



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

**VÝVOJ A OPTIMALIZACE METOD PRO DŮKAZ
VYBRANÝCH DRUHŮ OVOCE V POTRAVINOVÝCH
VÝROBCÍCH**

DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF METHODS FOR DETECTION OF SELECTED FRUIT SPECIES IN
FOODSTUFFS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Katarína Šlosárová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Lenka Fialová

BRNO 2021

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1699/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Katarína Šlosárová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **Ing. Lenka Fialová**

Název bakalářské práce:

Vývoj a optimalizace metod pro důkaz vybraných druhů ovoce v potravinových výrobcích

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše.
2. Výběr a testování vhodných primerů pro detekci vybraných druhů ovoce pomocí PCR.
3. Výběr látek využitelných jako markery při charakterizaci ovocné složky potravin.
4. Charakterizace ovocné složky vybraných potravin pomocí instrumentálních a molekulárně–biologických metod.
5. Vyhodnocení a diskuse výsledků.

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

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

Katarína Šlosárová
student(ka)

Ing. Lenka Fialová
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

V potravinárskom priemysle sa stretávame čoraz častejšie s rôznymi druhmi falšovania potravín. Nie je tomu inak ani u ovocných výrobkov, ktoré sú častým predmetom falšovania. Táto bakalárska práca sa zaoberá dôkazom manga v detských pyré pomocou qPCR a HPLC, a to ako v troch vybraných komerčných výrobkoch, tak aj v ich pripravených replikách.

V rámci molekulárne-biologickej časti práce bolo testovaných päť rôznych párov primerov špecifických pre mango. Na základe priebehu qPCR reakcie, veľkosti amplifikovaného produktu, špecifity a citlivosti bol zvolený pár primerov najvhodnejší pre dôkaz manga v ovocných pyré. Pomocou tohto páru primerov bola preukázaná prítomnosť manga vo všetkých nami analyzovaných vzorkách.

V rámci inštrumentálnej časti práce bola otestovaná rýchlá a jednoduchá metóda extrakcie fenolických látok na ich analýzu pomocou HPLC, ktorá bola už predtým úspešne využitá na inej rastlinnej matrici. Na extrakciu fenolických látok z ovocných pyré za účelom overenia ich autenticity pomocou HPLC sa táto metóda ukázala ako nevhodná [1].

ABSTRACT

Various types of adulteration of food products are becoming more frequent in the food industry than ever. That is no different for fruit products. This bachelor thesis deals with the detection of mango in fruit purées for infants through the use of qPCR and HPLC in three selected commercial products and their prepared replicas.

Within the framework of molecular biology, different primers specific for mango were tested. Several primers, which were the most suitable for the demonstration of mango in fruit purées, were selected based on the course of the qPCR reaction, the size of the amplified product, specificity, and sensitivity. Using these primers, the presence of mango was proven in all six analysed samples.

Regarding the instrumental part of the work, a rapid and simple method of extraction of phenolic compounds for their analysis by HPLC was tested, which has been previously successfully used on another plant matrix. This method was proved to be unsuitable for the extraction of phenolic compounds from fruit purées for the purpose of their authenticity verification using HPLC [1].

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Detské príkrmy, ovocné pyré, mango, izolácia DNA, qPCR, HPLC

KEY WORDS

Baby food, fruit purée, mango, DNA isolation, qPCR, HPLC

ŠLOSÁROVÁ, Katarína. Vývoj a optimalizace metod pro důkaz vybraných druhů ovoce v potravinových výrobcích [online]. Brno, 2021 [cit. 2021-07-27]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131416>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Lenka Fialová.

PREHLÁSENIE

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

POĎAKOVANIE

Moje poďakovanie patrí vedúcej bakalárskej práce Ing. Lenke Fialovej za jej ochotu, trpezlivosť a cenné rady pri tvorbe práce. Touto cestou by som sa chcela poďakovať aj svojej rodine, ktorá ma podporuje počas celého štúdia.

OBSAH

| | | |
|----------|-------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | ÚVOD | 7 |
| 2 | TEORETICKÁ ČASŤ | 8 |
| 2.1 | Falšovanie potravín | 8 |
| 2.1.1 | Metódy detekcie falšovania | 8 |
| 2.2 | Ovocné kojenecké výživy | 8 |
| 2.2.1 | Zloženie | 8 |
| 2.2.2 | Technológia výroby | 9 |
| 2.3 | Mango | 9 |
| 2.3.1 | Pôvod a výskyt | 9 |
| 2.3.2 | Chemické zloženie | 10 |
| 2.3.3 | Účinky na zdravie a využitie | 11 |
| 2.4 | Rastlinné orgány | 11 |
| 2.4.1 | Anatomická stavba listov | 12 |
| 2.4.2 | Anatomická stavba plodov | 12 |
| 2.5 | DNA | 13 |
| 2.5.1 | Štruktúra a výskyt v eukaryotickej bunke | 13 |
| 2.5.2 | Izolácia DNA | 14 |
| 2.5.3 | Spektrofotometrické stanovenie čistoty a koncentrácie | 15 |
| 2.6 | Polymerázová reťazová reakcia | 15 |
| 2.6.1 | Princíp metódy | 15 |
| 2.6.2 | Komponenty | 16 |
| 2.6.3 | Real-time PCR | 16 |
| 2.6.4 | HRM analýza | 17 |
| 2.6.5 | Praktické využitie | 17 |
| 2.7 | Agarózová gélová elektroforéza | 17 |
| 2.7.1 | Separácia nukleových kyselín | 17 |
| 2.7.2 | Vizualizácia DNA na géle | 18 |
| 2.8 | HPLC | 18 |
| 2.8.1 | Princíp metódy | 18 |
| 2.8.2 | Inštrumentácia | 19 |
| 2.8.3 | Využitie v praxi | 19 |
| 3 | CIEĽ PRÁCE | 20 |
| 4 | EXPERIMENTÁLNA ČASŤ | 21 |
| 4.1 | Rastlinný materiál | 21 |
| 4.1.1 | Komerčné výrobky | 21 |
| 4.1.2 | Modelové zmesi | 23 |
| 4.2 | Vybavenie laboratória | 23 |
| 4.2.1 | Chemikálie | 23 |
| 4.2.2 | Prístroje a pomôcky | 23 |

