45 cyklů	95		20
hybridizace		54–62		15
elongace		65		25
závěrečná elongace		72		300
temperace vzorků před HRM		50	60	ΔT [°C/s]
počátek tání		50	60	0,05
konec tání		97	1	

3.2.4.8 Amplifikace DNA z pyré s primery PdCass

U izolované DNA z pyré bylo provedeno měření koncentrace a čistoty dle postupu v kapitole 3.2.3. Ověření amplifikovatelnosti se věnuje kapitola 3.2.4.3.

Po vyhodnocení výsledků dosavadních analýz byla DNA izolovaná z pyré amplifikována metodou real-time PCR s primery PdCass.

Pro vzorky 100B, 10M a 30M1 byla použita DNA izolovaná CTAB protokolem s CaCl₂, do PCR směsi byl převeden vždy 1 µl vzorku o obsahu nukleové kyseliny 10 ng·µl⁻¹. Pro vzorky 30M2, 50M, 70M, 90M a 100M byla použita DNA přečištěná kitem GenElute a po neúspěšné amplifikaci (4.4.2) byla použita i DNA izolovaná pouze CTAB protokolem s CaCl₂. Obsah nukleové kyseliny ve vzorcích přečištěných kitem GenElute dosahoval 4–6 ng·µl⁻¹, proto byly do PCR směsi převedeny vždy 2 µl. Rozložení komponent v PCR směsi bylo identické jako v Tab. 10.

V rámci teplotního profilu byla zvolena teplota hybridizace 62 °C, celkovou podobu profilu pak popisuje tabulka níže. Po ukončení procesu amplifikace bylo přistoupeno k vysokorozlišovací analýze křivek tání.

Tab. 13 Konečný teplotní profil PCR-HRM analýzy DNA z pyré

Fáze	T [°C]		t [s]
počáteční denaturace	95		600
denaturace	95		20
hybridizace	62		15
elongace	65		25
závěrečná elongace	72		300
temperace vzorků před HRM	50	60	ΔT [°C/s]
počátek tání	50	60	
konec tání	97	1	

3.2.5 HRM analýza

Po PCR s primery PdCass bylo vždy přistoupeno k analýze křivek tání. Rozsah teplot byl nastaven na 50–97 °C s postupným nárůstem o 0,05 °C/s při analýzách se specifickými primery. Křivky tání byly převedeny na jejich záporné první derivace podle teploty, výsledky byly dále diskutované v kapitole 4.

U derivovaných křivek tání produktů se specifickými primery bylo v softwaru LightCycler[®] Nano plošně nastaveno rozpětí redukce šumu na 0,6 °C. Surové křivky tání byly normalizovány v teplotním rozpětí 70–70,5 °C až 90–90,5 °C. Normalizované křivky tání byly posléze převedeny na jejich diferenci (anglicky „difference plots“) se vzorkem B jako základnou (base).

3.2.6 Agarózová gelová elektroforéza

Pro vizualizaci a snadnou orientaci ve výsledných produktech po PCR byla jako dodatečná metoda zvolena agarózová gelová elektroforéza.

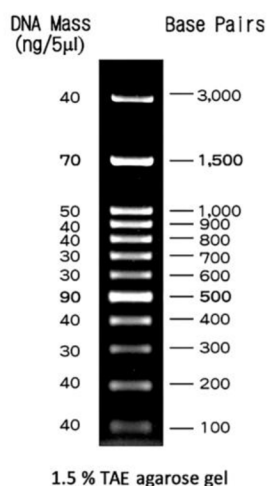
Pro analýzu ampliconů byl připraven 1,2% agarózový gel. Na vahách bylo odváženo 1,2 g agarózy, která byla smísená se 100 ml 0,5 × TBE pufru. Tento pufr byl připraven desetinasobným zředěním 5 × TBE pufru, jež byl připraven odměřením a smísením 54 g Tris-báze, 27,5 g kyseliny borité a 20 ml 0,5M EDTA a rozpuštěním v 1 litru destilované vody.

Směs byla následně opakovaně povařena v mikrovlnné troubě do vzniku čirého roztoku. Po částečném vychladnutí bylo do stále tekutého gelu přidáno 5 µl interkalačního barviva Midori Green a po promíchání kruhovými pohyby byl gel přelit do elektroforetické formy. Gel byl zbaven bublinek, a nakonec byl vložen hřebínek pro vytvoření jamek na vzorky. Jakmile gel úplně ztuhnul, hřebínek byl opatrně vyjmut a gel byl připraven na aplikaci vzorků.

Po PCR analýze byly vzorky stočeny a ke každému vzorku bylo přidáno 5 µl nanášecího pufru Red load. Vzorky řádně promísené s tímto barevným pufrem bylo možné jednotlivě dávkovat do jamek gelu v objemech 10 µl. Délkový standard FastGene 100 bp (Obr. 15) byl dávkován v objemu 5 µl.

Gel se vzorky byl vložen do elektroforetické vany a byl opatrně zalit 0,5 × TBE pufrem. Elektroforetická vana byla uzavřena víkem, elektrody byly připojeny ke zdroji elektrického napětí Enduro 300 V a po nastavení napětí na hodnotu 60 či 80 V, v závislosti na velikosti použité elektroforetické vany, byla spuštěna samotná elektroforéza.

Při vizualizaci ampliconů na gelu i při finálním focení gelu byl využit dokumentační systém Azure Biosystems c200. Ve stejnojmenném softwaru byly amplicony vizualizovány pomocí UV záření o vlnové délce 302 nm.



Obr. 15 Délkový standard používaný při elektroforéze [74]

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Analýza DNA z ovocných listů izolované CTAB protokolem

4.1.1 Spektrometrické stanovení koncentrace a čistoty

Koncentrace DNA izolované z listů broskvoně (B) a meruňky (M) CTAB protokolem (postup popsán v kapitole 3.2.2.1) byla stanovena metodou UV/VIS spektrometrie (podmínky měření v kapitole 3.2.3). U jednotlivých vzorků byla proměřena absorpční spektra v rozsahu vlnových délek 220–350 nm (Obr. 16, všechna spektra jsou pak předmětem Obr. 47 v příloze), přepočtem dle absorbance při 260 nm byla stanovena koncentrace DNA, poměry absorbancí $A_{260/280}$ a $A_{260/230}$ slouží jako ukazatele čistoty DNA. Pokud poměr $A_{260/280}$ klesne pod hodnotu 1,8, značí to kontaminaci proteiny, hodnota poměru $A_{260/230}$ nižší než 2,0 indikuje kontaminaci zbytky činidel použitých při izolaci nebo fenolickými látkami [40].

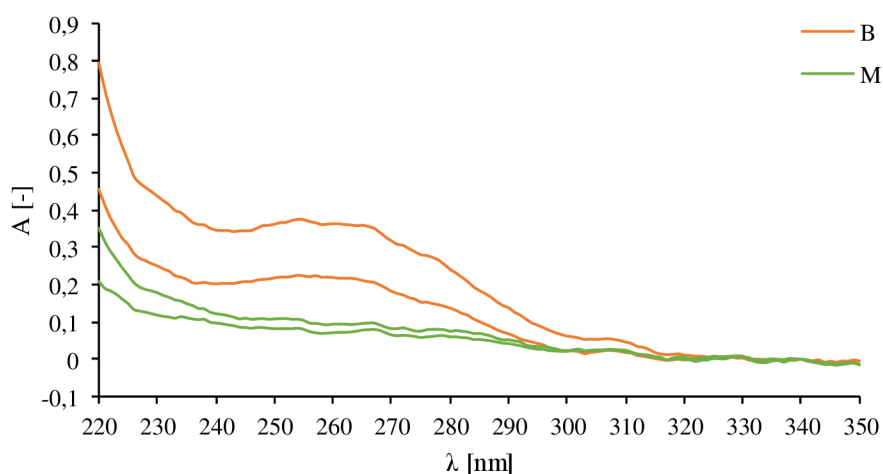
Izolace DNA z ovocných listů byla provedena ve dvou sériích, přičemž u každé série byla třikrát proměřena koncentrace (Tab. 19 v příloze). Hodnoty byly později zprůměrovány a opatřeny směrodatnou odchylkou (Tab. 14).

Izolací DNA z broskvoně byl získán výtěžek nejvýše $(14,9 \pm 2,5) \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, z výsledných poměrů $A_{260/280}$ lze vyčíst mírnou kontaminaci proteiny. Hodnoty $A_{260/230}$ ukazují na vysoké znečištění činidly a fenolickými látkami.

Výtěžky DNA z listu meruňky jsou obecně mnohem nižší, nejvýše $(4,4 \pm 0,2) \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Hodnoty poměrů absorbancí ukazují na zvýšené zanesení vzorků proteiny i fenolickými látkami. Důvodem přítomné kontaminace může být použití starších listů meruňky, které zpravidla obsahují vyšší koncentrace polyfenolů a terpenových látek než mladé listy [75].

Tab. 14 Průměrné hodnoty koncentrace a čistoty DNA izolované z ovocných listů CTAB protokolem (B = broskvoň, M = meruňka)

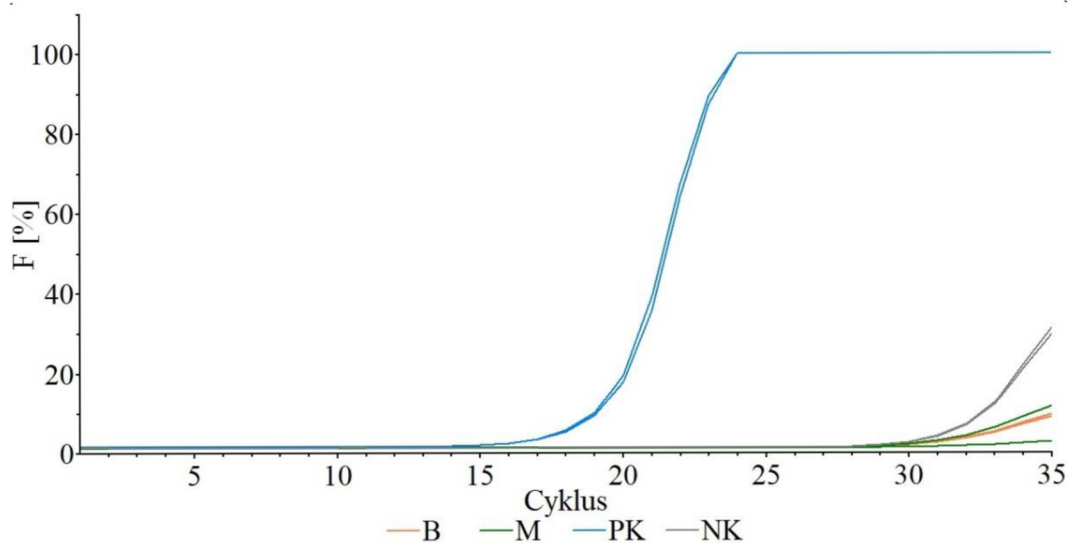
List	Opakování	c [$\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$]	A_{260}	A_{280}	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
B	1	$10,8 \pm 1,4$	$0,22 \pm 0,03$	$0,13 \pm 0,02$	$1,69 \pm 0,07$	$0,89 \pm 0,01$
	2	$14,9 \pm 2,5$	$0,30 \pm 0,05$	$0,18 \pm 0,05$	$1,7 \pm 0,1$	$0,84 \pm 0,01$
M	1	$3,1 \pm 0,3$	$0,06 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$	$1,16 \pm 0,03$	$0,53 \pm 0,06$
	2	$4,4 \pm 0,2$	$0,09 \pm 0,00$	$0,07 \pm 0,00$	$1,23 \pm 0,04$	$0,51 \pm 0,02$



Obr. 16 Absorpční spektra DNA izolované z ovocných listů CTAB protokolem

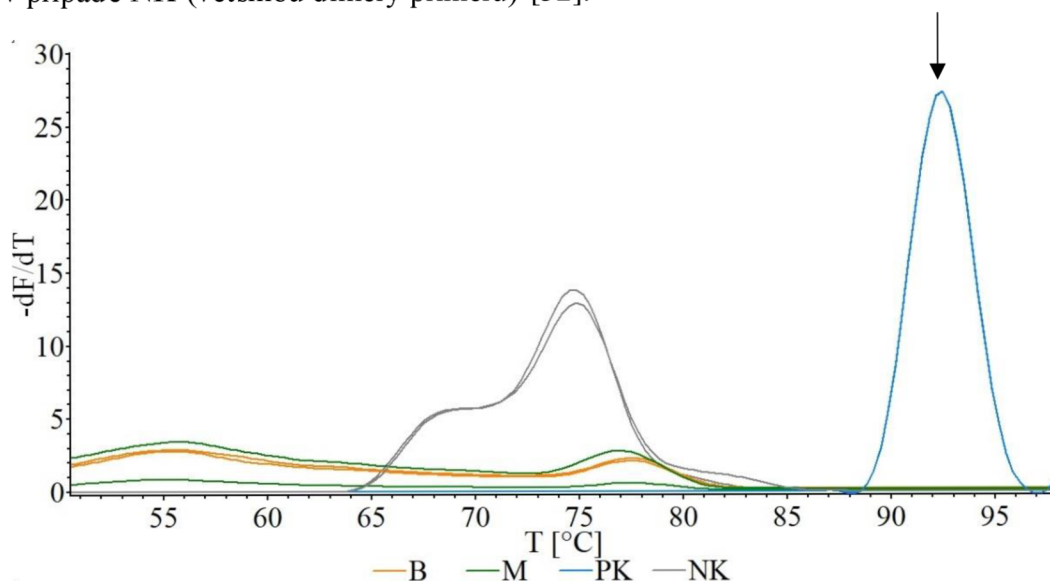
4.1.2 Ověření amplifikovatelnosti

U vzorků B a M byla ověřena jejich amplifikovatelnost pomocí real-time PCR při použití primerů ITS-2 (postup popsán v kapitole 3.2.4.3). Na Obr. 17 lze vidět, že účinná amplifikace nastala pouze u PK (DNA z listu maliníku). Vzorky B a M se nepodařilo účinně amplifikovat. Inhibiči PCR pravděpodobně způsobily přítomné polyfenoly a polysacharidy, které byly ve vzorcích potvrzeny UV/VIS spektrometrií.



Obr. 17 Amplifikační křivky DNA z broskvoně a meruňky izolované CTAB protokolem

Z derivovaných křivek tání (Obr. 18) lze stanovit T_m specifického produktu PK na 92,5 °C. Amplifikací vzorků B a M vznikly pouze nespecifické produkty podobného charakteru jako v případě NK (většinou dimery primerů) [52].



Obr. 18 Derivované křivky tání amplikonů DNA z broskvoně a meruňky izolované CTAB protokolem

4.2 Analýza DNA z ovocných listů izolované kitem EliGene Plant

4.2.1 Spektrometrické stanovení koncentrace a čistoty

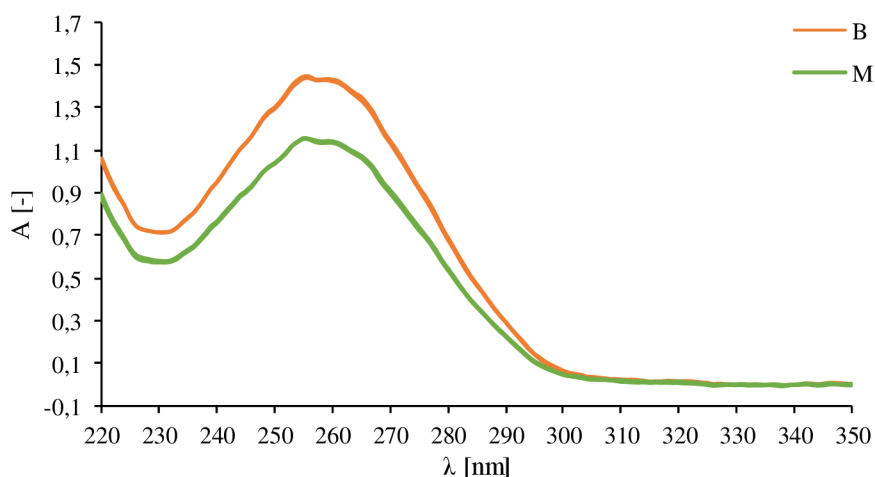
Protože izolací DNA z ovocných listů podle CTAB protokolu i po přečištění kitem GenElute (postup v kapitole 3.2.2.2) byla získaná DNA silně kontaminována fenolickými a dalšími látkami (Tab. 20), což zapříčinilo neúspěšnou amplifikaci vzorků, bylo přistoupeno k izolaci DNA prostřednictvím kolonkového kitu EliGene Plant (postup popsán v kapitole 3.2.2.3).

Koncentrace izolované DNA byla stanovena metodou UV/VIS spektrometrie, přičemž každý vzorek byl proměřen třikrát (kapitola 3.2.3). U každého vzorku bylo proměřeno absorpční spektrum, z absorbance při 260 nm byla stanovena koncentrace DNA, z absorbancí při 230 a 280 nm byla vyvozena čistota vzorků (Tab. 21 v příloze). Hodnoty byly poté zprůměrovány a opatřeny směrodatnou odchylkou (Tab. 15).

Z listu broskvoně bylo izolováno $(71,4 \pm 0,2)$ $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ DNA, koncentrace DNA získaná z listu meruňky činila $(56,9 \pm 0,1)$ $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Poměry absorbancí u obou vzorků indikují pouze mírnou kontaminaci fenolickými látkami či izolačními činidly. Výrobce izolačního kitu uvádí, že je postup optimalizován pro izolaci DNA z listu broskve, což může být důvodem vyššího výtěžku u tohoto vzorku [69].