| | | |
|----------|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.3 | Metódy | 24 |
| 4.3.1 | Izolácia DNA..... | 24 |
| 4.3.2 | Meranie koncentrácie a čistoty DNA | 25 |
| 4.3.3 | PCR | 25 |
| 4.3.4 | Agarózová gélová elektroforéza..... | 27 |
| 4.3.5 | HPLC..... | 27 |
| 5 | VÝSLEDKY A DISKUSIA | 28 |
| 5.1 | Plod manga | 28 |
| 5.1.1 | Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty izolovanej DNA | 28 |
| 5.1.2 | Overenie amplifikovateľnosti..... | 29 |
| 5.1.3 | Výber špecifických primerov | 31 |
| 5.1.4 | Optimalizácia koncentrácie primerov..... | 35 |
| 5.2 | Komerčné výrobky | 39 |
| 5.2.1 | Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty izolovanej DNA | 39 |
| 5.2.2 | Overenie amplifikovateľnosti..... | 40 |
| 5.2.3 | Dôkaz prítomnosti manga..... | 42 |
| 5.2.4 | HPLC..... | 44 |
| 5.3 | Modelové zmesi | 45 |
| 5.3.1 | Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty izolovanej DNA | 45 |
| 5.3.2 | Overenie amplifikovateľnosti..... | 46 |
| 5.3.3 | Dôkaz prítomnosti manga..... | 48 |
| 5.3.4 | HPLC..... | 51 |
| 6 | ZÁVER..... | 52 |
| 7 | ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV | 53 |
| 8 | ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV | 58 |

1 ÚVOD

S falšovaním potravín prichádzame do kontaktu nielen v dnešnej modernej dobe, je dlhoročným neslávny problémom už stáročia. Ovocné produkty, konkrétne pyré, šťavy a džemy sú veľmi častou komoditou, ktorá podlieha falšovaniu. Dôvodom sú vysoké nároky spotrebiteľov na kvalitu daného ovocného výrobku v kombinácii s priaznivou cenou. To výrobcov vedie napr. k zmiešaniu ovocia vyššej ceny s lacnejším ovocím či k nesplneniu stanovovaného obsahu ovocia vo výrobku. V praxi je veľmi náročné odhaliť oba spomínané typy falšovania, a to kvôli špecifite samotných výrobkov ako aj rôznorodosti látok obsiahnutých v ovocí [2, 3].

Mango je jedným z druhov ovocia, ktoré býva často falšované vyššie uvedenými spôsobmi. Zaradujeme ho k exotickým plodinám, čo prispieva ku sklonom k falšovaniu, keďže v tunajších oblastiach nie je pestované a jeho cena je vyššia. Výskyt manga v ovocných detských pyré je čoraz častejší pre jeho prirodzene sladkú chuť a vysoký obsah vitamínu C. Práve strava kojencov je prísne sledovaná a je dôležité dbať na jej kvalitu [4, 5].

Akosť potravín je možné sledovať pomocou molekulárne-biologických a inštrumentálnych metód. V prípade ovocných pyré ale analýzu sťažuje fakt, že sa jedná o komplexnú maticu, ktorá bola ešte navyše tepelne a mechanicky spracovaná a tým pádom mohlo dôjsť k degradácii/zníženiu obsahu látok, ktoré sú jednotlivými metódami sledované.

V rámci tejto práce bola zvolená jedna molekulárne-biologická a jedna inštrumentálna metóda na dôkaz prítomnosti manga v detských príkrmoch. Bolo zisťované, či je niektorá z týchto dvoch metód dostatočne citlivá na to, aby vyššie zmienený problém (degradáciu príslušných analytov) prekonala.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Falšovanie potravín

Už v starovekom Ríme boli lieky, kozmetika či predovšetkým potraviny často predmetom falšovania v rôznych formách. Pretože sa s potravinami a iným prírodným tovarom obchodovalo po celej Rímskej ríši, boli náchylné na znehodnotenie počas prepravy a skladovania. Bežnými metódami falšovania teda boli miešanie pokazených potravín s čerstvými potravinami, zámena lacných miestnych výrobkov za drahé výrobky zo zahraničia alebo podvodné zavedenie farbiacich či maskovacích prísad [6].

Aj dnes sa môžeme stretnúť so všetkými týmito metódami falšovania, pridáva sa k nim aj použitie inej než deklarovanej technológie, nesprávne uvedenie miesta pôvodu, taktiež maskovanie nedodržania pôvodnej receptúry. Medzi najčastejšie falšované potraviny patria luxusné a kritické komodity (korenie, liehoviny), potraviny predávané vo väčších množstvách (mliečne výrobky, výrobky z ovocia a zeleniny, tuky a oleje), taktiež aj doplnky stravy, ktoré sa mylne vydávajú za liečivé [2, 7].