Tab. 15 Průměrné hodnoty koncentrace a čistoty DNA izolované z ovocných listů kitem EliGene Plant (*B* = broskvoň, *M* = meruňka)

List	c [$\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$]	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	A _{260/230}
B	71,4 ± 0,2	1,43 ± 0,00	0,68 ± 0,01	2,08 ± 0,01	1,99 ± 0,01
M	56,9 ± 0,1	1,14 ± 0,00	0,54 ± 0,00	2,10 ± 0,01	1,97 ± 0,02

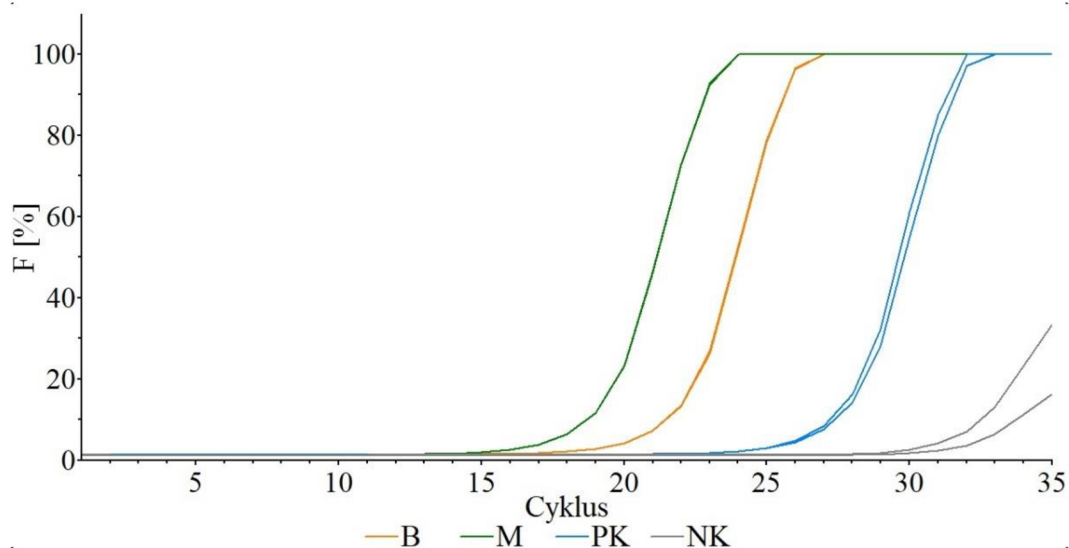


Obr. 19 Absorpční spektra DNA izolované z ovocných listů kitem EliGene Plant

4.2.2 Ověření amplifikovatelnosti

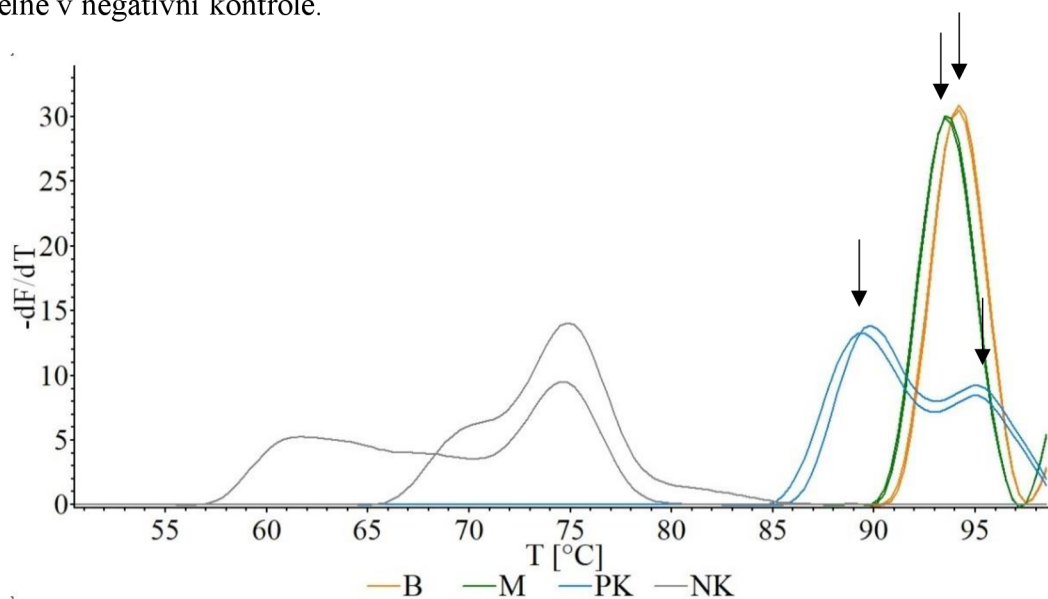
Po stanovení čistoty a koncentrace izolované DNA bylo přistoupeno k ověření její amplifikovatelnosti PCR analýzou s primery ITS-2 (postup v kapitole 3.2.4.3).

Z amplifikačních křivek (Obr. 20) lze vyčíst, že se vzorky B i M podařilo úspěšně amplifikovat. Při zvoleném teplotním profilu byl zaznamenán počátek amplifikace vzorku B po 18. cyklu, u vzorku M již po 15. cyklu.



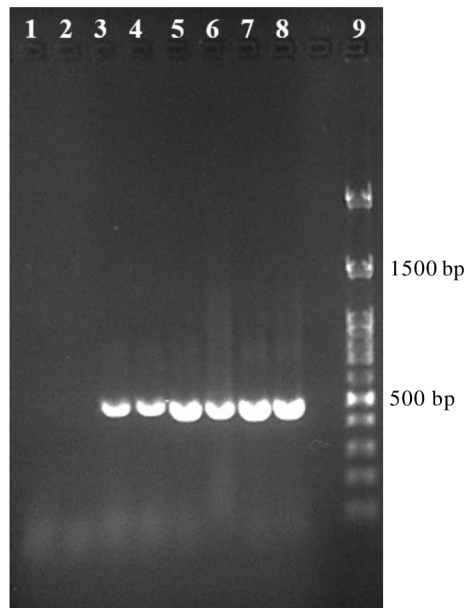
Obr. 20 Amplifikační křivky DNA z broskvoně a meruňky izolované kitem EliGene

Derivované křivky tání (Obr. 21) zobrazují T_m specifických produktů z B a M kolem 94 °C. Jako PK byla použita DNA z listu jabloně, jejíž amplicon obsahuje více center tání, což má za následek komplexní profil křivek tání [52]. U PK, B a M nebyly detekovány dimery primerů viditelné v negativní kontrole.



Obr. 21 Derivované křivky tání ampliconů DNA z broskvoně a meruňky izolované kitem EliGene

Elektroforeogram analýzy potvrzuje přítomnost specifických produktů s délkou ampliconů kolem 500 bp u všech vzorků s výjimkou negativní kontroly, u které lze vidět jen krátké fragmenty dimerů primerů v dolní části Obr. 22.

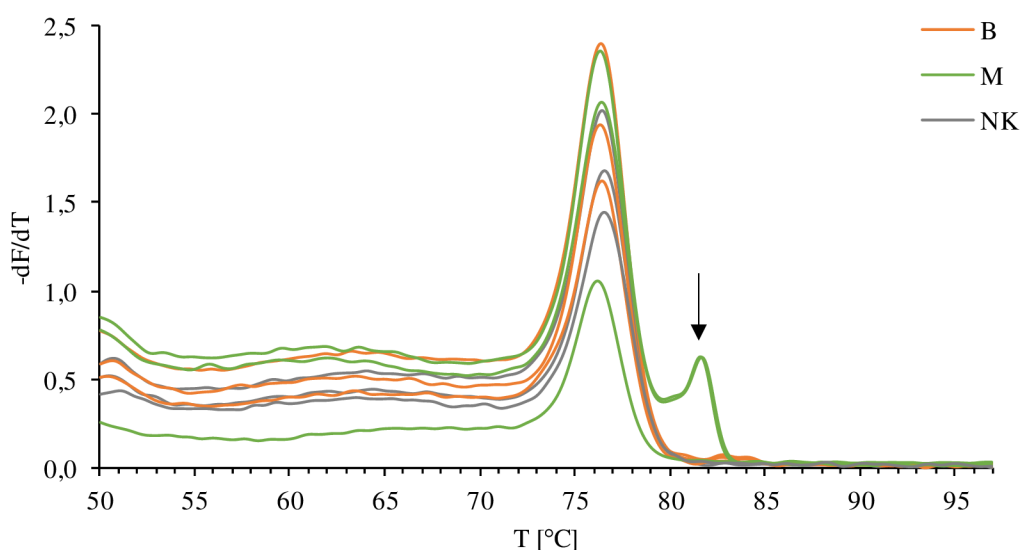


Obr. 22 Elektroforéza produktů po amplifikaci DNA z listů broskvoně a meruňky izolované kitem *EliGene* (1, 2 – NK, 3, 4 – PK, 5, 6 – B, 7, 8 – M, 9 – dělkový standard)

4.2.3 Amplifikace DNA se specifickými primery AGS18

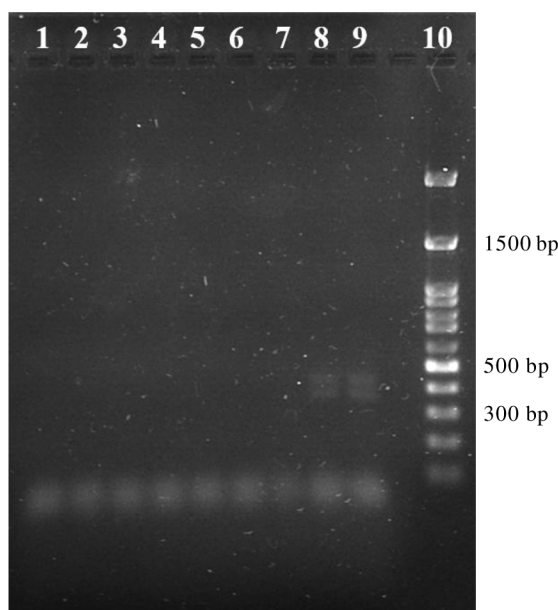
Po ověření amplifikovatelnosti DNA izolované z ovocných listů byly tyto DNA amplifikovány dvěma různými páry specifických primerů (postup uveden v kapitole 3.2.4.4). Oba páry primerů byly zvoleny pro jejich schopnost amplifikovat specifické úseky DNA jak u broskvoně, tak u meruňky. Podmínkou navíc bylo, aby amplikony poskytovaly tvarem výrazně odlišné křivky tání.

Prvním z párů jsou primery AGS18, pomocí nichž byla specificky amplifikována především meruňková DNA [72]. Derivované křivky tání (Obr. 23) tuto schopnost u vzorků M potvrdily, avšak velmi omezeně. Současně vzniklo velké množství nespécifických produktů a u vzorků B k účinné amplifikaci vůbec nedošlo.



Obr. 23 Derivované křivky tání amplikonů DNA z listů broskvoně a meruňky s primery AGS18

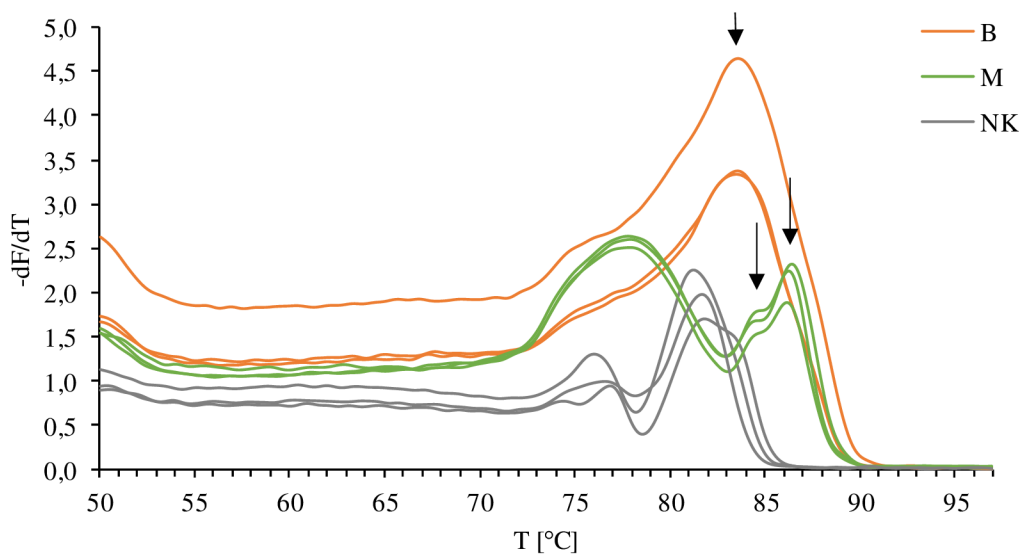
Ověření výsledků analýzy gelovou elektroforézou (Obr. 24) potvrdilo výskyt malého množství specifických produktů s délkou kolem 400 bp u dvou vzorků M (běh 8, 9). Zbylý obsah vzorků se na gelu ukázal jako nespecifické produkty s délkou ampliconů nižší než 100 bp.



Obr. 24 Elektroforéza produktů po amplifikaci DNA z listů broskvoně a meruňky s primery AGS18 (1, 2, 3 – NK, 4, 5, 6 – B, 7, 8, 9 – M, 10 – délkový standard)

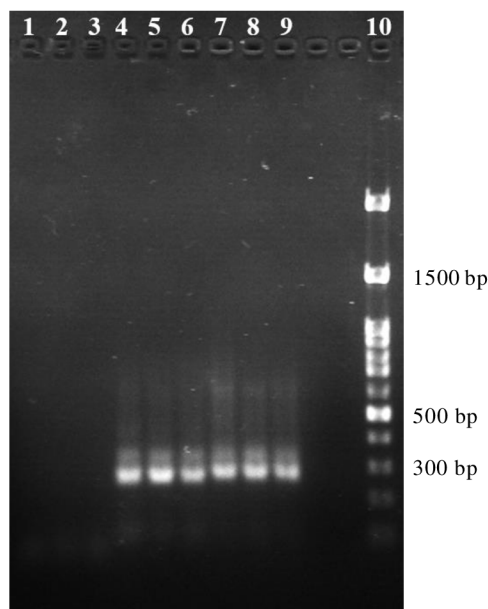
4.2.4 Amplifikace DNA se specifickými primery PdCass

Amplifikace se specifickými primery PdCass probíhala za stejných podmínek jako v případě primerů AGS18 (postup v kapitole 3.2.4.4). Zde již došlo k účinné amplifikaci u vzorků B i M (Obr. 25). Teplota tání specifických produktů u B se pohybuje kolem 84 °C, profil křivky tání u M je složitější a obsahuje hned dva píky při 84 °C a 87 °C. V reakční směsi došlo vedle specifických produktů i ke vzniku velkého množství nespecifických produktů, které svými píky zasahují do píků požadovaných ampliconů (rozmezí teplot 72–87 °C). Tato skutečnost znemožňuje konkrétní vymezení jejich píků a určení jejich T_m .



Obr. 25 Derivované křivky tání ampliconů DNA z listů broskvoně a meruňky s primery PdCass

Výsledek gelové elektroforézy (Obr. 26) zobrazuje bandy specifických produktů s délkou ampliconů kolem 350 bp u všech vzorků. Hned pod nimi se ale nacházejí výraznější bandy nespecifických produktů, což indikuje jejich vyšší zastoupení. Negativní kontrola obsahuje pouze oligo- či dimery primerů kratší než 100 bp. V oblasti bandů specifických produktů NK nebyly detekovány žádné produkty, které by naznačovaly kontaminaci cizorodou DNA.



Obr. 26 Elektroforéza produktů po amplifikaci DNA z listů broskvoně a meruňky s primery PdCass (1, 2, 3 – NK, 4, 5, 6 – B, 7, 8, 9 – M, 10 – délkový standard)

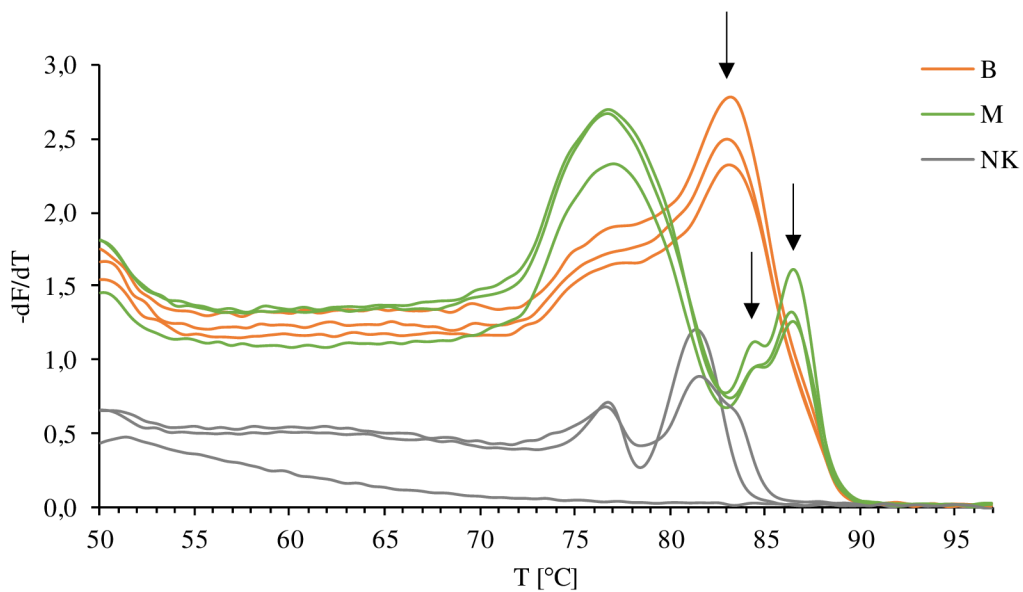
4.2.5 Optimalizace PCR – použití 0,5 μ l primerů PdCass

Protože amplifikací s primery AGS18 nedošlo k účinné amplifikaci obou vzorků, byly z dalších experimentů vyloučeny a pokračovalo se pouze s primery PdCass.

Aby bylo možné primery použít pro amplifikaci DNA izolované z modelových pyré, byla dalším logickým krokem optimalizace PCR za účelem snížení koncentrace nespecifických produktů. Optimalizace na úrovni zastoupení komponent v PCR směsi byla provedena snížením objemu použitých primerů z původního 1 μ l na 0,5 μ l (popsáno v kapitole 3.2.4.5).

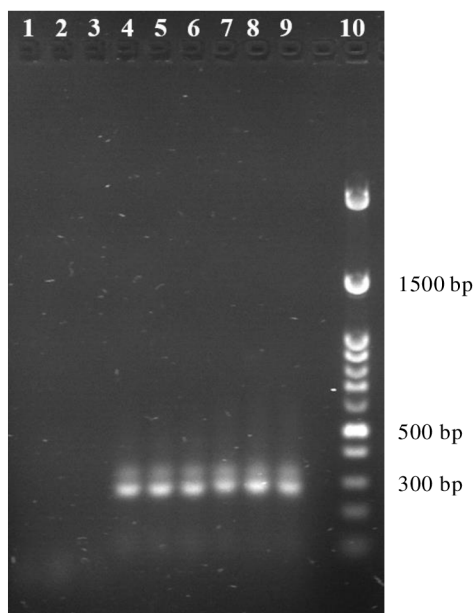
Primery se zpravidla vyskytují v reakční směsi v mnohem vyšších koncentracích než matrice amplifikované DNA, což je příčinou jejich hybridizace a vznikem homo- či hetero-dimerů. Snížení jejich koncentrace významně omezuje tento jev a redukuje vznik nespecifických nízkomolekulárních sekvencí [76].

Při porovnání Obr. 25 a Obr. 27 lze sice pozorovat snížení intenzity fluorescenčního signálu, avšak dochází i k mírnému ustoupení píků nespecifických produktů do nižších teplot tání (rozmezí teplot 71–86 °C).



Obr. 27 Derivované křivky tání ampliconů DNA z broskvoně a meruňky po použití 0,5 μl primerů

Ve výsledcích gelové elektroforézy (Obr. 28) nelze oproti minulé analýze pozorovat výrazné změny.

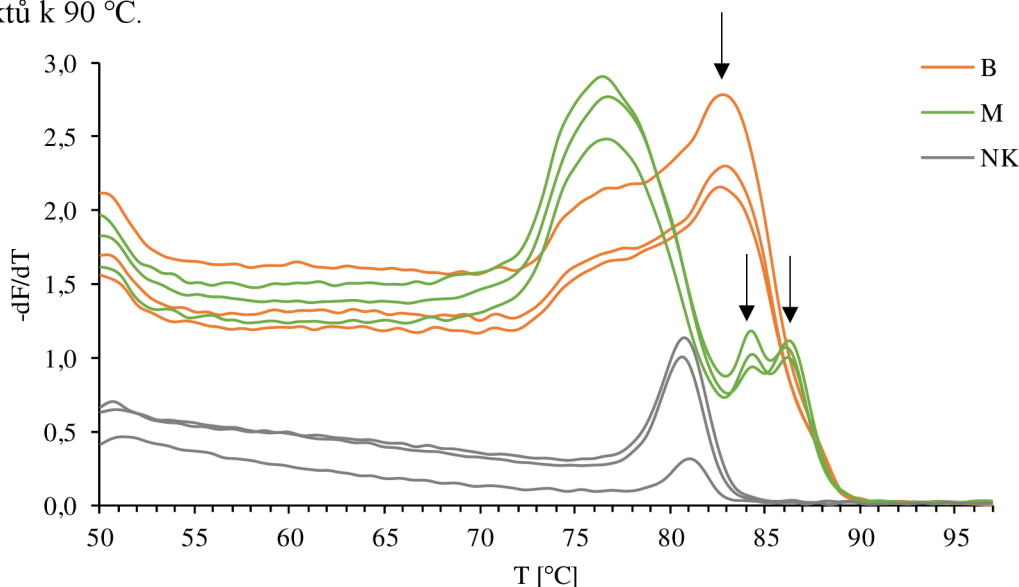


Obr. 28 Elektroforéza produktů po amplifikaci DNA z listů broskvoně a meruňky při použití 0,5 μl primerů PdCass (1, 2, 3 – NK, 4, 5, 6 – B, 7, 8, 9 – M, 10 – délkový standard)

4.2.6 Optimalizace PCR – změna teploty elongace na 65 °C

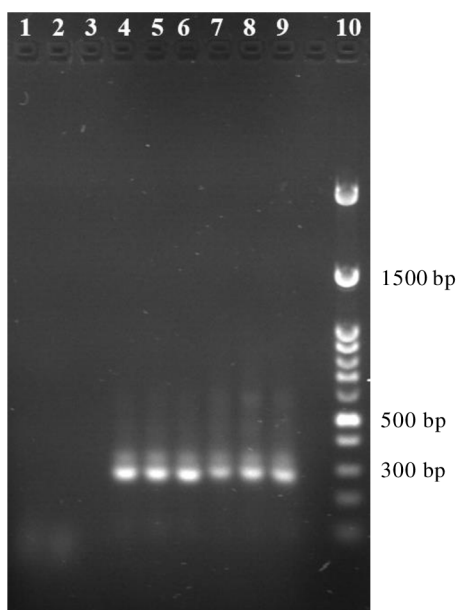
Optimální teplota pro činnost *Taq*-polymerázy je 72 °C, proto je tato hodnota standardně používána v mnoha protokolech jako teplota elongace [77]. V případech, kdy amplifikovaný úsek obsahuje vyšší podíl A a T bází je výhodné použít nižší teploty do 60 °C [78].

Jako následující optimalizační krok bylo přistoupeno ke snížení elongační teploty z původních 72 °C na 65 °C. Změna teplotního profilu napomohla dalšímu snížení výskytu nespecifických produktů (rozmezí teplot 68–85 °C) a posunula konec tání specifických produktů k 90 °C.



Obr. 29 Derivované křivky tání amplikonů DNA z broskvoně a meruňky při teplotě elongace 65 °C

Změna teplotního profilu se projevila pouze na tvaru křivek tání amplikonů. Na elektroforeogramu (Obr. 30) lze u vzorků B a M opět vidět bandy specifických sekvencí o délce 350 bp a ihned pod nimi jasné bandy nespecifických produktů.



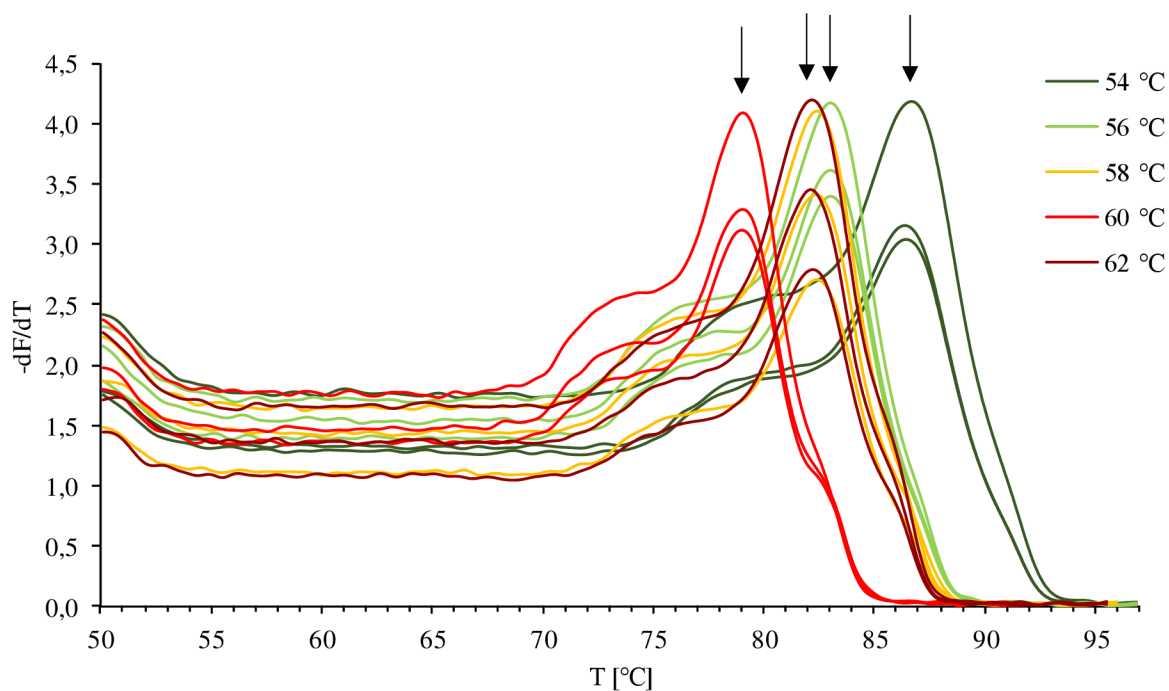
Obr. 30 Elektroforéza produktů po amplifikaci DNA z listů broskvoně a meruňky při teplotě elongace 65 °C (1, 2, 3 – NK, 4, 5, 6 – B, 7, 8, 9 – M, 10 – délkový standard)

4.2.7 Optimalizace PCR – změna teploty hybridizace na 54–62 °C

Teplota hybridizace (T_a) úzce souvisí s teplotou tání primerů (T_m) a volí se právě na základě volby konkrétních primerů. Správná teplota hybridizace je zásadní pro účinné vytvoření jejich komplexu s matricí DNA na zvoleném specifickém místě [77]. Pro výpočet T_m existují různé vzorce, pro svoji jednoduchost je oblíbený vzorec (6) zmíněný v kapitole 2.4.4.1, T_a se poté volí zpravidla o 1–2 °C nižší.

Následující grafy (Obr. 31 a Obr. 32) ukazují tvar derivovaných křivek tání produktů PCR při teplotách hybridizace 54–62 °C jednotlivě pro DNA z broskvoně a DNA z meruňky.

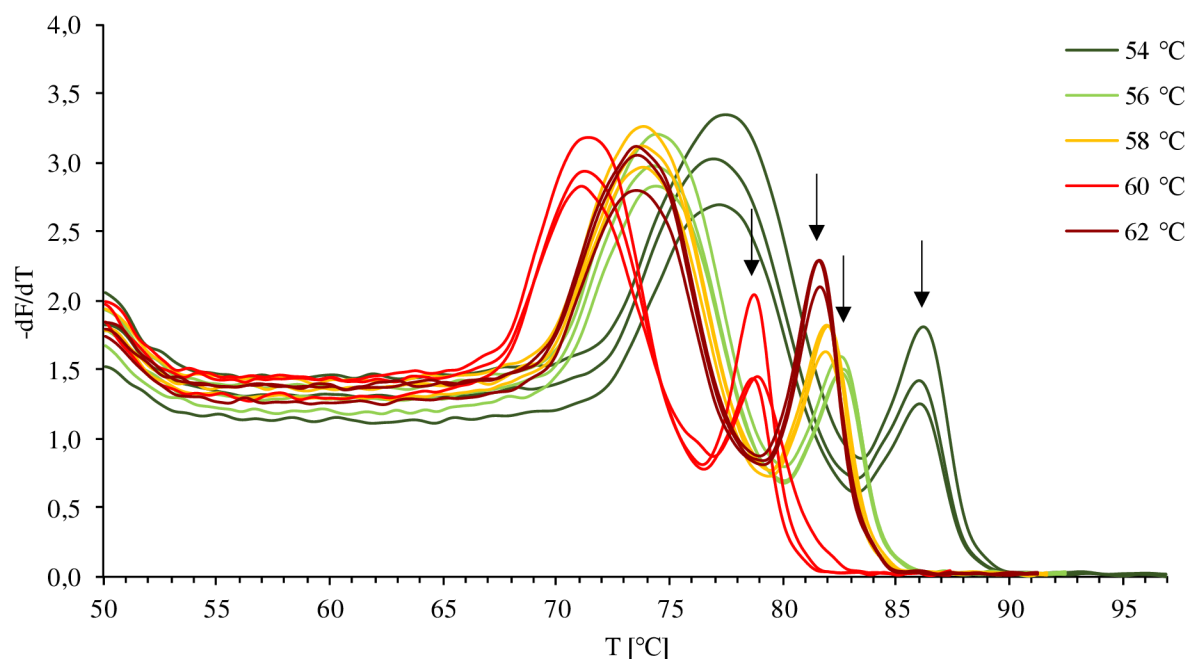
V případě DNA z broskvoně dochází zvyšováním teploty hybridizace ke snižování T_m specifických produktů. Při teplotě hybridizace 54 °C byla teplota tání specifických produktů stanovena na 86 °C, což byla nejvyšší naměřená teplota. Zvýšením teploty hybridizace na 56 °C bylo dosaženo snížení T_m amplikonů na 83 °C. Během PCR s teplotou hybridizace 58 °C i 62 °C tály specifické produkty se stejným trendem při 82 °C. Skokové snížení T_m na 79 °C bylo zaznamenáno při nastavení teploty hybridizačního kroku na 60 °C. Porovnáním derivovaných křivek tání amplikonů při 54 °C a 62 °C si lze povšimnout zúžení teplotních intervalů, kdy docházelo k tání vzniklých produktů. U teploty hybridizace 54 °C činil rozdíl teplot mezi počátkem a koncem tání 20 °C, zatímco u hybridizace při 62 °C pouze 16 °C. Změna teplotního nastavení hybridizačního kroku téměř neměla vliv na intenzitu výstupního signálu fluorescence.



Obr. 31 Derivované křivky tání amplikonů DNA z broskvoně při teplotách hybridizace 54–62 °C

Porovnáním předchozích výsledků analýz s Obr. 32 si lze povšimnout zjednodušení teplotního profilu křivek tání u specifických produktů z DNA meruňky, kde bylo zvýšením hybridizační teploty dosaženo sjednocení T_m v jeden pík. Analogicky k výsledkům HRM analýzy DNA z broskvoně mělo i zde zvyšování hybridizační teploty za následek snižování T_m specifických produktů. Nejvyšší teplota tání (86 °C) byla zaznamenána při nejnižší teplotě hybridizace (54 °C). Při teplotě hybridizace 56 °C odpovídala teplota tání 83 °C. Velmi podobné si byly T_m

při teplotách hybridizace 58 °C a 62 °C, kolem 82 °C. U 62 °C však bylo dosaženo výrazně vyšších píků, které odpovídají vyšší koncentraci specifických produktů. Nejnižší hodnota teploty tání (79 °C) byla naměřena při teplotě hybridizačního kroku 60 °C. Stejně jako u Obr. 31 měla zvyšující se teplota hybridizace vliv na velikost teplotního intervalu tání produktů PCR. Při teplotě hybridizace 54 °C tvořil rozdíl mezi počátkem a koncem tání 20 °C, zatímco při 62 °C byl tento rozdíl pouze 16 °C.



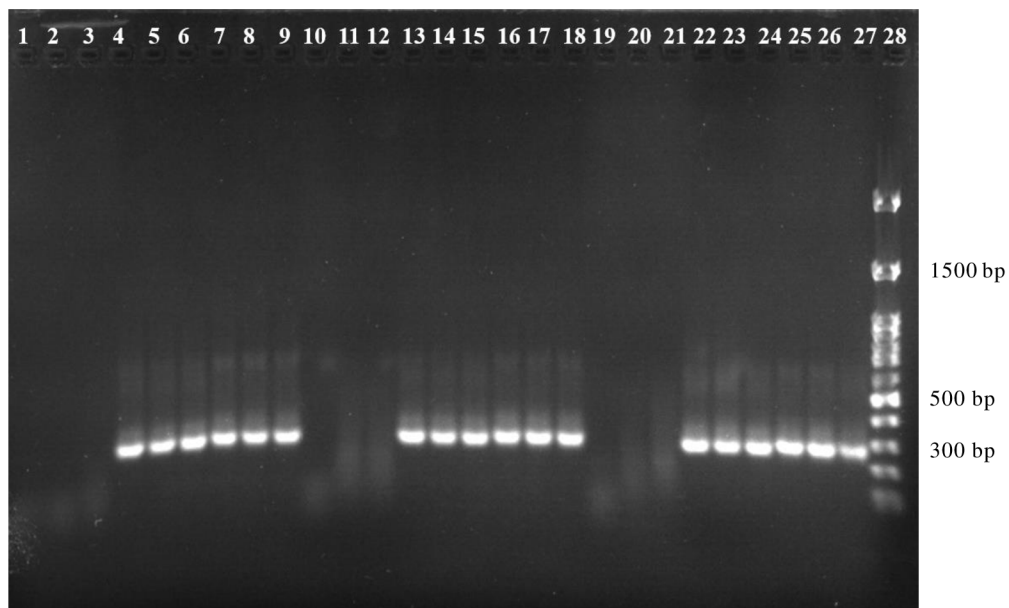
Obr. 32 Derivované křivky tání amplikonů DNA z meručky při teplotách hybridizace 54–62 °C

Elektroforeogramy produktů analýz (Obr. 33 a Obr. 34) ve všech vzorcích ukazují čisté negativní kontroly, což lze říci dle světlých oblastí ve spodní části gelu, jež indikují oligomery primerů, které dle délkového standardu dosahují maximální délky 200 bp. V případě kontaminace cizorodou DNA by v průběhu PCR došlo k mnohačetné amplifikaci určitého úseku, což by se na gelu projevilo zřetelným bandem v horních částech gelu.

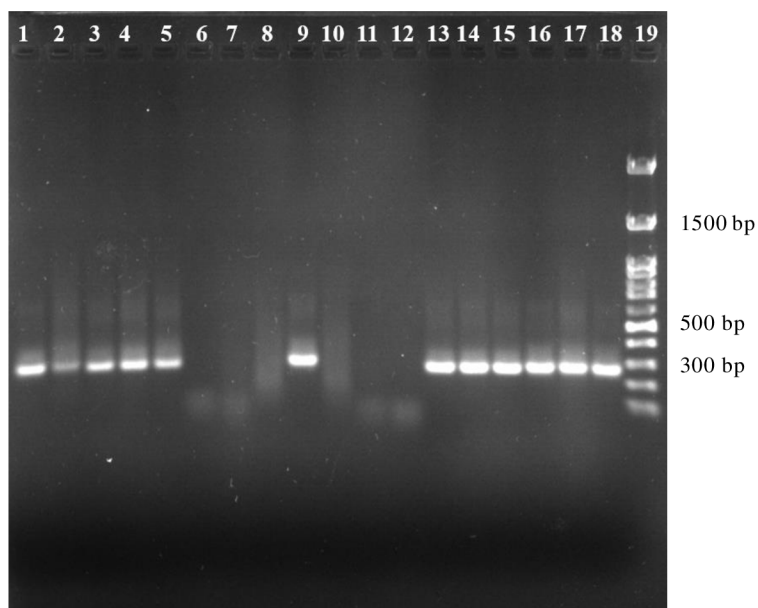
Ve vzorcích B a M si lze povšimnout postupného snížení koncentrace nespecifických produktů s délkou sekvencí 500 bp a více. Zatímco při teplotě hybridizace 54 °C jsou oblasti těchto produktů výrazné, což vypovídá o jejich vyšší koncentraci, při 62 °C téměř došlo k jejich vymizení.

U předchozích elektroforeogramů obsahovaly běhy ovocných vzorků dva zřetelné bandy v oblastech 250–350 bp. Dle Žiarovské a kol. měla PCR analýza s primery PdCass poskytovat amplikony dlouhé 364 bp [73]. S touto informací bylo proto pracováno při popisu výsledků předchozích gelů. Snaha o optimalizaci procesu PCR s cílem snížení množství nespecifických produktů však odhalila, že amplifikovaný úsek dosahuje délky mírně pod 300 bp. Nejlépe lze tuto skutečnost vyčíst ze vzhledu bandů běhů 13–18 na Obr. 34, kde jsou i přes vysokou specifitu reakce nejvýraznější bandy při přibližně 250 bp.

Na základě tvorby nejmenšího množství nespecifických produktů byla pro PCR analýzu ovocných pyré se specifickými primery PdCass zvolena teplota hybridizace 62 °C.



Obr. 33 Elektroforéza produktů po amplifikaci DNA z listů broskvoně a meruňky při teplotách hybridizace 54–58 °C (54 °C: 1, 2, 3 – NK, 4, 5, 6 – B, 7, 8, 9 – M; 56 °C: 10, 11, 12 – NK, 13, 14, 15 – B, 16, 17, 18 – M; 58 °C: 19, 20, 21 – NK, 22, 23, 24 – B, 25, 26, 27 – M; 28 – délkový standard)



Obr. 34 Elektroforéza produktů po amplifikaci DNA z listů broskvoně a meruňky při teplotách hybridizace 60–62 °C (60 °C: 1, 2, 9 – M, 3, 4, 5 – B, 6, 7, 8 – NK; 62 °C: 10, 11, 12 – NK, 13, 14, 15 – B, 16, 17, 18 – M; 19 – délkový standard)

4.3 Analýza DNA z pyré izolované CTAB protokolem s CaCl₂

4.3.1 Spektrometrické stanovení koncentrace a čistoty

Z lyofilizovaných pyré byla izolována DNA dle CTAB protokolu, kde byl zařazen krok s přidavkem CaCl₂ pro vysrážení polysacharidů, na které jsou plody ovoce bohaté (postup v kapitole 3.2.2.4). Bylo potvrzeno, že polysacharidy významně inhibují PCR. Přidavek CaCl₂ přispívá k jejich vysrážení, izolovaná DNA přitom setrvává v roztoku [62].

Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA bylo provedeno metodou UV/VIS spektrometrie (více v kapitole 3.2.3). Izolace DNA byla provedena ve dvou sériích, přičemž u každé série byla třikrát proměřena koncentrace (Tab. 22 v příloze). Hodnoty byly později zprůměrovány a opatřeny směrodatnou odchylkou (Tab. 16).

Proměřením absorpčního spektra (Obr. 35, veškerá spektra jsou pak předmětem Obr. 48 uvedeného v příloze) v rozmezí vlnových délek 220–350 nm byly při 260 nm vypočteny koncentrace nukleové kyseliny, hodnoty při 230 nm a 280 nm sloužily pro výpočet čistoty DNA.

U výtěžků DNA z pyré lze vidět klesající trend směrem ke 100% meruňce. Z pyré obsahujícího pouze broskev (100B) bylo dosaženo výtěžku až $(125,1 \pm 8,5) \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, u vzorku obsahujícího 50 % meruňkové složky (50M) to bylo $(23,3 \pm 1,0) \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, výtěžek u 100% meruňky (100M) už dosahoval pouze $(17,6 \pm 1,4) \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

Poměr $A_{260/280}$, indikující kontaminaci proteiny, byl napříč vzorky stanoven v podobné výši kolem hodnoty 1,7, což značí mírné znečištění proteiny. Ze všech vzorků byl stanoven nejvyšší stupeň kontaminace u vzorků 100M. Parametr $A_{260/230}$, indikující kontaminaci fenolickými látkami či jinými organickými činidly, sleduje podobný klesající trend směrem ke vzorkům 100M jako u koncentrace DNA. Stále vyšší odchylka od hodnoty 2,0 značí postupné zanesení vzorků pravděpodobně fenolickými látkami. Vzhledem k identickému izolačnímu postupu je nutné přihlídnout k charakteru použitého ovoce. Plody meruňky se obecně vyznačují vyšším obsahem rozličných fenolických látek než plody broskve. Pro efektivnější odstranění fenolů by bylo nutné optimalizovat izolační protokol konkrétně pro vzorky obsahující vyšší podíl meruňky.