2.1.1 Metódy detekcie falšovania

Okrem klasickej chemickej analýzy sa dnes stretávame čoraz viac s postupmi výkonnej inštrumentálnej analýzy v súvislosti s odhalením falšovania potravín.

Medzi najčastejšie metódy patria:

- izotopová analýza využívaná napr. pre kontrolu pravosti alkoholových výrobkov
- spektrometria so širokým využitím u rôznych potravinových druhov pre určenie nielen majoritných zložiek
- kombinované metódy, predovšetkým spojenie hmotnostnej spektrometrie so separačnými technikami, ktoré umožňujú detailnú charakteristiku výrobku aj s určením sekundárnych metabolitov u rastlinných výrobkov
- finger print metóda, ktorá je schopná pomocou chemometrických postupov určiť pôvod potravinárskych surovín
- DNA analýza, ktorá napr. dokáže identifikovať druh ovocia/zeleniny [7, 8]

2.2 Ovocné kojenecké výživy

2.2.1 Zloženie

2.2.1.1 Ovocie

Ovocie hrá vo výžive človeka veľmi dôležitú úlohu tým, že poskytuje doplnkové zdroje energie, potrebné rastové faktory, sacharidy, vlákninu a antioxidanty, ktoré sú nevyhnutné pre udržanie zdravia. Práve preto je hlavnou surovinou pre výrobu ovocných kojeneckých výživ, ktoré sa pre kojencov stávajú prírodným zdrojom vitamínov a minerálov [9, 10].

Najčastejšie spracovávanou surovinou pri výrobe výživ sú jablká, hrušky, banány, marhule, jahody, broskyne, maliny, slivky a čučoriedky [10].

2.2.1.2 Voda

Obzvlášť voda používaná k výrobe produktov určených pre kojencov a malé deti je neustále monitorovaná, mikrobiologicky testovaná a pri spracovaní preváraná. Do roku 2004 bol hlavným kritériom u kojeneckej vody obsah dusičnanov, ktorý nesmel presahovať hodnotu $15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Z tohto nariadenia sa neskôr upustilo, čím sa aj pitná voda (s obsahom dusičnanov do $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) stáva vhodná, avšak nutné je dbať na doporučené množstvá iných prirodzených súčastí, ktoré sú v nej obsiahnuté (napr. chloridy, fluoridy, sírany) [9, 11].

2.2.1.3 Prídavné látky

Prídavné látky (aditíva) sú zlúčeniny alebo zmesi, ktoré sa pridávajú do potravín s cieľom zvýšiť ich kvalitu, konkr. predĺžiť trvanlivosť, zlepšiť chuť, farbu, vôňu alebo výživovú hodnotu [12].

Medzi najviac využívané aditíva v detských výživách patria:

- kukuričný modifikovaný škrob alebo ryžová múka, ktoré sa využívajú na zahustenie a neobsahujú lepok
- kyselina L-askorbová (E 300, vitamín C), antioxidant, pridávaná na predĺženie trvanlivosti potlačením oxidácie vyvolávajúcej nechcené zmeny
- kyselina citrónová (E 330), regulátor kyslosti, pôsobí aj ako stabilizátor farby
- fruktózový sirup, prídavné sladidlo, obsahuje fruktózu, glukózu a maltózu
- koncentrát z čiernej mrkvy, prírodné farbivo do výživ z červeného ovocia [12, 3]

2.2.2 Technológia výroby

Proces výroby kojeneckých výživ začína výberom ovocia, ktoré je po zbere nutné po určitú dobu skladovať. Pri skladovaní je hlavnou snahou utlmenie metabolizmu, a tým aj zníženie enzýmovej aktivity [14].

Po skladovaní nasledujú prípravné procesy. Tie zahŕňujú triedenie ovocia podľa jeho vonkajších znakov a tiež mokré čistenie – pranie, ktorým sa surovina zbavuje hlíny, prachu a iných mechanických nečistôt. Po praní je niektoré druhy ovocia potrebné odkôstkovať, odstopkovať a olúpať. Posledným prípravným procesom je rezanie, ktoré je vykonávané strojovo (rezačkami) [10].

Do skupiny vlastného spracovania ovocia zaraďujeme viaceré operácie. Prvou z nich je blanširovanie, inak povedané predvarenie. Ide o krátky ohrev suroviny, ktorého cieľom je zbavenie sa nechcených pachov a mikrobiálnej kontaminácie. Hlavnou podstatou je však inaktivácia oxidoredukčných enzýmov, čím sa zabráni enzýmovému hnednutiu. Inaktivácia enzýmov je završená v procese rozvárania. Po tepelnom spracovaní sa ovocie pasíruje a homogenizuje na základe požiadavok jednotlivých druhov detských výživ podľa veku dieťaťa [10, 14].

Hotový produkt je dávkovaný do sklenených nádob so širokým hrdlom. Účelom balenia je predovšetkým ochrana tovaru pred znehodnotením vonkajšími vplyvmi, a to pri skladovaní, preprave a distribúcii. Pri samotnom plnení je vždy nutné dodržiavať zásady aseptického práce. Nádoby sa uzatvárajú v parnom alebo vákuovom priestore. Posledným krokom technológie výroby je sterilizácia, teda tepelné zakonzervovanie. [14, 15].

2.3 Mango

Mango je tropická plodina rastúca na strome – mangovníku. Predpokladá sa, že existuje takmer 1000 rôznych odrôd líšiacich sa predovšetkým v morfológických znakoch. Mangovníky dosahujú výšku približne 30 metrov, majú guľovitú korunu s veľkými listami. Samotný plod váži do 1 kg, má oválny tvar s plochou kôstkou uprostred, ktorá je od dužiny ťažko oddeliteľná. Šupa má zelenú, miestami jemne načervenalú farbu, dužina je vláčna, šťavnatá, žltej až oranžovej farby [16, 17].