Tab. 16 Průměrné hodnoty koncentrace a čistoty DNA izolované z pyré CTAB protokolem s CaCl₂ (100B – 100% broskev, 10M – 10% meruňka, 30M – 30% meruňka, 50M – 50% meruňka, 70M – 70% meruňka, 90M – 90% meruňka, 100M – 100% meruňka)

Pyré	Opakování	c [ng·μl ⁻¹]	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	A _{260/230}
100B	1	125,1 ± 8,5	2,5 ± 0,2	1,5 ± 0,1	1,64 ± 0,00	1,71 ± 0,00
	2	73,9 ± 0,9	1,48 ± 0,02	0,88 ± 0,01	1,68 ± 0,01	1,95 ± 0,01
10M	1	109,1 ± 1,6	2,18 ± 0,03	1,22 ± 0,02	1,79 ± 0,01	1,70 ± 0,01
	2	56,2 ± 3,3	1,12 ± 0,07	0,60 ± 0,04	1,88 ± 0,02	2,1 ± 0,1
30M	1	80,7 ± 5,4	1,6 ± 0,1	0,91 ± 0,06	1,78 ± 0,00	1,48 ± 0,03
	2	84,0 ± 0,7	1,68 ± 0,01	0,92 ± 0,01	1,82 ± 0,00	1,38 ± 0,02
50M	1	23,3 ± 1,0	0,47 ± 0,02	0,25 ± 0,01	1,84 ± 0,02	1,07 ± 0,01
	2	19,5 ± 1,1	0,39 ± 0,02	0,22 ± 0,01	1,75 ± 0,05	1,37 ± 0,02
70M	1	21,8 ± 1,6	0,44 ± 0,03	0,26 ± 0,01	1,68 ± 0,08	0,70 ± 0,03
	2	12,9 ± 0,7	0,26 ± 0,01	0,15 ± 0,01	1,71 ± 0,03	0,74 ± 0,00

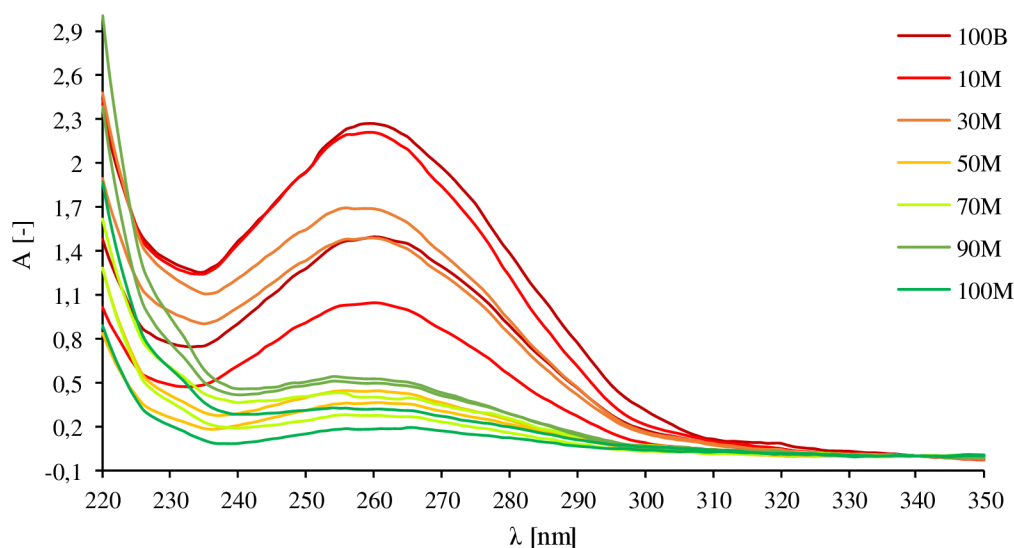
Tab. 16 – pokračování: Průměrné hodnoty koncentrace a čistoty DNA izolované z pyrů CTAB protokolem s CaCl_2 (100B – 100% broskev, 10M – 10% meruňka, 30M – 30% meruňka, 50M – 50% meruňka, 70M – 70% meruňka, 90M – 90% meruňka, 100M – 100% meruňka)

Pyré	Opakování	c [ng· μl^{-1}]	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	A _{260/230}
90M	1	25,2 ± 0,9	0,50 ± 0,02	0,28 ± 0,01	1,82 ± 0,01	0,57 ± 0,01
	2	24,6 ± 0,2	0,49 ± 0,00	0,29 ± 0,01	1,71 ± 0,06	0,66 ± 0,01
100M	1	9,5 ± 0,6	0,19 ± 0,01	0,12 ± 0,00	1,53 ± 0,06	0,98 ± 0,07
	2	17,6 ± 1,4	0,35 ± 0,03	0,22 ± 0,02	1,60 ± 0,01	0,53 ± 0,02

Absorpční spektra (Obr. 35) ukazují výrazné rozdíly v hodnotách při A₂₆₀ mezi vzorky obsahující vyšší podíly broskve (červené křivky) a vyšší podíly meruňky (zelené křivky).

Maximálních hodnot absorbance by vzorky DNA měly dosáhnout při vystavení 260 nm, což odpovídá vlnové délce, při které nejvíce absorbují dusíkaté báze nukleových kyselin. Při 230 nm by naopak měl být zaznamenán výrazný propad v absorbanci a hodnoty při 280 nm by u absorpčních křivek měli odpovídat jejich inflexnímu bodu [79].

Optimálnímu tvaru absorpční křivky nejvíce odpovídají vzorky s vyšším obsahem broskve s maximem absorbance 2,3. Zbylá pyrů s obsahem meruňky 50 % a více již dosahují maximální absorbance pouze 0,5. Toto výrazné snížení při 260 nm potvrzuje nižší koncentrace izolované DNA. Při 230 nm k tak výraznému poklesu nedošlo, což značí přítomnost kontaminace (fenolické látky, činidla použitá pro izolaci).



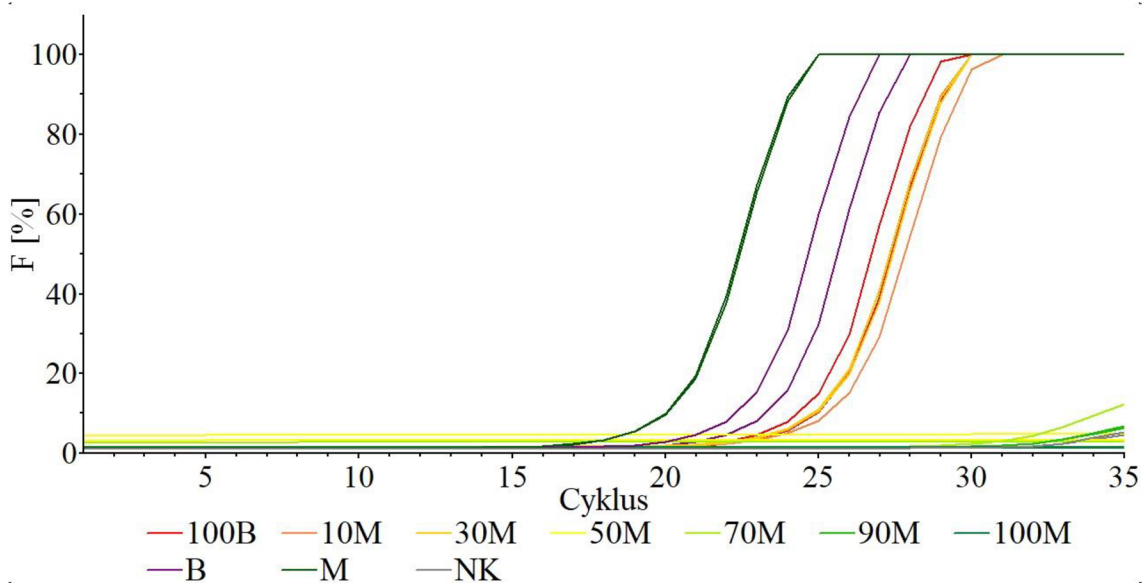
Obr. 35 Absorpční spektra DNA izolované z pyrů CTAB protokolem s CaCl_2

4.3.2 Ověření amplifikovatelnosti

Před PCR analýzou se specifickými primery PdCass bylo nutné otestovat amplifikovatelnost izolovaných DNA PCR reakcí s primery ITS-2 (kapitola 3.2.4.3).

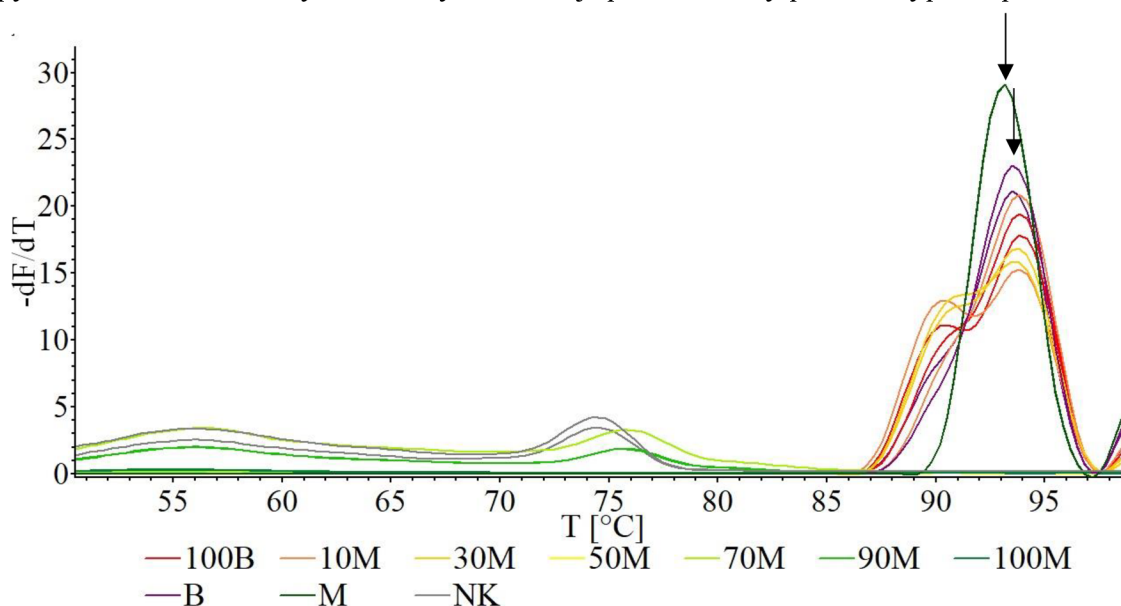
Úspěšně byla amplifikována DNA pouze u vzorků 100B, 10M a 30M a u pozitivních kontrol (B a M), jak lze vidět z amplifikačních křivek (Obr. 36). Amplifikaci ostatních vzorků pravděpodobně inhibovala přítomnost vyšší koncentrace fenolických látek.

Počátek amplifikace vzorků M byl zaznamenán u 16. cyklu, u vzorků B amplifikace nastala kolem 20. cyklu, vzorky pyrů započaly amplifikaci kolem 22. cyklu.



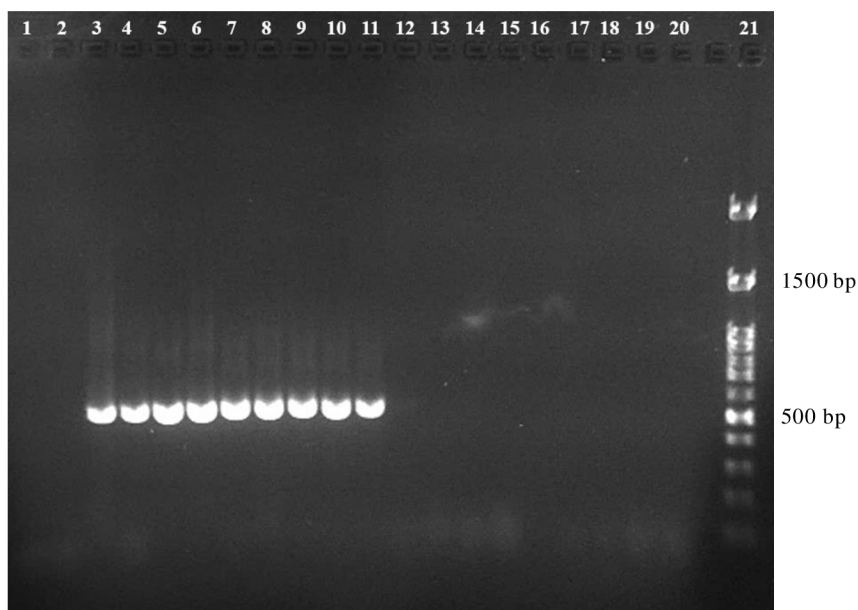
Obr. 36 Amplifikační křivky DNA izolované z pyré CTAB protokolem s CaCl_2

Derivované křivky tání (Obr. 37) potvrzují vznik specifických produktů pouze u vzorků 100B, 10M a 30M s píkem při 94°C . Díky vysokému obsahu broskvové složky se křivky tání příslušející vzorkům 100B, 10M a 30M podobají spíše křivkám pozitivních kontrol s DNA broskvoně a specifické produkty mají velmi podobnou T_m kolem $93\text{--}94^\circ\text{C}$. DNA izolovaná z pyré s obsahem meruňky 50 % a výše obsahují pouze dimery primerů typické pro NK.



Obr. 37 Derivované křivky tání amplikonů z pyré po izolaci CTAB protokolem s CaCl_2

Výsledky PCR analýzy byly pro kontrolu podrobeny gelové elektroforéze (Obr. 38). Viditelné bandy specifických produktů je možné pozorovat u obou pozitivních kontrol a u vzorků 100B, 10M a jednoho běhu 30M. Zbylé běhy analyzovaných vzorků a negativní kontroly obsahují pouze krátké fragmenty nespecifických produktů.



Obr. 38 Elektroforéza produktů po amplifikaci DNA izolované z pyré CTAB protokolem s CaCl_2 (1, 2 – NK, 3, 4 – B, 5, 6 – M, 7, 8 – 100B, 9, 10 – 10M, 11, 12 – 30M, 13, 14 – 50M, 15, 16 – 70M, 17, 18 – 90M, 19, 20 – 100M, 21 – dělkový standard)

4.4 Analýza DNA z pyré po přečištění kitem GenElute

4.4.1 Spektrometrické stanovení koncentrace a čistoty

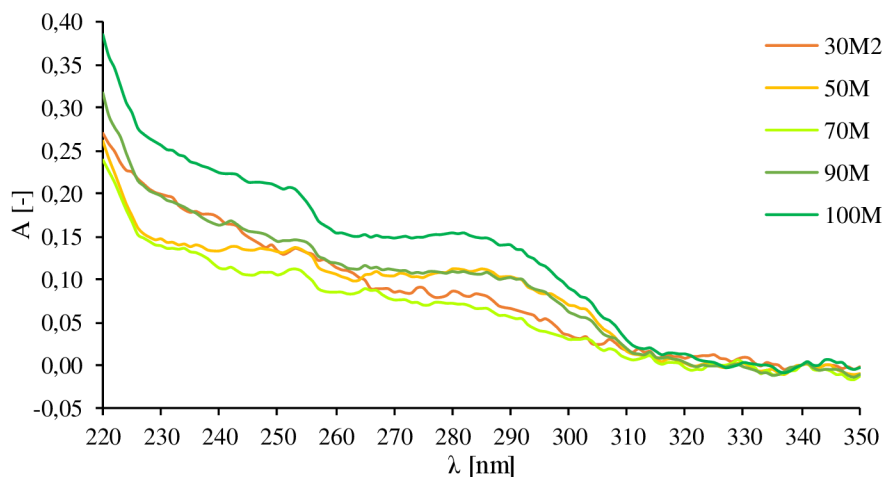
Po neúspěšném ověření amplifikace u vzorků s 50% podílem meruňky a více, a neúspěšném prokázání specifických produktů gelovou elektroforézou v 2. běhu vzorku 30M bylo přistoupeno k přečištění těchto vzorků kitem GenElute s cílem získat amplifikovatelnou DNA (postup uveden v kapitole 3.2.2.5).

Jako v předešlých případech byla koncentrace a čistota přečištěné DNA stanovena metodou UV/VIS spektrometrie (kapitola 3.2.3). Byla proměřena absorpční spektra (Obr. 39, spektra všech vzorků jsou předmětem Obr. 49 v příloze) a z absorbance při vlnových délkách 230, 260 a 280 nm byla vypočtena koncentrace a čistota přečištěné DNA. Měření bylo u každého vzorku opakováno třikrát (Tab. 23 v příloze), hodnoty byly později zprůměrovány a opatřeny směrodatnou odchylkou (Tab. 17).

Porovnáním hodnot mezi Tab. 16 a Tab. 17 lze vidět skokový úbytek v koncentracích DNA, kde se po přečištění její obsah pohybuje kolem $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Kvůli obecně nízkým hodnotám absorbance blízkým nule se změnilы výsledné poměry absorbancí a ukazují ještě silnější kontaminaci organickými činidly. Také mohlo dojít k zanesení vzorků částicemi materiálu z kolonky.