2.3.1 Pôvod a výskyt

Mangovník (*Mangifera indica*) pochádza z Indie, kde bol známy už 2000 rokov pr. n. l. Do zvyšku sveta ho doviezli portugalskí a španielski moreplavci pri svojich objaviteľských plavbách. Dnes sa pestuje vo väčšine tropických krajín a je tam dôležitou súčasťou stravy, vo všeobecnosti hneď po banánoch. Na Filipínach a Jáve sa dokonca okrem plodov využívajú aj jemné lístky mangovníka ako náhrada zeleniny. Konkrétne do Českej republiky je mango najčastejšie dovážané z Indie, iných ázijských krajín a Kalifornie [4, 16, 17].

2.3.2 Chemické zloženie

Dozretý plod manga obsahuje približne až 82 % vody, čo zapríčiňuje vysokú šťavnatosť tohto ovocia. Percentuálne druhé sú zastúpené sacharidy, ich podiel tvorí cca 15 %. Práve vysoký obsah sacharidov odzrkadľuje aj vysokú hodnotu kilokalórií (Tabuľka 1), kvôli čomu mango nemožno zaradiť k diétnemu ovociu. Vlákna predstavuje asi 1,8 %, minerálne látky 0,3 % [5, 16, 17].

Tabuľka 1: Látkové zloženie manga [5]

| Živina | Hodnota na 100 g dužiny |
|----------------|-------------------------|
| Voda (g) | 81,71 |
| Energia (kcal) | 65 |
| Tuky (g) | 0,27 |
| Proteíny (g) | 0,51 |
| Sacharidy (g) | 14,8 |
| Vlákna (g) | 1,8 |

Mango spomedzi u nás komerčne dostupných druhov ovocia obsahuje najväčší podiel karotenoidov, z ktorých si telo vyrába vitamín A. Karotenoidy spôsobujú žltu-oranžovú farbu dužiny, najviac je z nich zastúpený β -karotén. Mango je tiež veľmi bohaté na vitamín C. Hmotnostný obsah vitamínu C závisí od danej odrody, všeobecne sa tiež počas dozrievania plodu mení. V počiatočných štádiách rastu je takmer trikrát vyšší ako u dozretého plodu. Vysoký je aj obsah vitamínov zo skupiny B, predovšetkým niacínu a kyseliny pantoténovej (Tabuľka 2) [4, 5].

Tabuľka 2: Súhrn najzastúpanejších vitamínov a karotenoidov v mango [5]

| Vitamíny a karotenoidy | Hodnota na 100 g dužiny |
|--------------------------------------------|-------------------------|
| Vitamín C (mg) | 27,7 |
| Vitamín E (mg) | 1,12 |
| B ₁ – tiamín (mg) | 0,058 |
| B ₂ – riboflavín (mg) | 0,057 |
| B ₃ – niacín (mg) | 0,584 |
| B ₆ – piridoxín (mg) | 0,134 |
| B ₉ – kyselina pantoténová (mg) | 0,160 |
| β -karotén (μ g) | 445 |
| α -karotén (μ g) | 17 |

Z minerálnych látok v ňom nájdeme predovšetkým draslík a fosfor. Okrem nich a iných minerálov (Tabuľka 3) vyniká obsahom vzácneho stopového prvku – selénu. Typickú vôňu mango nedáva jedna konkrétna zlúčenina. Podieľa sa na nej kolektívny účinok viacerých prchavých látok z rôznych chemických tried, ako sú aldehydy, ketóny, estery, alkoholy, zlúčeniny laktónov a terpénov [5, 9, 17].

Tabuľka 3: Súhrn najzastúpenejších minerálov v mangu [5]

| Minerály | Hodnota na 100 g dužiny |
|--------------|-------------------------|
| Draslík (mg) | 156 |
| Fosfor (mg) | 11 |
| Horčík (mg) | 9 |
| Vápnik (mg) | 10 |
| Zinok (mg) | 0,04 |
| Selén (µg) | 0,6 |

2.3.3 Účinky na zdravie a využitie

Liečivé účinky manga sa odrážajú z jeho chemického zloženia. Vysoký obsah β -karoténov a vitamínu C spôsobuje, že mango má protirakovinové účinky. Vitamín C a vitamín A (ktorého provitamínom je spomínaný beta-karotén) sú antioxidanty, ktoré v tele dokážu zachytávať voľné radikály spôsobujúce rakovinu. Okrem toho pôsobia aj ako prevencia pred vznikom kardiovaskulárnych ochorení. Spolu s vitamínom E chránia pokožku pred ultrafialovým žiarením a potláčajú jej starnutie. Samostatne, vitamín C pomáha udržiavať imunitný systém, čo výrazne podporuje obranyschopnosť organizmu. Vitamín A zasa podporuje dobrý zrak a zabraňuje jeho možným ochoreniam, ako je napríklad šeroslepota. Vitamíny skupiny B v tele vystupujú ako koenzými, bez ktorých by nebola umožnená správna funkcia enzýmov. Okrem toho pôsobí napríklad vitamín B₃ priaznivo na nervový systém, vitamín B₆ na ženský reprodukčný systém, vitamín B₉ zasa zabezpečuje zdravý spánok. Z minerálnych látok prevláda draslík, ktorý spoločne s horčíkom predchádzajú riziku vzniku srdčného infarktu. Taktiež aj obsah vlákniny napomáha v boji s tráviacimi ťažkosťami. Mango však môže vyvolať aj alergickú reakciu vo forme kožnej vyrážky, ako alergén bola identifikovaná chemická látka 3-pentadecylkatechol [17, 18, 19].