Tab. 17 Průměrné hodnoty koncentrace a čistoty DNA z pyré po přečištění kitem GenElute (30M – 30% meruňka, 50M – 50% meruňka, 70M – 70% meruňka, 90M – 90% meruňka, 100M – 100% meruňka)

Pyré	c [$\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$]	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	A _{260/230}
30M2	5,2 ± 0,6	0,11 ± 0,01	0,08 ± 0,01	1,35 ± 0,02	0,57 ± 0,01
50M	5,27 ± 0,05	0,11 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,98 ± 0,03	0,70 ± 0,02
70M	4,5 ± 0,02	0,09 ± 0,00	0,08 ± 0,01	1,15 ± 0,03	0,62 ± 0,02
90M	5,80 ± 0,08	0,12 ± 0,00	0,11 ± 0,00	1,02 ± 0,07	0,56 ± 0,03
100M	6,7 ± 0,7	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,93 ± 0,05	0,63 ± 0,03

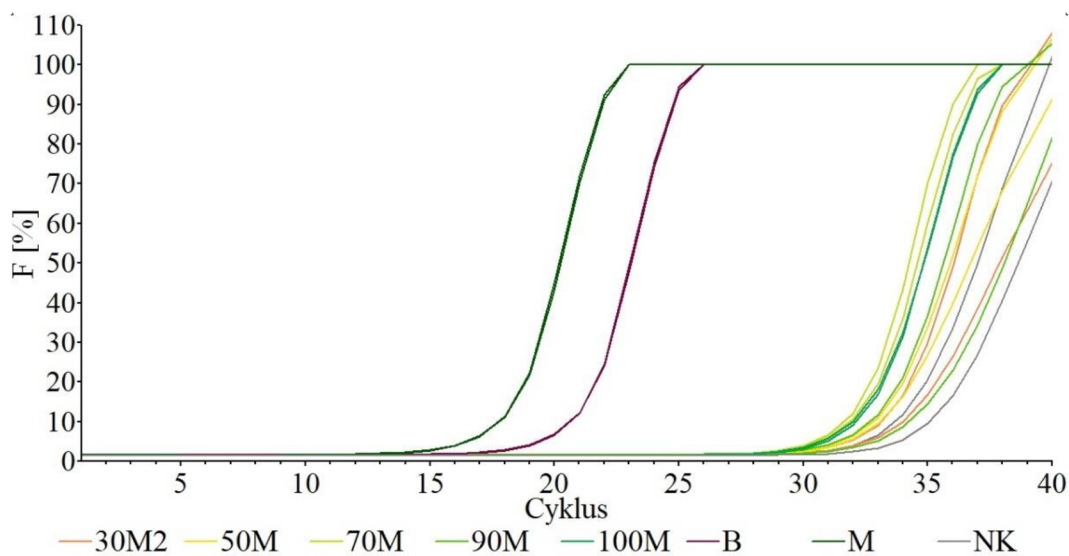


Obr. 39 Absorpční spektra DNA izolované z pyré po přečištění kitem GenElute

4.4.2 Ověření amplifikovatelnosti

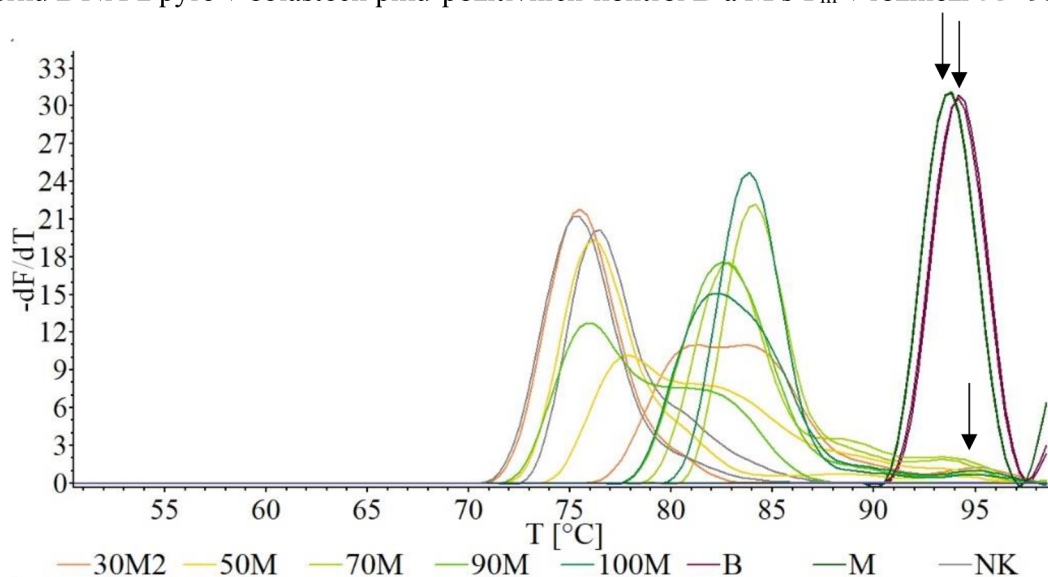
Při ověřování amplifikovatelnosti bylo z důvodu nízké koncentrace DNA nutné použití 2 μl místo 1 μl DNA, délka amplifikace byla manuálně prodloužena na 40 cyklů (podrobněji v kapitole 3.2.4.3).

Po přečištění byly vzorky 30M2, 50M, 70M, 90M i 100M úspěšně amplifikovány, ale ve srovnání se vzorky 100B, 10M a 30M1 začala amplifikace později (ve 29. cyklu), i když byla použita stejná množství DNA. To mohlo být způsobeno přítomností zbytků organických činidel či solí použitých při izolaci DNA, který přečišťovací kit nebyl schopný odstranit. Možné je i zanesení vzorků přečišťovacím pufrem použitým při postupu s kitem GenElute.



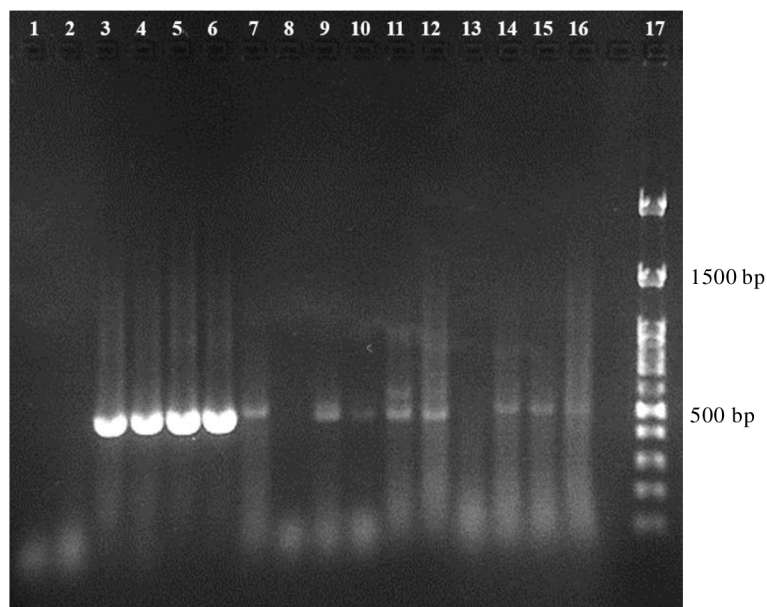
Obr. 40 Amplifikační křivky DNA izolované z pyré po přečištění kitem GenElute

Derivované křivky tání (Obr. 41) odhalují vznik malého množství specifických produktů u vzorků DNA z pyrě v oblastech píků pozitivních kontrol B a M s T_m v rozmezí 93–95 °C.



Obr. 41 Derivované křivky tání ampliconů z pyrě po přečištění kitem GenElute

Specifické produkty ve vzorcích 30M2, 50M, 70M, 90M i 100M byly potvrzeny gelovou elektroforézou (Obr. 42), kde jsou bandy jasně viditelné při délkách ampliconu 500 bp. Negativní kontroly neodhalily kontaminaci použitých PCR komponent cizí DNA. Byly detekovány pouze dimery primerů s délkou sekvencí nižší než 100 bp.



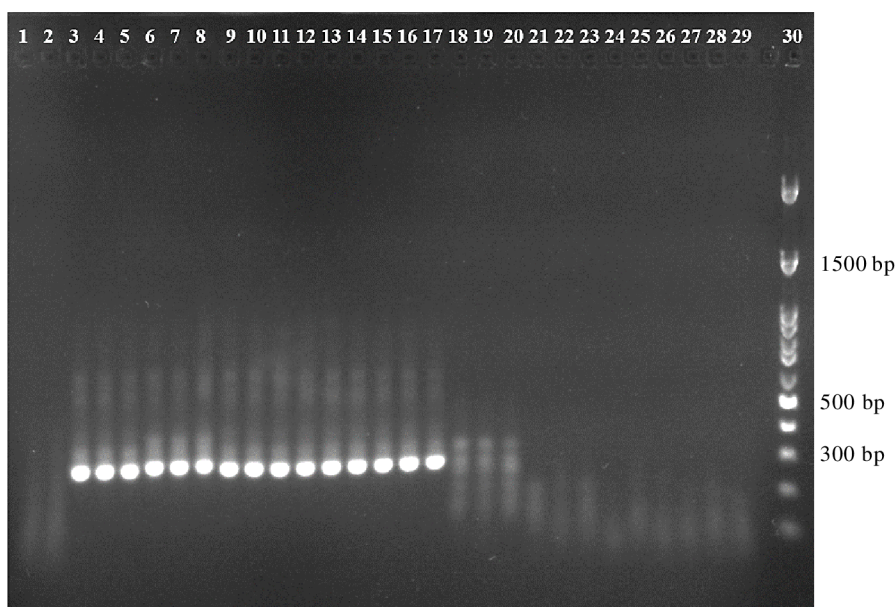
Obr. 42 Elektroforéza produktů po amplifikaci DNA z pyrě po přečištění kitem GenElute (1, 2 – NK, 3, 4 – B, 5, 6 – M, 7, 8 – 30M2, 9, 10 – 50M, 11, 12 – 70M, 13, 14 – 90M, 15, 16 – 100M, 17 – délkový standard)

4.5 PCR analýza DNA z pyrě se specifickými primery PdCass

Po získání DNA schopné amplifikace ze všech vzorků pyrě bylo přistoupeno k PCR se specifickými primery PdCass (postup uveden v kapitole 3.2.4.8).

Nejprve byla provedena PCR se vzorky s ověřenou amplifikovatelností. DNA ze vzorků 100B, 10M a 30M byla získána izolací CTAB protokolem s CaCl₂ (kapitola 3.2.2.4), vzorky 30M2, 50M, 70M, 90M a 100M podstoupily přečištění (kapitola 3.2.2.5). Specifické produkty byly detekovány pouze u vzorků 100B, 10M a 30M1. Ve vzorcích 30M2, 50M, 70M, 90M a 100M nebyly specifické produkty detekovány (derivované křivky tání a normalizované křivky tání jsou předmětem Obr. 50 a Obr. 51 v příloze).

PCR byla proto zopakována se vzorky izolovanými pouze CTAB protokolem s CaCl₂. Obr. 43 zobrazuje vzorky 100B až 30M s jasnými bandy specifických produktů kolem 250 bp, ve vzorcích 50M jsou bandy méně intenzivní, ovšem stále zřetelně viditelné. U ostatních běhů nebyly specifické produkty detekovány. Lze vidět pouze krátké nespecifické sekvence pod 200 bp.

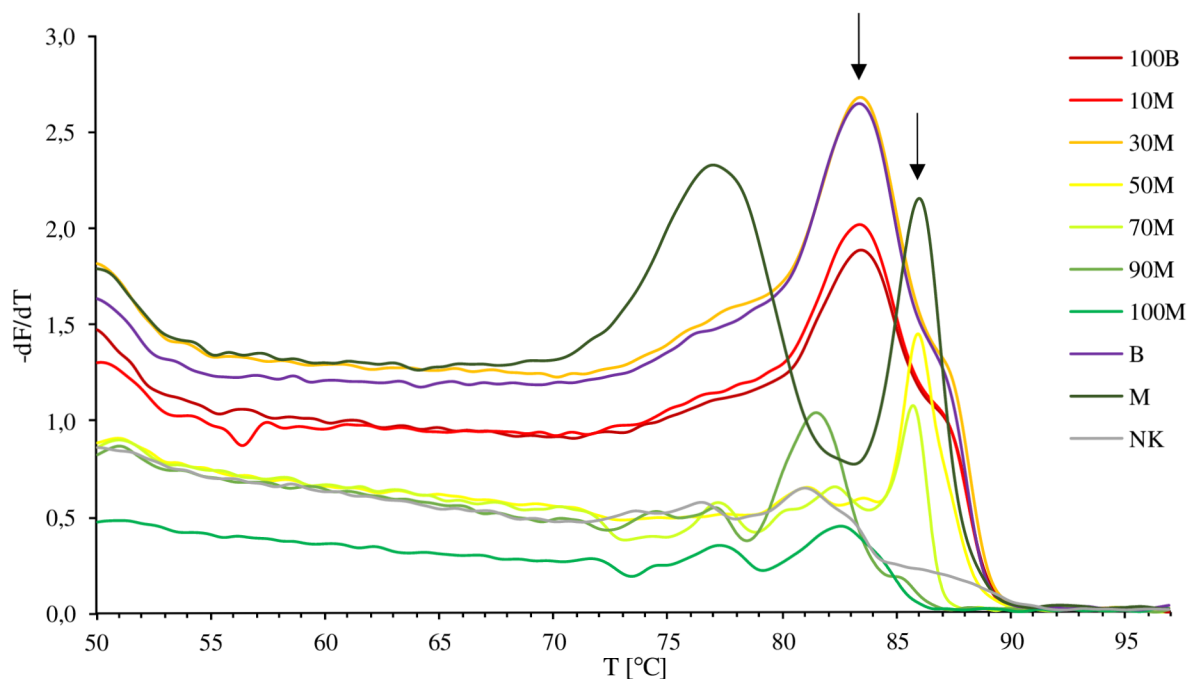


Obr. 43 Elektroforéza produktů po amplifikaci DNA z pyrě s primery PdCass (1, 2 – NK, 3, 4 – B, 6, 7, 8 – M, 9, 10, 11 – 100B, 12, 13, 14 – 10M, 15, 16, 17 – 30M, 18, 19, 20 – 50M, 21, 22, 23 – 70M, 24, 25, 26 – 90M, 27, 28, 29 – 100M, 30 – délkový standard)

Amplifikací DNA z pyrě s vyšším obsahem meruňky s primery PdCass bylo, i přes neúspěšné ověření amplifikovatelnosti pomocí primerů ITS-2, dosaženo syntézy malého množství specifických produktů tvarem píků blízkých pozitivní kontrole M s T_m kolem 86 °C, konkrétně se jednalo o vzorky 50M a 70M (Obr. 44). Vzorky 100B, 10M a 30M mají podobný tvar píků derivovaných křivek tání jako pozitivní kontrola B s maximem (T_m) při 84 °C. Vzhledem k vyššímu obsahu broskvové složky byl tento trend očekáván.

Derivované křivky tání vzorků 90M a 100M nevykazují vznik ani minimálního množství specifických produktů. Tvarem v teplotním rozmezí 73–87 °C se podobají negativní kontrole, ve které mohly vzniknout pouze nespecifické oligo- či dimery primerů.

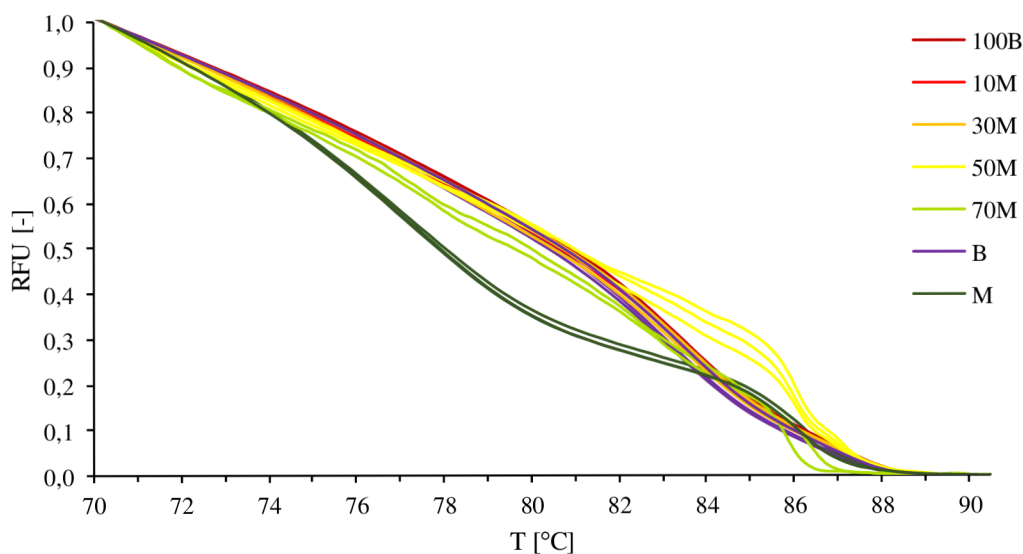
Obr. 44 obsahuje pro přehlednost vždy pouze jednu derivovanou křivku tání od každého vzorku. Všechny tři křivky od každého vzorku jsou předmětem Obr. 52, uvedeného v příloze.



Obr. 44 Derivované křivky tání ampliconů DNA z pyré (všechny vzorky izolovány CTAB protokolem)

Normalizací dat v rozmezí teplot 70–90,5 °C bylo dosaženo rozlišení vzorků 100B až 70M. PCR u pyré 90M a 100M neposkytla specifické produkty, které by bylo možné analyzovat HRM metodami.

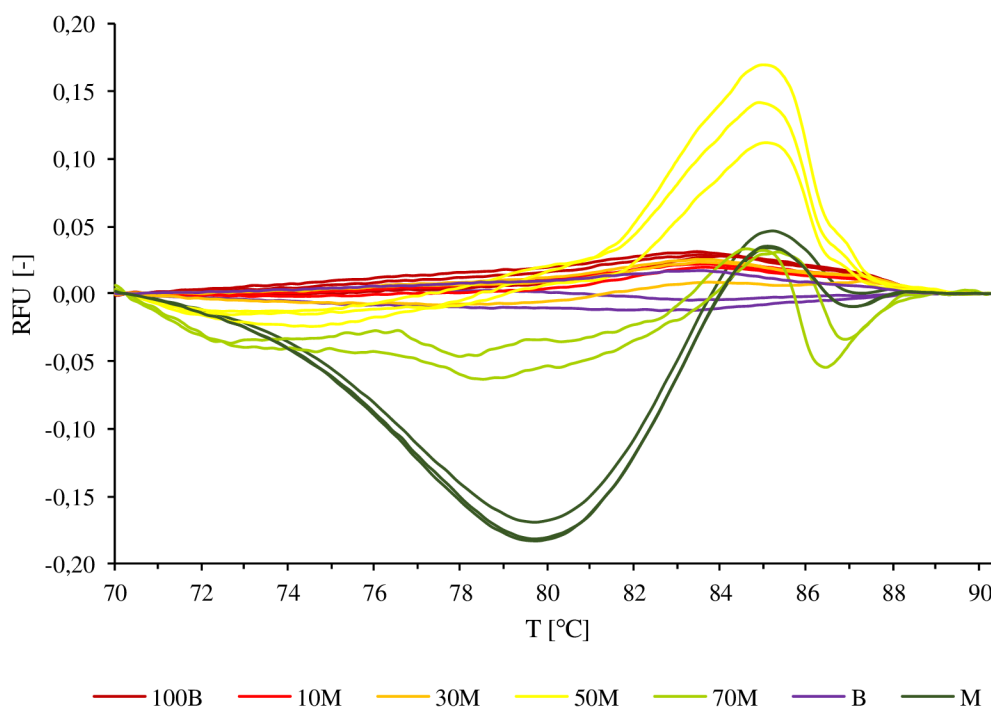
Obr. 45 zobrazuje normalizované křivky tání, kde se pyré 100B, 10M a 30M překrývají s pozitivní kontrolou B a nelze je od sebe vizuálně odlišit. Pyré 50M poskytuje výrazně odlišný tvar křivek tání umožňující jednoduché odlišení od ostatních pyré, částečně se však překrývá s křivkami B. Křivky tání pyré 70M lze také bez obtíží odlišit pouhým okem a částečně se překrývají s křivkami pozitivní kontroly M.



Obr. 45 Normalizované křivky tání ampliconů DNA z pyré (všechny vzorky izolovány CTAB protokolem)

Diference normalizovaných křivek tání slouží k výraznějšímu odlišení rozdílů ve tvaru mezi porovnávanými křivkami. Zobrazuje míru rozdílnosti křivek ostatních vzorků od vzorku referenčního, za který byla zvolena pozitivní kontrola B. Lze vidět naprosté překrytí pyré 100B, 10M a 30M s křivkami pozitivní kontroly B.

Pyré 50M a 70M disponují naprosto odlišnými křivkami. Vzorky 50M se v rozmezí teplot 70–82 °C překrývají s křivkami B, poté lze vidět velký odklon do kladných hodnot od referenčního vzorku (rozmezí 82–87 °C). Pyré 70M se tvarem podobá spíše pozitivní kontrole M, v rozmezí teplot 83–88 °C se křivky téměř překrývají. V nižších teplotách hodnoty křivek 70M dosahují minimální relativní fluorescence -0,05.