Mango sa využíva predovšetkým v potravinárskom priemysle, veľmi často je konzumované v surovom stave. Bez tepelných úprav sa pridáva do dezertov, ovocných šalátov alebo jogurtov. Pre svoju sladkú a zároveň sviežu chuť je obľúbenou prísadou ovocných smoothie. Vyrábajú sa z neho džúsy, kokteily, taktiež aj alkohol. Varené je vhodné k rybám a mäsu, najviac sa s ním stretávame v indickej kuchyni. Vďaka vysokému obsahu vitamínov A, E a tiež vitamínu B₉ svoje uplatnenie našlo aj v kozmetológii. Je vhodné ako prídavok do vlasovej kozmetiky či pleťových masiek, prípadne aj na ich domácu prípravu zo surovej dužiny plodu [16, 18].

2.4 Rastlinné orgány

Rastlinné orgány je možné rozdeliť do dvoch skupín – vegetatívne a generatívne orgány. Funkciou vegetatívnych orgánov je udržanie života jedinca, lebo zaisťujú rast a výživu. Zaraďujeme tu koreň, stonku a listy, pričom každý z týchto orgánov sa svojou výnimočnou funkciou podieľa na existencii rastliny. Samotné orgány danú funkciu nadobúdajú vďaka špecializovaným pletivám, z ktorých pozostávajú, je to napr. pletivo zásobné (koreň), vodivé (stonka) či asimilačné (listy). Generatívne (reprodukčné) orgány zabezpečujú pohlavné rozmnožovanie, čím je zachovávaná fylogénzia druhov rastlín. Ku generatívnym orgánom patria kvety a plody [20].

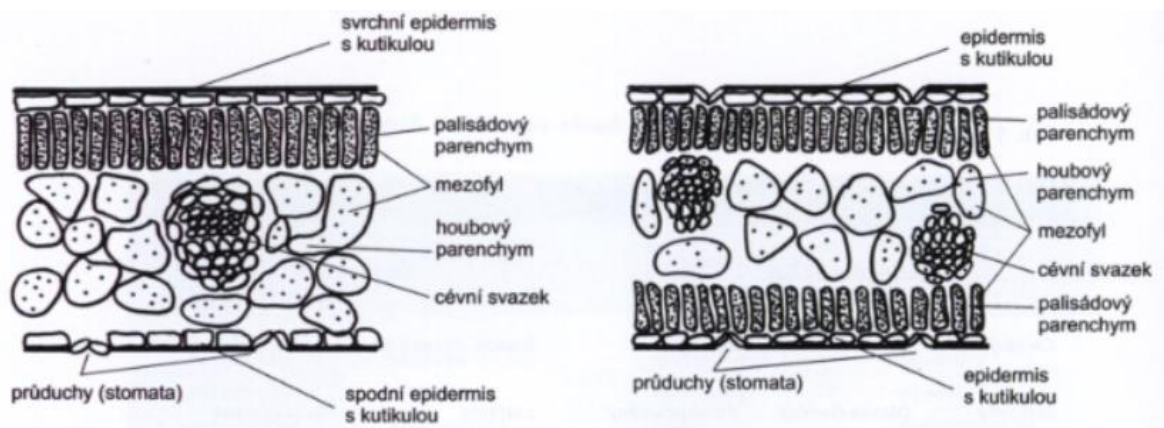
Pre účely izolácie DNA z rastlinného materiálu sú predovšetkým vďaka jednoduchosti manipulácie a samotnej izolácie najviac využívané listy a plody [21].

2.4.1 Anatomická stavba listov

List je autonómny orgán rastliny, keďže v ňom prebieha proces fotosyntézy. Jeho základnou funkciou je zabezpečiť výmenu plynov medzi vnútorným prostredím listu a okolím [22].

Anatomicky list pozostáva z troch druhov pletív:

- Krycie pletivá sa nachádzajú na povrchu a vytvárajú pokožku. Vonkajšie bunky pokožky bývajú impregnované kutínom, ktorý spolu s voskom vytvára ochrannú vrstvu kutikulu. Okrem nej na povrchu nájdeme aj prieduchy, ktorých úlohou je spomínaná výmena plynov. Najbežnejším typom listu je tzv. bifaciálny, ktorý má rozdielne vyvinutú vrchnú a spodnú časť čepele. Vrchná časť disponuje hrubšou vrstvou kutikuly, na spodnej sú zasa častejšie prieduchy (Obrázok 1 vľavo) [21, 23].
- Základné asimilačné pletivá vyplňajú vnútro listu nazývané mezofyl. Palisádový parenchým je tvorený viacerými vrstvami pretiahnutých buniek bez intercelulár, ktoré obsahujú veľké množstvo chloroplastov a slúžia predovšetkým k fotosyntéze. Hubový parenchým je tvorený bunkami rôznych tvarov, medzibunkový priestor je výrazný, je chudobnejší na chloroplasty a jeho funkcia je predovšetkým transpiračná [23, 24].
- Vodivostné pletivá tvoria základ cievnych zväzkov vyskytujúcich sa v mezofyle. V liste vystupujú ako žilnatina [20].

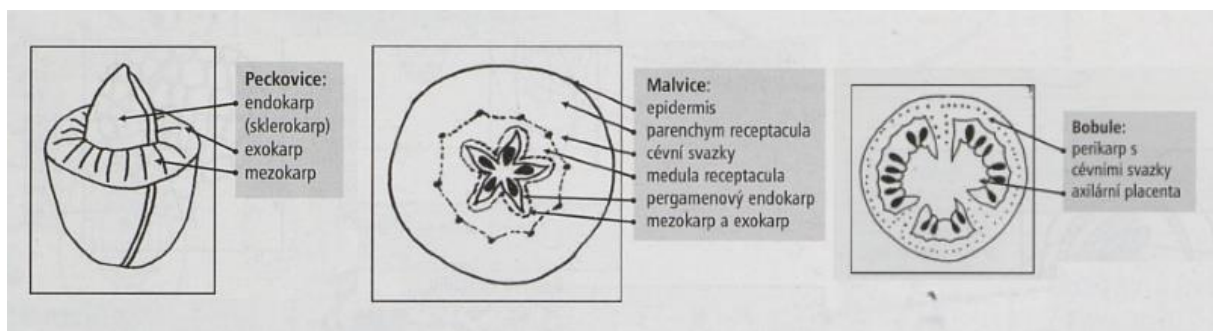


Obrázok 1: Anatomická stavba bifaciálneho (vľavo) a monofaciálneho listu [22]

2.4.2 Anatomická stavba plodov

Plod vzniká buď zo semenníka, celého piestika, alebo poprípadne aj iných kvetných častí v priebehu premeny vajíčok na semená. Funkcia plodu spočíva v ochrane semien, či už pri zrení, alebo ich následnom šírení. Pri zrení plodu sa uskutočňuje premena pletív plodolistu v oplodie, tzv. perikarp. Ten je diferencovaný na vonkajší exokarp, stredný mezokarp a vnútorný endokarp [25, 26].

Medzi hlavné kritérium pre klasifikáciu plodov patrí delenie podľa typu oplodia na suché a dužinaté plody. O suché plody sa jedná, ak sú všetky vrstvy v oplodí za zrelosti suché. Do tejto skupiny patrí napr. lusk, nažka, tobolka, šesťka či oriešok. Naopak plody dužinaté majú buď exokarp alebo predovšetkým mezokarp zdužnatý. Troma typickými skupinami patriacimi medzi dužinaté plody sú kôstkovice, malvice a bobule. Kôstkovice majú plod s blanitým exokarpom, dužinatým mezokarpom a sklerenchymatickým endokarpom, napr. plody kávovníku, olivovníku, mangovníku, čerešne a marhule. U malvíc, narozdiel od kôstkovic, vytvárajú steny spodných semenníkov jadriec. Malvice sú typickým súplodím jabloní a hrušiek. Bobule majú jednosemenný alebo viacsemenný plod s mäsitým oplodím rozšíreným na vonkajší blanitý a vnútorný dužinatý epikarp [25, 26].



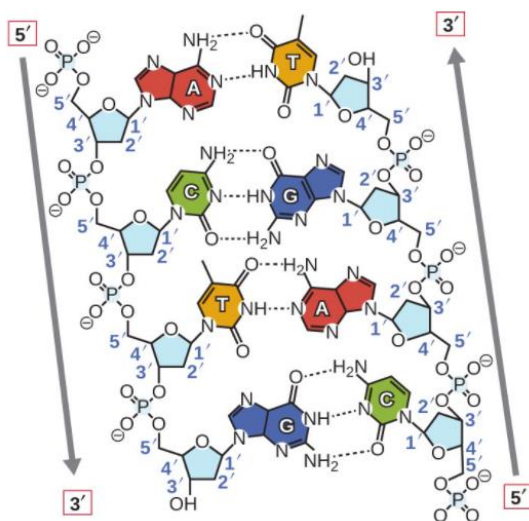
Obrázok 2: Typy dužinatých plodov [25]

2.5 DNA

2.5.1 Štruktúra a výskyt v eukaryotickej bunke

Štruktúra DNA aj spolu s jej replikačnými mechanizmami bola v roku 1953 prvýkrát uverejnená v časopise Nature. Jej model poskytol odpoveď na mnohé, predtým nevyriešené otázky týkajúce sa genetiky. Za jej objaviteľov sú považovaní traja muži, a to F. Crick, J. D. Watson a M. Wilkinson, ktorí sú od roku 1962 tiež nositeľmi Nobelovej ceny za fyziológiu alebo medicínu. V objasňovaní štruktúry DNA bola ale prelomová RTG snímka, ktorú vytvorila E. Franklinová, jej práca bola však ohodnotená len ako pomocná [27, 28].

U DNA je z hľadiska primárnej štruktúry predovšetkým podstatné poznať jej tri základné zložky. Sú nimi dusíkaté bázy purínového (adenín a guanín) či pyrimidínového (cytozín, tymín) charakteru, fosfátová skupina a cukor 2-deoxy-D-ribóza. Spojenie týchto troch jednotlivých komponentov vytvára základnú stavebnú jednotku DNA, ktorú nazývame nukleotid. Nukleotidy sú vzájomne pospájané fosfodiesterovými väzbami za tvorby polynukleotidu. Polynukleotid má dva odlišné konce – na konci označovanom 3' je vlákno ukončené hydroxylovou skupinou, na konci 5' je vlákno ukončené fosfátom. Dve opačne orientované polynukleotidové vlákna sú spojené vďaka vodíkovým mostíkom vždy medzi purínovou a pyrimidínovou bázou, konkr. tymín s adenínom sa viažu dvoma vodíkovými väzbami, cytozín s guanínom troma. Spojené vlákna v priestore tvoria pravotočivú dvojitú skrútkovicu nazývanú α -helix, čo označujeme ako sekundárnu štruktúru DNA [29].