Obr. 46 Diference normalizovaných křivek tání ampliconů DNA z pyré (všechny vzorky izolovány CTAB protokolem)

Míru podobnosti normalizovaných křivek tání lze mimo vizuálního vyjádření (diference) vyjádřit i početně. Využívá se vzorec pro výpočet tzv. skóre podobnosti GCP (vzorec 7), který porovnává hodnoty RFU při konkrétní teplotě mezi dvěma křivkami. Hranici, nad kterou jsou křivky považované za identické si lze zvolit v závislosti na konkrétním použití, lze pracovat s hodnotou 0,95 i 0,99 (resp. 95 % i 99 %).

Hodnoty GCP byly vypočteny pro všechny dvojice dat normalizovaných křivek tání (Tab. 24 v příloze). Z identických vzorků byly vypočteny průměry, které byly poté opatřeny směrodatnou odchylkou (Tab. 18). Pro přehlednost byla data převedena na procenta. Jako hraniční hodnota, kdy jsou křivky stále považovány za identické, bylo zvoleno 95 %, protože se nad touto hranicí vyskytují všechny hodnoty CGP porovnávající identické vzorky (B-B, M-M, 100B-100B, 10M-10M, 30M-30M, 50M-50M a 70M-70M).

Cílem PCR analýzy se specifickými primery PdCass bylo amplifikovat specifické úseky DNA izolované z listu broskvoně (B) a meruňky (M), které by při analýze křivek tání poskytly výrazně odlišné křivky. Bylo předpokládáno, že při aplikaci stejných podmínek amplifikace

na modelové výrobky s různým podílem meruňkové složky se budou jejich křivky tání nacházet v rozmezí křivek tání B a M. Normalizované křivky tání (Obr. 45) a difference (Obr. 46) však tuto teorii vyvrátily.

Průměrný výsledek GCP mezi vzorky M a B se rovná hodnotě (53 ± 8) %, což by mělo odpovídat největší rozdílnosti mezi křivkami, neboť se jedná o naprosto odlišné vzorky. V případě vzorku s 10% obsahem meruňky (10M) byla očekávána malá podobnost s křivkami M, avšak překvapující je hodnota GCP menší, než v případě dvojice M-B, pouze (44 ± 5) %. Vzorek s 30% podílem meruňky (30M) je při hodnotě (46 ± 7) % s M více podobný, zajímavá je však větší podobnost dvojice s B než v případě dvojice 100B-B. Nejnižší GCP bylo vypočteno u dvojice 50M-M (30 ± 6) %, podobnost pyrě s 50% obsahem meruňky se vzorkem B dosahuje (90 ± 10) %, což je stále nad očekávání vysoká hodnota. Pyrě se 70% podílem meruňky (70M) je dle očekávání méně podobné vzorku B než pyrě 50M, pouze (89 ± 5) %.

V ideálně optimalizovaném experimentu by měly dosahovat hranice 95 % pouze dvojice vzorků, které jsou skutečně identické. Tato hranice ale byla překonána i u rozdílných dvojic.

Tab. 18 Průměrné hodnoty skóre podobnosti normalizovaných křivek tání

Porovnávané vzorky	GCP [%]
B-B	98 ± 1
M-B	53 ± 8
M-M	$99,1 \pm 0,6$
100B-B	97 ± 3
100B-M	40 ± 5
100B-100B	$99,7 \pm 0,2$
10M-B	98 ± 2
10M-M	44 ± 5
10M-100B	$99,5 \pm 0,5$
10M-10M	$99,9 \pm 0,1$
30M-B	98 ± 2
30M-M	46 ± 7
30M-100B	99 ± 2
30M-10M	$99,5 \pm 0,7$
30M-30M	$98,7 \pm 0,9$
50M-B	90 ± 10
50M-M	30 ± 6
50M-100B	97 ± 2
50M-10M	95 ± 3
50M-30M	94 ± 4
50M-50M	98 ± 1
70M-B	89 ± 5
70M-M	81 ± 5
70M-100B	78 ± 4
70M-10M	82 ± 3
70M-30M	83 ± 5
70M-50M	70 ± 10

5 ZÁVĚR

Metoda PCR slouží k účinné amplifikaci specifické sekvence DNA volbou specifických primerů, krátkých oligonukleotidových sekvencí ohraničujících amplifikované úseky. PCR analýza zkoumá vzorky na molekulární úrovni a pro svoji citlivost se používá pro stanovení autenticity potravinářských výrobků rostlinného i živočišného charakteru.

V experimentální části práce byly testovány dvě sady primerů specifických pro amplifikaci broskvové a meruňkové DNA.

PCR analýzy s párem primerů AGS18 i PdCass probíhaly s matricí DNA získané z ovocných listů. Primery AGS18 se ukázaly jako neúčinné při amplifikaci DNA z listu broskve a pouze omezeně amplifikovaly specifické sekvence u DNA z listu meruňky. Z těchto důvodů bylo od dalších experimentů s těmito primery upuštěno.

Pár primerů PdCass však amplifikaci specifických produktů na obou matricích dokázal, avšak současně bylo detekováno velké množství nespecifických produktů. Následnou optimalizací složení reakční směsi a teplotního profilu PCR bylo dosaženo snížení nespecifických produktů a jasné definice teplot tání specifických sekvencí z broskvové DNA při 83 °C a z meruňkové DNA při 86 °C.

Cílem práce bylo otestovat specifické primery při amplifikaci DNA z ovocných výrobků. Proto bylo připraveno sedm druhů ovocných pyré z plodů broskve a meruňky s podílem meruňky 0 %, 10 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 % a 100 %. Z těchto modelových výrobků byla izolována DNA podle CTAB protokolu. Pro vyšší obsah polysacharidů v ovocných vzorcích byl zařazen krok s přidavkem CaCl₂. Izolovaná DNA byla podrobena PCR analýze se specifickými primery PdCass, při optimalizovaných parametrech z experimentů s listovou DNA, následované HRM analýzou.

Výsledná gelová elektroforéza prokázala přítomnost specifických produktů u pyré 100B, 10M, 30M a 50M. HRM analýzou bylo detekováno malé množství specifických sekvencí i u vzorků 70M. Při následné práci s daty byla provedena normalizace křivek tání v teplotním rozpětí 70–90,5 °C a byly porovnány rozdíly ve tvaru křivek tání detekovaných specifických produktů. Tvary křivek byly porovnávány vzhledem k pozitivním kontrolám DNA z listů B a M. Samotné normalizované křivky tání dokázaly odlišit jen pyré 50M a 70M, zbylá pyré kopírovala tvar vzorku B.

Pro detailnější odlišení tvarů křivek byla vytvořena jejich diference s referenčním vzorkem B, což sloužilo jako vizuální odlišení tvarů křivek. Jako numerické vyjádření podobnosti sloužil výpočet hodnot skóre podobnosti (GCP), při dosažení GCP na hodnotu 95 % a více byly křivky považovány za shodné. Tuto hodnotu překročili všechny vzorky, které se na grafu normalizovaných křivek překrývaly (100B, 10M a 30M s B). Pyré 50M se s (30 ± 6) % lišily od M nejvýrazněji ze všech vzorků, pyré 70M dosáhlo dle předpokladů vyšších hodnot GCP, (81 ± 5) %.

Sérií experimentů bylo HRM analýzou docíleno rozlišení pouze pěti pyré ze sedmi. Izolačním a amplifikačním postupem nebylo dosaženo syntézy specifických produktů u DNA z pyré 90M a 100M. Úpravou izolačního protokolu pro získání meruňkové DNA schopné efektivnější amplifikace by snad bylo možné dosáhnout lepších výsledků. Případné navrnutí primerů schopných ideálnějšího rozlišení druhů *P. persica* a *P. armeniaca* ve směsích by mělo dopomoci k snadnější optimalizaci odlišení těchto druhů.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] NOVÁK, Jan a Milan SKALICKÝ. *Botanika II.: systém rostlin*. V Praze: Česká zemědělská univerzita, 2007. ISBN 978-80-213-1688-1.
- [2] SHI, Shuo, Jinlu LI, Jiahui SUN, Jing YU a Shiliang ZHOU. Phylogeny and Classification of *Prunus sensu lato* (Rosaceae). *Journal of Integrative Plant Biology* [online]. 2013, **55**(11), 1069-1079 [cit. 2024-03-12]. ISSN 1672-9072. Dostupné z: doi:10.1111/jipb.12095
- [3] *Zahradnický slovník naučný*. Ilustroval Helena ATANASOVÁ. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1994. ISBN 0-7271-075-3. 242–315.
- [4] *Zahradnický slovník naučný*. Ilustroval Helena ATANASOVÁ. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1999. ISBN 80-86153-60-6. 240–534.
- [5] VĚTVIČKA, Václav. *Stromy a keře*. Vyd. 2. Ilustroval Vlasta MATOUŠOVÁ, ilustroval Jan MAŠEK. Praha: Aventinum, 2005. Souborné svazky. ISBN 80-7151-254-0. 206–207.
- [6] *Prunus persica*. *GDR* [online]. c2010 [cit. 2024-03-22]. Dostupné z: <https://www.rosaceae.org/organism/24333>
- [7] SHULAEV, Vladimir, Schuyler S. KORBAN, Bryon SOSINSKI, et al. Multiple Models for Rosaceae Genomics. *Plant Physiology* [online]. 2008, 2008-07-08, **147**(3), 985-1003 [cit. 2024-03-22]. ISSN 0032-0889. Dostupné z: doi:10.1104/pp.107.115618
- [8] COOMBES, Allen J. *Stromy: nový kapesní atlas*. 2. vyd. Přeložil Patricie FRECEROVÁ. V Praze: Slovart, 2012. Nový kapesní atlas. ISBN 978-80-7391-631-2. 174–183.
- [9] BULKOVÁ, Věra. *Rostlinné potraviny*. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2011. ISBN 9788070135327. 90.
- [10] KUTINA, Josef. *Pomologický atlas*. Ilustroval Gašpar VANEK, ilustroval Pavel DVORSKÝ, ilustroval Marie SUCHARDOVÁ. Praha: Brázda, 1991. ISBN 80-209-0089-6. 102–123.
- [11] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 9788086659152. 216.
- [12] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 9788086659169. 104.
- [13] BELITZ, Hans-Dieter, Werner GROSCH a Peter SCHIEBERLE. *Food chemistry*. 4th, rev. and extended ed. Berlin: Springer, c2009. ISBN 978-3-540-69933-0. 142–849.
- [14] BEDNÁŘOVÁ, Jaroslava. *Herbář, aneb, Stromy a keře*. V Praze: Fortuna Libri, 2019. ISBN 978-80-7546-164-3. 118.
- [15] ALI, Sartaj, Tariq MASUD a Kashif Sarfraz ABBASI. Physico-chemical characteristics of apricot (*Prunus armeniaca* L.) grown in Northern Areas of Pakistan. *Scientia Horticulturae* [online]. 2011, **130**(2), 386-392 [cit. 2024-04-09]. ISSN 03044238. Dostupné z: doi:10.1016/j.scienta.2011.05.040
- [16] DRDÁK, Milan. *Základy potravinářských technologií: spracovanie rastlinných a živočíšnych surovín, cereálne a fermentačné technológie, uchovávanie, hygiena a ekológia potravín*. Bratislava: Malé centrum, 1996. ISBN 8096706411. 203.

- [17] COCCONI, E., C. STINGONE, A. ZANOTTI a A. TRIFIRO. Characterization of polyphenols in apricot and peach purees by UHPLC coupled to HRMS Q-Exactive™ mass spectrometer: an approach in the identification of adulterations. *Journal of Mass Spectrometry* [online]. 2016, **51**(9), 742-749 [cit. 2024-04-29]. ISSN 1076-5174. Dostupné z: doi:10.1002/jms.3818
- [18] DRAGOVIC-UZELAC, Verica, Karmela DELONGA, Branka LEVAJ, Senka DJAKOVIC a Jasna POSPISIL. Phenolic Profiles of Raw Apricots, Pumpkins, and Their Purees in the Evaluation of Apricot Nectar and Jam Authenticity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2005, **53**(12), 4836-4842 [cit. 2024-04-29]. Dostupné z: doi:10.1021/jf040494+
- [19] DOSTÁLOVÁ, Jana a Pavel KADLEC. *Potravinářské zboží: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2014. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-208-2. 37–196.
- [20] *Zákon č. 110/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů*. In: . 1997.
- [21] *Vyhláška č. 397/2021 Sb. o požadavcích na konzervované ovoce a konzervovanou zeleninu, skořápkové plody, houby, brambory a výrobky z nich a banány*. In: . 2021.
- [22] *Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002, kterým se stanoví obecné zásady a požadavky potravinového práva, zřizuje se Evropský úřad pro bezpečnost potravin a stanoví postupy týkající se bezpečnosti potravin*. In: . 2002.
- [23] HRABĚ, Jan, Otakar ROP a Ignác HOZA. *Technologie výroby potravin rostlinného původu: bakalářský stupeň*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005 [i. e. 2006]. Učební texty vysokých škol. ISBN 80-7318-372-2. Dostupné také z: <http://www.digitalniknihovna.cz/mzk/uuid/uuid:82a58b40-1a81-11e7-96ce-005056827e51>. 142–167.
- [24] TAUFEROVÁ, Alexandra. *Technologie a hygiena potravin rostlinného původu I., II*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-692-6. 36–45.
- [25] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Procesy a zařízení potravinářských a biotechnologických výrob: [technologie potravin]*. Ostrava: Key Publishing, 2012. Monografie (Key Publishing). ISBN 9788074180866. 119–461.
- [26] *Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1935/2004 o materiálech a předmětech určených pro styk s potravinami a o zrušení směrnic 80/590/EHS a 89/109/EHS*. In: . 2004.
- [27] *Vyhláška č. 328/2000 Sb. o způsobu zhotovení některých druhů hotově baleného zboží, jehož množství se vyjadřuje v jednotkách hmotnosti nebo objemu*. In: . 2000.
- [28] *Vyhláška č. 417/2016 Sb., o některých způsobech označování potravin*. In: . 2016.
- [29] ČÍŽKOVÁ, Helena, ed. *Metody a kritéria [sic] pro ověřování autenticity potravin a potravinářských surovin*. Ostrava: Key Publishing, 2011. ISBN 978-80-7418-124-5. Dostupné také z: <http://www.digitalniknihovna.cz/mzk/uuid/uuid:f50f52f0-6a45-11e8-8470-005056827e52>
- [30] ČÍŽKOVÁ, Helena. *Falšování potravin*. Praha: Verlag Dashöfer, 2019. ISBN 978-80-87963-88-3. 6–71.

- [31] ALL: STÁTNÍ ZEMĚDĚLSKÁ A POTRAVINÁŘSKÁ INSPEKCE. Státní zemědělská a potravinářská inspekce. *Kontrolní činnost SZPI* [online]. 2024 [cit. 2024-04-10]. Dostupné z: <https://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1002118>
- [32] POSPIECH, Matej. *Struktura a skladba potravin*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2013. ISBN 978-80-7305-657-5. 86–91.
- [33] *Zákon č. 634/1992 Sb. o ochraně spotřebitele, v platném znění*. In: . 2023.
- [34] FUKAL, Ladislav. *Bioanalytické metody pro fyziky*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2006. ISBN 80-7080-611-7. Dostupné také z: <http://www.digitalniknihovna.cz/mzk/uuid/uuid:dadf62a0-4753-11e7-aac4-005056827e51>. 6–292.
- [35] PRAUS, Petr a Jiřina VONTOROVÁ. *Analytická chemie II*. Ostrava: VŠB - Technická univerzita Ostrava, 2015. ISBN 978-80-248-3734-5. 8–121.
- [36] NIELSEN, S. Suzanne, ed. *Food Analysis* [online]. 5th edition. Cham: Springer International Publishing, 2017 [cit. 2024-03-14]. Food Science Text Series. ISBN 978-3-319-45774-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-45776-5. 214–587.
- [37] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Třetí, upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko, 2016. ISBN 978-80-86369-22-8. 13–103.
- [38] POMERANZ, Yeshajahu a Clifton E. MELOAN. *Food analysis: theory and practice*. 3rd Ed. New York: Chapman and Hall, 1994. ISBN 0-412-98551-9. 270.
- [39] SKOOG, Douglas A., Donald M. WEST, F. James HOLLER a Stanley R. CROUCH. *Analytická chemie*. Vydání: první. Přeložil Karel NESMĚRÁK, přeložil Václav ČERVENÝ, přeložil Tomáš KRÍŽEK, přeložil Eliška NOVÁKOVÁ. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019. ISBN 9788075920430. 601–860.
- [40] BURDYCHOVÁ, Radka a Pavla SLÁDKOVÁ. *Mikrobiologická analýza potravin*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. ISBN 978-80-7375-116-6. Dostupné také z: <http://www.digitalniknihovna.cz/mzk/uuid/uuid:9839fe50-b1e7-11e9-8fdf-005056827e52>. 178.
- [41] MAGDELDIN, Sameh, ed. *Gel Electrophoresis - Principles and Basics* [online]. InTech, 2012 [cit. 2024-03-08]. ISBN 978-953-51-4309-3. Dostupné z: doi:10.5772/2205. 46.
- [42] BROWN, T. A. *Klonování genů a analýza DNA: úvod*. V Olomouci: Univerzita Palackého, 2007. ISBN 9788024417196. 32–187.
- [43] WILLIAMS, LR. Staining nucleic acids and proteins in electrophoresis gels. *Biotechnic & Histochemistry* [online]. 2009, 2009-07-12, **76**(3), 127-132 [cit. 2024-04-16]. ISSN 1052-0295. Dostupné z: doi:10.1080/bih.76.3.127.132
- [44] SAMBROOK, Joseph a David W. RUSSELL. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd. ed. New York: Cold spring harbor laboratory press, 2001. ISBN 978-0-87969577-4. 5.9–8.6.
- [45] VALEUR, Bernard a Mário Nuno BERBERAN-SANTOS. *Molecular fluorescence: principles and applications*. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2013. ISBN 978-3-527-32846-8. 496.
- [46] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1. 73–90.
- [47] *Molecular Biology and Biotechnology*. 4th Ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2000. ISBN 0854046062. 50.