Obrázok 3: Chemické zložky a väzby v štruktúre DNA [30]

Lokalizácia DNA závisí od typu danej bunky – eukaryotická či prokaryotická bunka. U živočíšnych eukaryotických buniek sa DNA nachádza v jadre a v mitochondriách. V rastlinnej bunke okrem toho ešte v plastidoch. Práve odlišná lokalizácia a tiež veľkosť nukleovej kyseliny boli príčinou vyvinutia rôznych spôsobov izolácie DNA, nehovoriac aj o rozličnosti stavby samotných typov buniek [27].

2.5.2 Izolácia DNA

Izolácia a purifikácia nukleových kyselín je vstupným procesom u väčšiny molekulárnych metód. Samotnú metódu izolácie a tiež purifikácie vyberáme na základe účelu, pre ktorý je analýza vykonávaná. Požiadavky sú kladené predovšetkým na množstvo, integritu a stupeň čistoty nukleovej kyseliny. V prípade rastlinných genómov je kľúčová čistota a výťažnosť získaných izolovaných nukleových kyselín, ktoré vedú do značnej miery ovplyvniť výsledky následných krokov analýzy [21, 31].

2.5.2.1 Homogenizácia materiálu a lýza buniek

Prvým a základným predpokladom pre izoláciu DNA je jej sprístupnenie. Pri práci s rastlinným materiálom je pred samotnou lýzou buniek nutná homogenizácia, keďže sa jedná o komplexnejšie vzorky pletív. Medzi typické príklady homogenizácie patrí napr. rozotieranie v tretej miske spolu s morským pieskom alebo drvenie v tekutom dusíku. Tieto mechanické postupy homogenizácie napomáhajú aj samotnej lýze, ktorej podstatou je narušenie povrchu bunky, a teda uvoľnenie vnútrobunkového materiálu. Práve u rastlinnej bunky sa najčastejšie stretávame s kombináciou mechanickej dezintegrácie spolu s pôsobením dezintegračných enzýmov, konkr. celulóza a hemicelulóza. Dôvodom je prítomnosť bunkovej steny, ktorá proces komplikuje, jemnejšie metódy sú preto v tomto prípade neefektívne (napr. u živočíšnych buniek je postačujúce pôsobenie neiontových detergentov) [21, 31, 32].

Lýza buniek sa uskutočňuje v pufrí obsahujúcom chelatačné činidlo, ideálne aj v chlade. Obe tieto podmienky zabezpečujú inaktiváciu nukleáz, konkr. DNáz – enzýmov, ktoré narušujú štruktúru DNA a tým ju degradujú. Ako chelatačné činidlo sa najčastejšie používa kyselina etylendiaminotetraoctová (EDTA), poprípade citrónan sodný. Podstatou je zachytávanie dvojmocných kationov, hlavne horčíka, ktoré pôsobia ako kofaktory nukleáz, v ich neprítomnosti sú teda nukleázy neaktívne a nedochádza k nechcenej degradácii nukleovej kyseliny. Tlmivý roztok obsahuje aj detergenty, ktoré napomáhajú samotnej lýze a narušujú membránové povrchy, napr. SDS (dodecylsulfát sodný) [32, 33].

2.5.2.2 Oddelenie a purifikácia DNA

Spolu s DNA sa pri lýze buniek uvoľnia aj ostatné vnútrobunkové komponenty, ktoré sú pri následných analýzách nežiadúce. Vzniká tak komplexná zmes kontaminantov – RNA, polysacharidov, proteínov, fenolických a iných nízkomolekulárnych látok. Cieľom purifikačných procesov je zbavenie sa týchto zložiek so ziskom DNA v čo najvyššej možnej čistote [31].

Klasicky sa ako prvý krok uplatňuje nízkoobrátková centrifugácia, ktorá zo zmesi oddelí nerozpustné bunkové časti [32].

RNA je zo zmesi odstránená pôsobením RNáz (degradačných enzýmov), ktoré sú do zmesi pridávané, sú to tzv. komerčné RNázy, napr. RNáza A. Pre aktivitu týchto enzýmov nie je nutná prítomnosť dvojmocných kationov, preto pri aplikácii EDTA nepodliehajú inaktivácii, narozdiel od DNáz [33].

Polysacharidy sú hlavnými interferentmi v postupe izolácie DNA, pretože napodobňujú správanie DNA a tým sú ťažko odstrániteľné. Vhodné na ich odstránenie je napr. použitie vysokej koncentrácie (viac ako 0,5 M) NaCl, poprípade aj v kombinácii s kationovým detergentom cetrimoniumbromidom (CTAB). Jednoduchým a efektívnym spôsobom je tiež zriedenie DNA extraktov či premytie homogenátu extrakčným pufrím kvôli zníženiu polysacharidovej kontaminácie [34].

Existuje viacero spôsobov, ako možno odstrániť proteíny. Jednou z nich je využitie proteáz, t. j. enzýmov degradujúcich bielkovinovú štruktúru, sú nimi napr. proteináza K alebo E. Hojne používaným postupom je aj extrakcia zmesou organických látok – fenolu a chloroformu. Tieto látky po zmiešaní s vodným roztokom nukleových kyselín vytvoria dve vrstvy (fázy). Na ich rozhraní dochádza k denaturácii bielkovín za vytvorenia ich zrazeniny, ktorú je možno odstrániť centrifugáciou [27].