- [48] SNUSTAD, D. Peter a Michael J. SIMMONS, RELICHOVÁ, Jiřina, ed. *Genetika*. Druhé, aktualizované vydání. Přeložil Jiří DOŠKAŘ, přeložil Jiří FAJKUS, přeložil Petr HOŘÍN, přeložil Aleš KNOLL, přeložil Petr KUGLÍK, přeložil Jan ŠMARDA, přeložil Jana ŠMARDOVÁ, přeložil Renata VESELSKÁ, přeložil Boris VYSKOT. Brno: Masarykova univerzita, 2017. ISBN 978-80-210-8613-5. 362.
- [49] ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero, c1998. ISBN 80-902906-0-4. 333.
- [50] LYON, Elaine a Carl T. WITTEWER. LightCycler Technology in Molecular Diagnostics. *The Journal of Molecular Diagnostics* [online]. 2009, **11**(2), 93-101 [cit. 2024-04-19]. ISSN 15251578. Dostupné z: doi:10.2353/jmoldx.2009.080094
- [51] RIRIE, Kirk M., Randy P. RASMUSSEN a Carl T. WITTEWER. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry* [online]. 1997, **245**(2), 154-160 [cit. 2024-04-19]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1006/abio.1996.9916
- [52] DRUML, Barbara a Margit CICHNA-MARKL. High resolution melting (HRM) analysis of DNA – Its role and potential in food analysis. *Food Chemistry* [online]. 2014, **158**, 245-254 [cit. 2024-05-03]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.111
- [53] MADER, Eduard, Joana RUZICKA, Corinna SCHMIDERER a Johannes NOVAK. Quantitative high-resolution melting analysis for detecting adulterations. *Analytical Biochemistry* [online]. 2011, **409**(1), 153-155 [cit. 2024-04-19]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2010.10.009
- [54] PEREIRA, Leonor, Sónia GOMES, Sara BARRIAS, José Ramiro FERNANDES a Paula MARTINS-LOPES. Applying high-resolution melting (HRM) technology to olive oil and wine authenticity. *Food Research International* [online]. 2018, **103**, 170-181 [cit. 2024-05-06]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2017.10.026
- [55] NUNZIATA, Angelina, Claudio CERVELLI a Laura DE BENEDETTI. Genotype confidence percentage of SSR HRM profiles as a measure of genetic similarity in *Rosmarinus officinalis*. *Plant Gene* [online]. 2018, **14**, 64-68 [cit. 2024-04-29]. ISSN 23524073. Dostupné z: doi:10.1016/j.plgene.2018.04.006
- [56] ZAMBOUNIS, Antonios, Anastasios SAMARAS, Alike XANTHOPOULOU, Maslin OSATHANUNKUL, Leonardo SCHENA, Athanasios TSAFTARIS a Panagiotis MADEISIS. Identification of Phytophthora species by a high resolution melting analysis: an innovative tool for rapid differentiation. *Plant Protection Science* [online]. 2016, 2016-9-30, **52**(3), 176-181 [cit. 2024-05-06]. ISSN 12122580. Dostupné z: doi:10.17221/179/2015-PPS
- [57] MURRAY, Robert K. *Harperova Biochemie*. 23. vyd., (4. české vyd.), v H & H 3. Jinočany: H & H, 2002. Lange medical book. ISBN 8073190133. 6–8.
- [58] VOET, Donald a Judith G. VOET. *Biochemistry*. 3rd ed. Hoboken: John Wiley, 2004. ISBN 0471392235. 128–156.

- [59] SCHENK, John J., L. Ellie BECKLUND, S. James CAREY a Paige P. FABRE. What is the “modified” CTAB protocol? Characterizing modifications to the CTAB DNA extraction protocol. *Applications in Plant Sciences* [online]. 2023, **11**(3) [cit. 2024-05-06]. ISSN 2168-0450. Dostupné z: doi:10.1002/aps3.11517
- [60] HUD, Nicholas V, Vladimir SKLENÁŘ a Juli FEIGON. Localization of ammonium ions in the minor groove of DNA duplexes in solution and the origin of DNA A-tract bending 1 Edited by I. Tinoco. *Journal of Molecular Biology* [online]. 1999, **286**(3), 651-660 [cit. 2024-04-19]. ISSN 00222836. Dostupné z: doi:10.1006/jmbi.1998.2513
- [61] DAHAL, Yuba Raj a Jeremy D. SCHMIT. Ion Specificity and Nonmonotonic Protein Solubility from Salt Entropy. *Biophysical Journal* [online]. 2018, **114**(1), 76-87 [cit. 2024-04-19]. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpj.2017.10.040
- [62] ZHANG, Jiahui, Lian JIANG, Jun YANG, Xianxiang CHEN, Mingyue SHEN, Qiang YU, Yi CHEN a Jianhua XIE. Effect of calcium chloride on heat-induced Mesona chinensis polysaccharide-whey protein isolation gels: Gel properties and interactions. *LWT* [online]. 2022, **155** [cit. 2024-04-19]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2021.112907
- [63] LOOMIS, W.D. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. In: *Biomembranes Part A* [online]. Elsevier, 1974, s. 528-544 [cit. 2024-04-19]. Methods in Enzymology. ISBN 9780121818944. Dostupné z: doi:10.1016/0076-6879(74)31057-9
- [64] TANG, Jun-ni, Zhi-guang ZENG, Hong-ning WANG, et al. An effective method for isolation of DNA from pig faeces and comparison of five different methods. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2008, **75**(3), 432-436 [cit. 2024-04-19]. ISSN 01677012. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2008.07.014
- [65] *Genetic Diagnosis of Endocrine Disorders* [online]. 2nd edition. Elsevier, 2016 [cit. 2024-04-16]. ISBN 9780128008928. Dostupné z: doi:10.1016/C2013-0-14455-8. 413.
- [66] *Diagnostic Molecular Biology* [online]. 2nd edition. Elsevier, 2023 [cit. 2024-04-16]. ISBN 9780323917889. Dostupné z: doi:10.1016/C2020-0-01054-6. 181–208.
- [67] DANEZIS, Georgios P., Aristidis S. TSAGKARIS, Federica CAMIN, Vladimir BRUSIC a Constantinos A. GEORGIU. Food authentication: Techniques, trends & emerging approaches. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2016, **85**, 123-132 [cit. 2024-05-06]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2016.02.026
- [68] SIGMA-ALDRICH. GenElute™-E Organic Solvent DNA Cleanup Kit Protocol. SIGMA-ALDRICH. MERCK [online]. c2020 [cit. 2024-03-13]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.cn/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/419/074/ec700pis-20442209w-mk.pdf>
- [69] INTERCORE SOLUTIONS S.R.O. EliGene® Plant DNA Isolation Kit. *ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o* [online]. [2018] [cit. 2024-03-14]. Dostupné z: <https://www.elisabeth.cz/produkt-eligene-plant-dna-isolation-extraction-kit.html>
- [70] YAO, Hui, Jingyuan SONG, Chang LIU, et al. Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals. *PLoS ONE* [online]. 2010, 2010-10-1, **5**(10) [cit. 2024-05-08]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0013102

- [71] 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* [online]. 2010, 2010-1-7, **5**(1) [cit. 2024-03-15]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0008613
- [72] MUÑOZ, Sanz. *Crossability barriers in Prunus: the role of modifiers in the regulation of the gametophytic self-incompatibility system* [online]. Valencia, 2016 [cit. 2024-05-03]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/10251/68489>. Tesis doctoral. Universitat Politècnica de València.
- [73] ZIAROVSKA, Jana, Danka BOSELOVA a Milan BEZO. RETROTRANSPOSONCASSANDRA COPIES ESTIMATING IN PLUMS USING REAL-TIME PCR APPROACH. *Emirates Journal of Food and Agriculture* [online]. 2015, **27**(12) [cit. 2024-03-19]. ISSN 2079-052X. Dostupné z: doi:10.9755/ejfa.2015-04-165
- [74] FastGene 100 bp DNA Marker. *NIPPON Genetics EUROPE* [online]. c2024 [cit. 2024-03-19]. Dostupné z: <https://www.nippongenetics.eu/en/products/electrophoresis-dna-rna/dna-ladder/100-bp-dna-ladder/>
- [75] JOBES, David V., David L. HURLEY a Leonard B. THIEN. Plant DNA isolation: a method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides, and RNA. *TAXON* [online]. 1995, **44**(3), 379-386 [cit. 2024-05-08]. ISSN 0040-0262. Dostupné z: doi:10.2307/1223408
- [76] MITSUHASHI, Masato. Technical report: Part 2. Basic requirements for designing optimal PCR primers. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* [online]. 1996, **10**(5), 285-293 [cit. 2024-05-08]. ISSN 0887-8013. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1098-2825(1996)10:5<285::AID-JCLA9>3.0.CO;2-7open_in_newISSN
- [77] KUBISTA, Mikael, José Manuel ANDRADE, Martin BENGTTSSON, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* [online]. 2006, **27**(2-3), 95-125 [cit. 2024-05-08]. ISSN 00982997. Dostupné z: doi:10.1016/j.mam.2005.12.007
- [78] SU, X. Reduced extension temperatures required for PCR amplification of extremely A+T-rich DNA. *Nucleic Acids Research* [online]. 1996, **24**(8), 1574-1575 [cit. 2024-05-08]. ISSN 13624962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/24.8.1574
- [79] TATAUROV, Andrey V., Yong YOU a Richard OWCZARZY. Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids. *Biophysical Chemistry* [online]. 2008, **133**(1-3), 66-70 [cit. 2024-05-13]. ISSN 03014622. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpc.2007.12.004

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

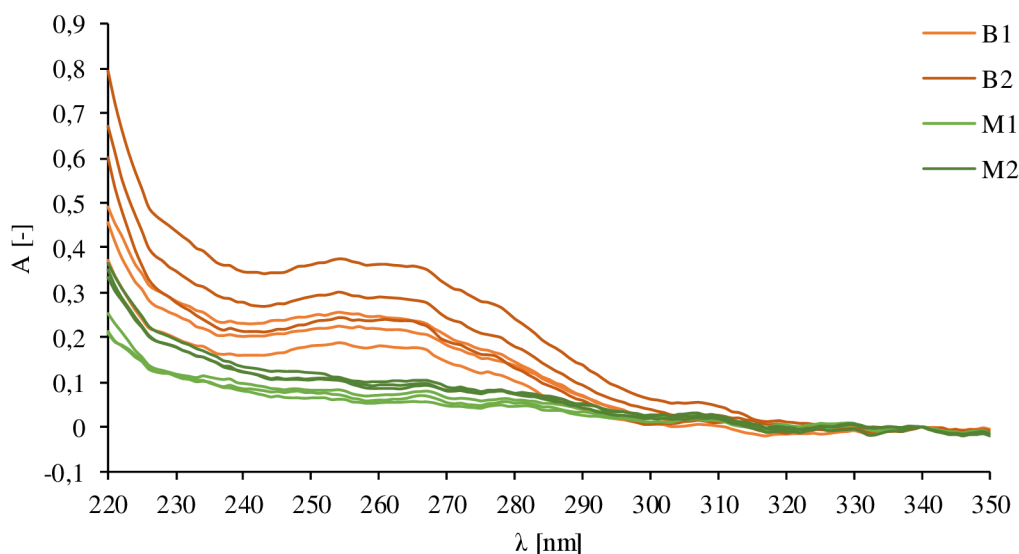
100B	pyré se 100% podílem broskve
100M	pyré se 100% podílem meruňky
10M	pyré s 10% podílem meruňky a 90% podílem broskve
30M	pyré s 30% podílem meruňky a 70% podílem broskve
50M	pyré s 50% podílem meruňky a 50% podílem broskve
70M	pyré se 70% podílem meruňky a 30% podílem broskve
90M	pyré s 90% podílem meruňky a 10% podílem broskve
A	adenin
A	absorbance [-]
AAS	atomová absorpční spektrometrie (<i>atomic absorption spectrometry</i>)
B	list broskvoně
bp	páry bází (<i>base pairs</i>)
C	cytosin
c	koncentrace [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \approx \text{M}$, $\text{ng} \cdot \text{ul}^{-1}$]
C_T	počet cyklů (<i>threshold cycles</i>)
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
dATP	2'-deoxyadenosin-5'-trifosfát
dCTP	2'-deoxycytidin-5'-trifosfát
dGTP	2'-deoxyguanosin-5'-trifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-deoxynukleosid-5'-trifosfát
dsDNA	dvoušroubovicová DNA (<i>double stranded</i>)
dTTP	2'-deoxythymidin-5'-trifosfát
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	imunologická metoda (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EtBr	ethydiumbromid
F	fluorescence [%]
G	guanin
GC	plynová chromatografie (<i>gas chromatography</i>)
GCP	skóre podobnosti (<i>genotype confidence percentage</i>)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HRM	vysokorozlišovací analýza křivek tání (<i>high resolution melting</i>)
IR	infračervený (<i>infrared</i>)
J	list jabloně
l	tloušťka kyvety [cm]
LFIA	imunotest na bázi laterálního proudu (<i>lateral flow immunoassay</i>)
M	list meruňky
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometrie (<i>mass spectrometry</i>)
NK	negativní kontrola
NMR	nukleární magnetická rezonance (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza (<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
PK	pozitivní kontrola
Primer F	přední primer (<i>forward</i>)
Primer R	zpětný primer (<i>reverse</i>)

RFU	relativní jednotka fluorescence [-] (<i>relative fluorescence unit</i>)
RNA	ribonukleová kyselina (<i>ribonucleic acid</i>)
S	hodnota podobnosti (<i>similarity value</i>)
SDS	dodecylsulfát sodný
SF	stacionární fáze
SNIF-NMR	kvantitativní NMR (<i>specific site natural isotope fractionation</i>)
SZPI	Státní zemědělská a potravinářská inspekce
T	thymín
<i>t</i>	čas [s]
<i>T</i>	teplota [°C]
<i>T_a</i>	teplota hybridizace [°C] (<i>annealing temperature</i>)
TBE	Tris-borátový pufr
TE	pufr obsahující Tris-bázi a EDTA
TLC	tenkovrstvá chromatografie (<i>thin layer chromatography</i>)
<i>T_m</i>	teplota tání [°C] (<i>melting temperature</i>)
Tris-báze	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
UV/VIS	ultrafialové/viditelné světlo (<i>ultraviolet/visible</i>)
ΔT	rozdíl teploty [°C]
<i>E</i>	emise [-]
ε	molární absorpční koeficient [$\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
λ	vlnová délka [nm]
Φ	prošlý tok záření [$\text{W} \cdot \text{m}^{-1}$]
Φ_0	dopadající tok záření [$\text{W} \cdot \text{m}^{-1}$]

8 PŘÍLOHY

Tab. 19 Hodnoty koncentrace a čistoty DNA izolované z ovocných listů CTAB protokolem

List	Opakování	c [ng·μl ⁻¹]	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	A _{260/230}
B	1	11,0	0,219	0,137	1,60	0,88
		9,0	0,181	0,102	1,77	0,91
		12,3	0,247	0,145	1,70	0,88
	průměr	10,8 ± 1,4	0,22 ± 0,03	0,13 ± 0,02	1,69 ± 0,07	0,89 ± 0,01
	2	18,1	0,363	0,241	1,51	0,83
		12,0	0,239	0,131	1,83	0,86
14,5		0,290	0,179	1,62	0,83	
průměr	14,9 ± 2,5	0,30 ± 0,05	0,18 ± 0,05	1,7 ± 0,1	0,84 ± 0,01	
M	1	3,5	0,071	0,060	1,18	0,60
		2,7	0,054	0,046	1,19	0,46
		3,0	0,060	0,053	1,12	0,53
	průměr	3,1 ± 0,3	0,062 ± 0,007	0,053 ± 0,006	1,16 ± 0,03	0,53 ± 0,06
	2	4,3	0,086	0,073	1,18	0,48
		4,3	0,086	0,067	1,27	0,52
4,7		0,094	0,075	1,25	0,53	
průměr	4,4 ± 0,2	0,089 ± 0,004	0,072 ± 0,003	1,23 ± 0,04	0,51 ± 0,02	



Obr. 47 Absorpční spektra všech vzorků DNA izolované z ovocných listů CTAB protokolem

Tab. 20 Hodnoty koncentrace a čistoty DNA izolované z ovocných listů po přečištění kitem GenElute

List	c [ng·μl ⁻¹]	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	A _{260/230}
B	-2,1	-0,042	-0,065	0,65	0,14
	-1,8	-0,036	-0,037	0,96	0,12
průměr	-2,0 ± 0,2	-0,039 ± 0,003	-0,05 ± 0,01	0,8 ± 0,2	0,13 ± 0,01
M	-3,3	-0,065	-0,074	0,88	0,20
	-2,5	-0,049	-0,049	1,01	0,16
průměr	-2,9 ± 0,4	-0,057 ± 0,008	-0,06 ± 0,01	0,95 ± 0,07	0,18 ± 0,02

Tab. 21 Hodnoty koncentrace a čistoty DNA izolované z ovocných listů kitem EliGene Plant

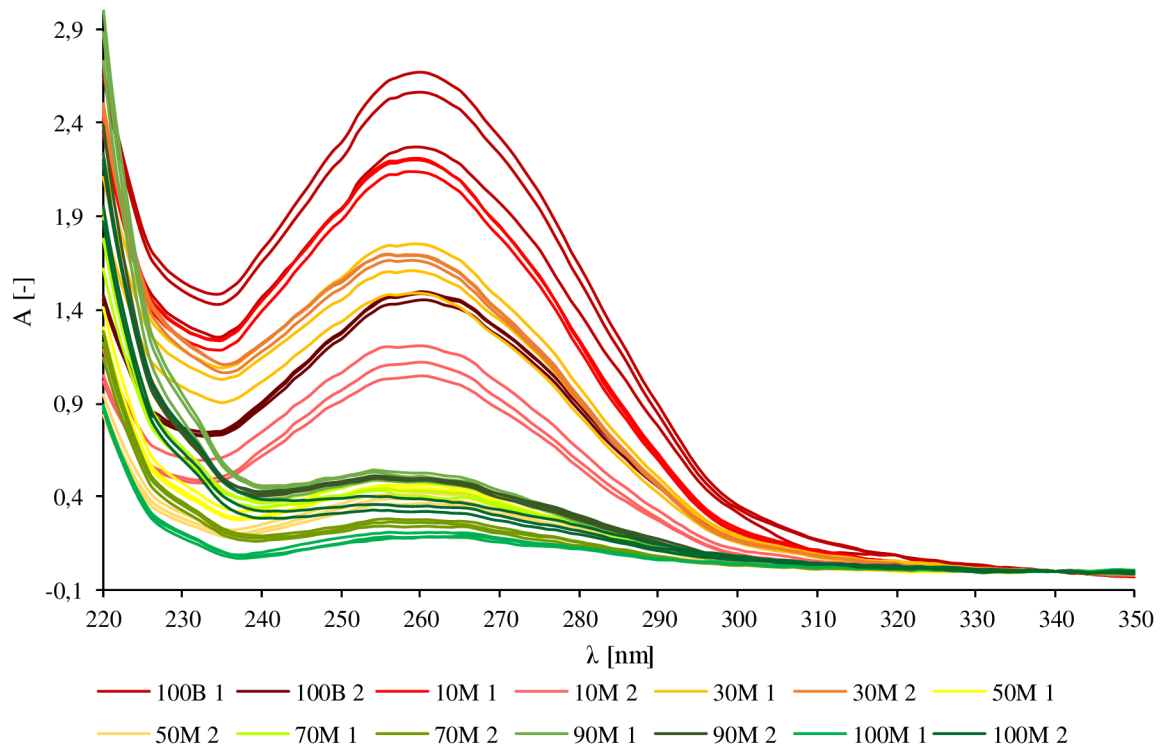
List	c [ng·μl ⁻¹]	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	A _{260/230}
J	83,2	1,663	0,811	2,05	1,98
	82,6	1,651	0,806	2,05	2,07
	82,9	1,659	0,803	2,06	2,09
průměr	82,9 ± 0,2	1,658 ± 0,005	0,807 ± 0,003	2,053 ± 0,005	2,05 ± 0,05
B	71,1	1,421	0,676	2,100	1,980
	71,5	1,431	0,690	2,070	2,000
	71,5	1,430	0,688	2,080	1,990
průměr	71,4 ± 0,2	1,427 ± 0,004	0,685 ± 0,006	2,08 ± 0,01	1,990 ± 0,008
M	57,0	1,141	0,540	2,110	1,990
	57,0	1,141	0,546	2,090	1,970
	56,7	1,135	0,539	2,100	1,950
průměr	56,9 ± 0,1	1,139 ± 0,003	0,542 ± 0,003	2,100 ± 0,008	1,97 ± 0,02

Tab. 22 Hodnoty koncentrace a čistoty DNA izolované z pyrů CTAB protokolem s CaCl₂

Pyré	Opakování	c [ng·μl ⁻¹]	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	A _{260/230}
100B	1	113,5	2,270	1,388	1,64	1,71
		133,5	2,671	1,638	1,63	1,72
		128,2	2,564	1,560	1,64	1,71
	průměr	125,1 ± 8,5	2,5 ± 0,2	1,5 ± 0,1	1,64 ± 0,0	1,71 ± 0,00
	2	74,8	1,496	0,891	1,68	1,94
		72,6	1,452	0,862	1,69	1,94
		74,3	1,486	0,891	1,67	1,97
průměr	73,9 ± 0,9	1,48 ± 0,02	0,88 ± 0,01	1,68 ± 0,01	1,95 ± 0,01	
10M	1	110,4	2,209	1,229	1,80	1,70
		110,0	2,200	1,239	1,78	1,69
		106,8	2,136	1,189	1,80	1,71
	průměr	109,1 ± 1,6	2,18 ± 0,03	1,22 ± 0,02	1,79 ± 0,01	1,70 ± 0,01
	2	52,3	1,046	0,555	1,89	2,15
		55,9	1,119	0,588	1,90	2,23
		60,4	1,207	0,653	1,85	1,99
průměr	56,2 ± 3,3	1,12 ± 0,07	0,60 ± 0,04	1,88 ± 0,02	2,1 ± 0,1	
30M	1	74,4	1,488	0,834	1,78	1,51
		87,6	1,751	0,986	1,78	1,48
		80,2	1,604	0,908	1,77	1,44
	průměr	80,7 ± 5,4	1,6 ± 0,1	0,91 ± 0,06	1,78 ± 0,00	1,48 ± 0,03
	2	84,4	1,688	0,928	1,82	1,37
		83,0	1,660	0,912	1,82	1,40
		84,6	1,692	0,932	1,82	1,36
průměr	84,0 ± 0,7	1,68 ± 0,01	0,92 ± 0,01	1,82 ± 0,00	1,38 ± 0,02	

Tab. 22 – pokračování: Hodnoty koncentrace a čistoty DNA izolované z pyré
CTAB protokolem s CaCl₂

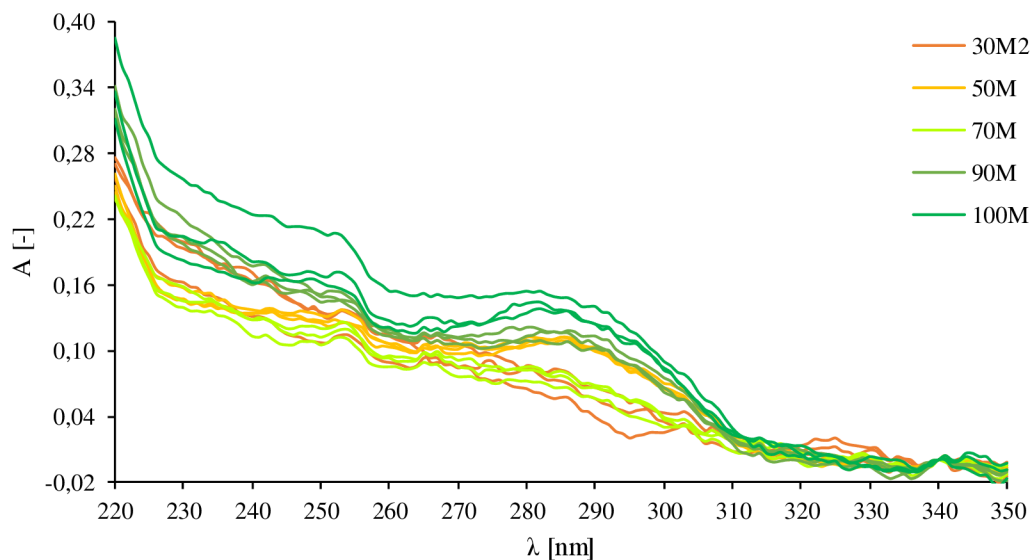
Pyré	Opakování	c [ng·µl ⁻¹]	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	A _{260/230}
50M	1	22,2	0,444	0,244	1,82	1,08
		24,7	0,495	0,267	1,85	1,05
		23,1	0,462	0,248	1,86	1,07
	průměr	23,3 ± 1,0	0,47 ± 0,02	0,25 ± 0,01	1,84 ± 0,02	1,07 ± 0,01
	2	18,1	0,363	0,216	1,68	1,38
		19,5	0,389	0,218	1,78	1,38
		20,8	0,416	0,234	1,78	1,34
	průměr	19,5 ± 1,1	0,39 ± 0,02	0,22 ± 0,01	1,75 ± 0,05	1,37 ± 0,02
70M	1	20,1	0,401	0,256	1,57	0,66
		23,9	0,477	0,276	1,73	0,72
		21,5	0,430	0,246	1,75	0,71
	průměr	21,8 ± 1,6	0,44 ± 0,03	0,26 ± 0,01	1,68 ± 0,08	0,70 ± 0,03
	2	13,8	0,276	0,159	1,74	0,74
		12,0	0,240	0,139	1,73	0,74
		13,0	0,261	0,156	1,67	0,74
	průměr	12,9 ± 0,7	0,26 ± 0,01	0,15 ± 0,01	1,71 ± 0,03	0,74 ± 0,00
90M	1	26,3	0,526	0,287	1,83	0,56
		24,0	0,480	0,262	1,83	0,59
		25,4	0,508	0,282	1,80	0,56
	průměr	25,2 ± 0,9	0,50 ± 0,02	0,28 ± 0,01	1,82 ± 0,01	0,57 ± 0,01
	2	24,8	0,497	0,288	1,72	0,65
		24,5	0,490	0,299	1,64	0,65
		24,4	0,488	0,274	1,78	0,67
	průměr	24,6 ± 0,2	0,49 ± 0,00	0,29 ± 0,01	1,71 ± 0,06	0,66 ± 0,01
100M	1	9,1	0,183	0,124	1,48	0,88
		9,1	0,182	0,120	1,51	1,02
		10,3	0,206	0,128	1,61	1,03
	průměr	9,5 ± 0,6	0,19 ± 0,01	0,12 ± 0,00	1,53 ± 0,06	0,98 ± 0,07
	2	16,0	0,320	0,198	1,62	0,54
		17,4	0,348	0,217	1,60	0,54
		19,4	0,388	0,245	1,59	0,50
	průměr	17,6 ± 1,4	0,35 ± 0,03	0,22 ± 0,02	1,60 ± 0,01	0,53 ± 0,02



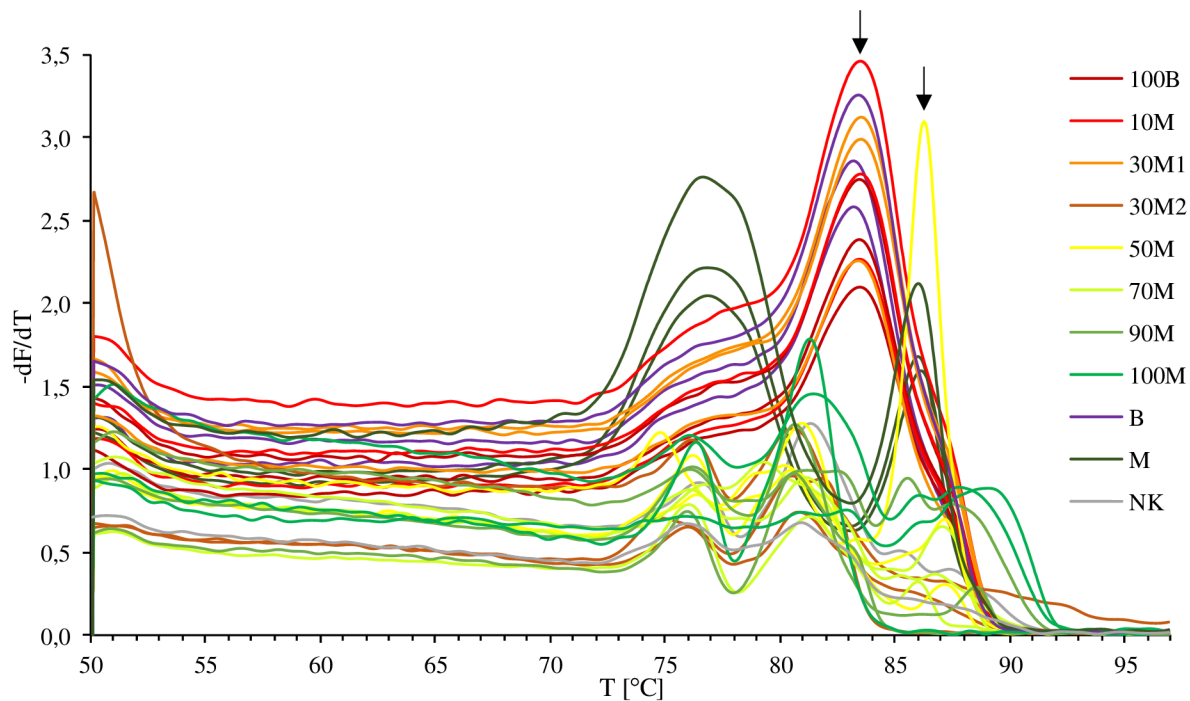
Obr. 48 Absorpční spektra všech vzorků DNA izolované z pyré CTAB protokolem s CaCl_2

Tab. 23 Hodnoty koncentrace a čistoty DNA z pyré po přečištění kitem GenElute

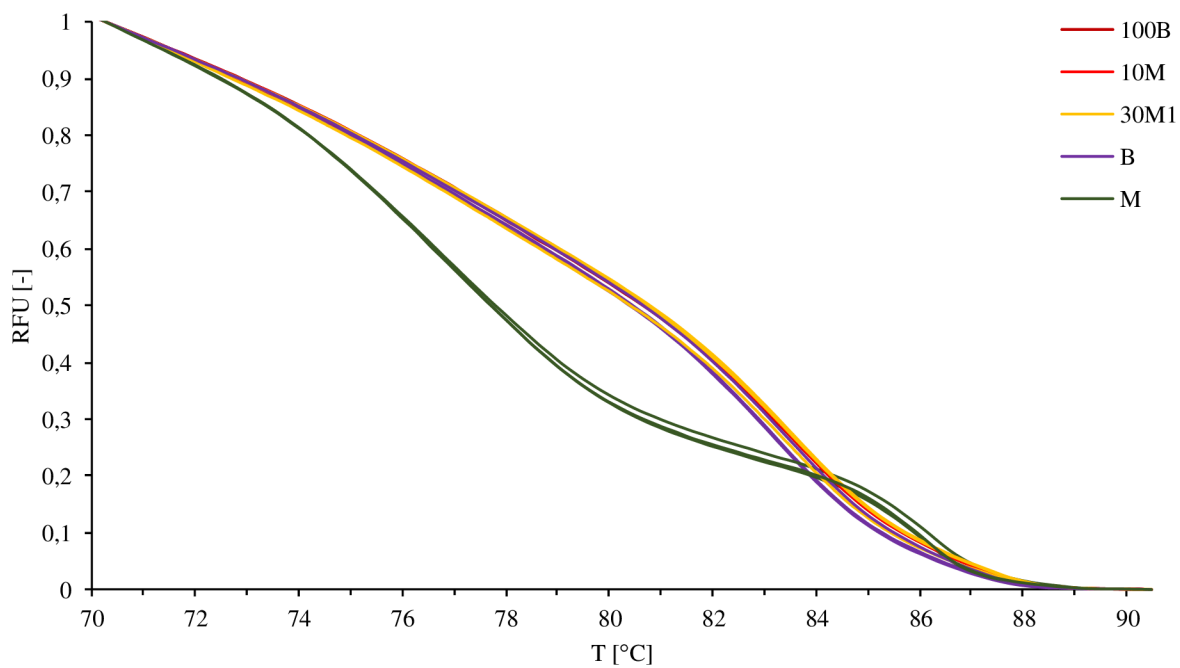
Pyré	c [$\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$]	A_{260}	A_{280}	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
30M2	5,7	0,114	0,086	1,330	0,570
	5,6	0,113	0,084	1,340	0,580
	4,4	0,089	0,065	1,370	0,550
průměr	5,2 ± 0,6	0,11 ± 0,01	0,078 ± 0,009	1,35 ± 0,02	0,57 ± 0,01
50M	5,3	0,106	0,112	0,940	0,720
	5,3	0,106	0,104	1,020	0,670
	5,2	0,103	0,107	0,970	0,710
průměr	5,27 ± 0,05	0,105 ± 0,001	0,108 ± 0,003	0,98 ± 0,03	0,70 ± 0,02
70M	4,2	0,085	0,072	1,190	0,610
	4,8	0,095	0,085	1,120	0,600
	4,6	0,093	0,082	1,130	0,640
průměr	4,5 ± 0,02	0,091 ± 0,004	0,080 ± 0,006	1,15 ± 0,03	0,62 ± 0,02
90M	5,9	0,119	0,109	1,090	0,600
	5,7	0,113	0,121	0,930	0,560
	5,8	0,116	0,113	1,030	0,520
průměr	5,80 ± 0,08	0,116 ± 0,002	0,114 ± 0,005	1,02 ± 0,07	0,56 ± 0,03
100M	7,7	0,154	0,154	1,000	0,600
	6,1	0,121	0,134	0,900	0,670
	6,4	0,127	0,143	0,890	0,620
průměr	6,7 ± 0,7	0,13 ± 0,01	0,144 ± 0,008	0,93 ± 0,05	0,63 ± 0,03



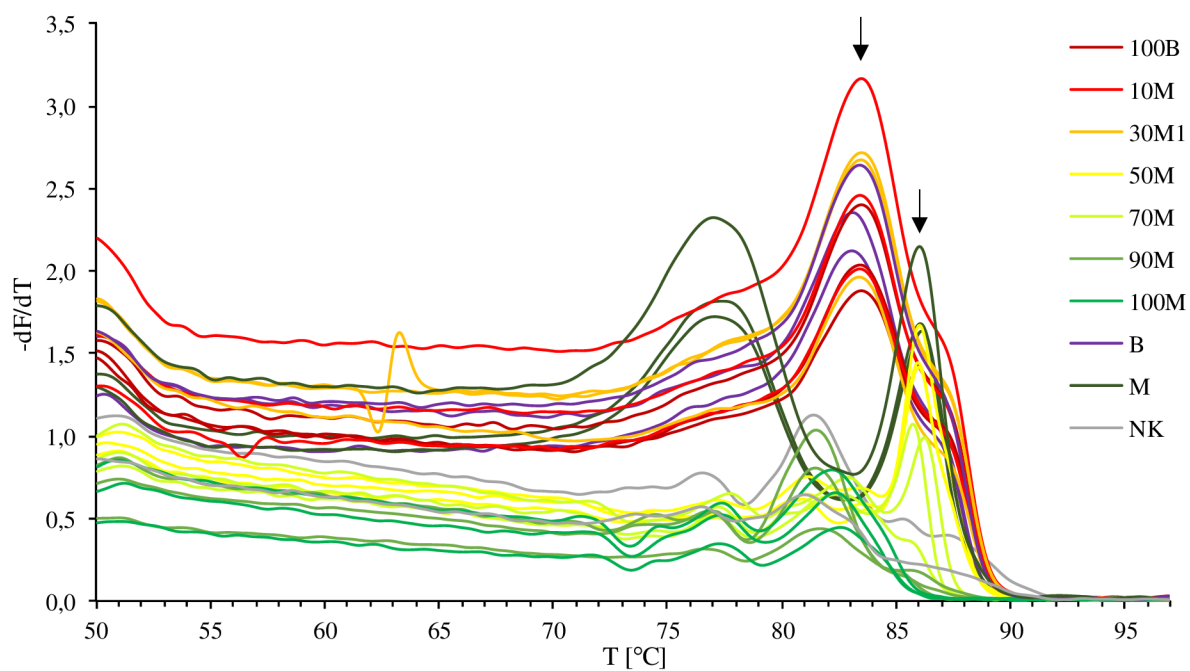
Obr. 49 Absorpční spektra všech vzorků DNA izolované z pyré po přečištění kitem GenElute



Obr. 50 Veškeré derivované křivky tání ampliconů DNA z pyré (100B–30M1 izolováno CTAB protokolem, 30M2–100M izolováno CTAB protokolem a přečištěno kitem GenElute)



Obr. 51 Normalizované křivky tání amplikonů DNA z pyrě (100B–30M1 izolováno CTAB protokolem, 30M2–100M izolováno CTAB protokolem a přečištěno kitem GenElute)



Obr. 52 Veškeré derivované křivky tání amplikonů DNA z pyrě (všechny vzorky izolovány CTAB protokolem)

Tab. 24 Hodnoty skóre podobnosti normalizovaných křivek táni

Pyré	B1	B2	B3	M1	M2	M3	100B1	100B2	100B3	10M1	10M2	10M3	30M1	30M2	30M3	50M1	50M2	50M3	70M1	70M3	
B1	1,0000																				
B2	0,9910	1,0000																			
B3	0,9628	0,9901	1,0000																		
M1	0,4149	0,4914	0,5755	1,0000																	
M2	0,4201	0,4969	0,5812	1,0000	1,0000																
M3	0,5119	0,5926	0,6778	0,9858	0,9873	1,0000															
100B1	0,9993	0,9854	0,9523	0,3946	0,3997	0,4900	1,0000														
100B2	0,9940	0,9707	0,9287	0,3567	0,3615	0,4483	0,9974	1,0000													
100B3	0,9893	0,9613	0,9149	0,3380	0,3427	0,4275	0,9941	0,9993	1,0000												
10M1	0,9991	0,9844	0,9507	0,3916	0,3967	0,4867	1,0000	0,9978	0,9946	1,0000											
10M2	0,9995	0,9949	0,9711	0,4332	0,4385	0,5315	0,9975	0,9899	0,9840	0,9971	1,0000										
10M3	0,9998	0,9883	0,9577	0,4045	0,4097	0,5007	0,9998	0,9959	0,9919	0,9997	0,9987	1,0000									
30M1	0,9983	0,9817	0,9461	0,3837	0,3887	0,4781	0,9998	0,9987	0,9961	0,9999	0,9959	0,9992	1,0000								
30M2	0,9993	0,9853	0,9522	0,3943	0,3994	0,4897	1,0000	0,9974	0,9941	1,0000	0,9975	0,9998	0,9998	1,0000							
30M3	0,9885	0,9998	0,9925	0,5019	0,5075	0,6035	0,9822	0,9663	0,9563	0,9811	0,9929	0,9854	0,9782	0,9821	1,0000						
50M1	0,9356	0,8828	0,8147	0,2392	0,2430	0,3139	0,9477	0,9679	0,9764	0,9494	0,9239	0,9419	0,9539	0,9479	0,8748	1,0000					
50M2	0,9891	0,9608	0,9142	0,3370	0,3417	0,4264	0,9938	0,9992	1,0000	0,9944	0,9837	0,9916	0,9959	0,9939	0,9558	0,9768	1,0000				
50M3	0,9255	0,8700	0,7996	0,2278	0,2315	0,3005	0,9385	0,9605	0,9700	0,9404	0,9131	0,9322	0,9452	0,9387	0,8616	0,9996	0,9704	1,0000			
70M1	0,8574	0,9154	0,9617	0,7424	0,7478	0,8340	0,8393	0,8021	0,7821	0,8365	0,8728	0,8483	0,8290	0,8390	0,9222	0,6552	0,7810	0,6379	1,0000		
70M3	0,7980	0,8655	0,9244	0,8071	0,8120	0,8888	0,7777	0,7370	0,7155	0,7747	0,8154	0,7878	0,7664	0,7775	0,8738	0,5843	0,7144	0,5670	0,9932	1,0000	