Polyfenoly sú typovo extrémne variabilné látky. Pri spektrofotometrickom stanovení čistoty DNA značne skresľujú výsledok (znižujú hodnotu pomeru $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$). Do tejto skupiny patria napr. flavonoidy a terpenoidy. Antioxidanty ako polyvinylpyrolidón (PVP), polyvinylpolypyrrolidón (PVPP) a β -merkaptotanol sú najčastejšie využívané chemikálie na ich elimináciu [34].

Okrem vyššie popísaných kontaminantov sa v niektorých aplikáciách molekulárnej biológie považujú za nežiadúce aj mitochondriálna a plastidová DNA, konkr. u rastlín je hlavným problémom DNA chloroplastov. Na riešenie tohto problému je možné jadrá izolovať pred extrakciou, čím minimalizujeme kontamináciu v dôsledku vysokých hladín polysacharidov a polyfenolov v bunkách. Kľúčové je pri homogenizácii materiálu použitie tlmivého roztoku s detergentom Triton X-100, ktorý dokáže špecificky lyzovať chloroplasty a mitochondrie, pričom jadrá ostávajú nepoškodené [34].

Po extrakcii fenolom je roztok príliš zriedený a obsahuje stopy samotného fenolu a chloroformu, ktoré môžu negatívne ovplyvniť výsledky nasledujúcich meraní. Z prečisteného vodného roztoku je možné DNA vyzrážať pridaním etanolu (popr. izopropanolu) pri nízkych teplotách v prostredí jednomocných kationov. Vyzrážaná DNA sa od roztoku oddelí centrifugáciou a uskladňuje v TE pufri. Pri krátkodobom uskladnení postačujú teploty 4–8 °C, po dobu niekoľkých mesiacov je nutné uskladnenie pri -20 °C [31, 34].

2.5.3 Spektrofotometrické stanovenie čistoty a koncentrácie

Najbežnejšou technikou na hodnotenie kvality nukleových kyselín je spektrofotometrická analýza. Jej výhody spočívajú v rýchlosti, jednoduchosti a tiež finančnej nenáročnosti [35].

Pomer $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ je pre čistú vzorku DNA 1,8 a pokles naznačuje kontamináciu (prevažne) proteínmi, keďže aromatické aminokyseliny ako fenylalanín a tyrozín špecificky absorbujú UV žiarenie. Prítomnosť RNA naopak pomer zvyšuje (nad 2,0). Vzorky rastlinnej DNA sú najnáchylnejšie na znečistenie polysacharidmi a polyfenolmi, konkr. pomer $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ musí byť väčší ako 2 a pomer $A_{260\text{nm}}/A_{270\text{nm}}$ by mal ležať medzi hodnotami 1,2 a 1,3 v nekontaminovanom preparáte. Hodnota pomeru $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ menšia ako 2 značí prítomnosť chaotropných činidiel použitých pri izolácii [34, 35].

Ďalšou možnosťou kvantifikácie a detekcie je aj zafarbenie DNA interkalačným farbivom, ktorým môže byť napr. SYBR green, SYTO9, DAPI, poprípade etidiumbromid či menej toxická akridinová oranž. Komplex DNA a naviazaného farbiva takto môže byť vzhľadom na fluorescenciu detekovaný, čo v prípade disponovania referenčnej vzorky o známej koncentrácii poslúži na stanovenie koncentrácie DNA [31, 36, 37].

2.6 Polymerázová reťazová reakcia

2.6.1 Princíp metódy

PCR (polymerase chain reaction) je jednou z najpoužívanejších techník molekulárnej biológie. Jej princíp je založený na replikácii nukleových kyselín in vitro. Hlavnou podstatou je prostredníctvom DNA-polymerázy cyklicky opakovaná syntéza vybraných úsekov dvojreťazovej DNA v smere 5' → 3'. Daný úsek (templát) je vymedzený dvojicou primerov, ktoré sú naviazané na protiahlé reťazce DNA tak, aby ich 3' konce smerovali proti sebe. Po pridaní DNA polymerázy tak môže nastať samotná replikácia oboch reťazcov. Je to rýchla, relatívne lacná, jednoduchá a všestranná metóda, ktorá poskytuje až 10^6 -násobné pomnoženie za 2–3 h. [31, 37, 38].

Proces je zložený z troch hlavných fáz:

- Teplotná denaturácia DNA (92–96 °C)
- Pripojenie (nasadnutie) primerov na už oddelené reťazce DNA (45–65 °C)
- Syntéza nových dcérskych reťazcov za pomoci DNA-polymerázy (65–75 °C) [38].

Reakcia prebieha v programovateľnom termostate, ktorý nazývame termocykler. Toto zariadenie musí byť schopné rýchlo a presne prechádzať z jednotlivých teplôt. Výsledným produktom PCR sú amplikóny, ktoré možno definovať ako úseky DNA o určitej dĺžke, pričom ich prítomnosť sa preukazuje stanovením ich veľkosti predovšetkým agarózovou gélovou elektroforézou [31, 37].

2.6.2 Komponenty

Existuje šesť základných komponentov, ktoré sa uplatňujú a sú nepostrádateľné u všetkých typov PCR:

1. Matrica DNA: obsahuje cieľovú sekvenciu, ktorá sa má amplifikovať (napr. genómová DNA, plazmidová DNA, amplikón atď.) [40].
2. Dvojica primerov: tvoria ich oligonukleotidy definujúce sekvenciu, ktorá sa má amplifikovať. So zvyšujúcou sa koncentráciou primeru špecificita reakcie klesá, zatiaľ čo jej účinnosť sa zvyšuje. Pri výbere primerov existujú všeobecné kritériá, mali by napr. obsahovať 18–24 nukleotidov, mať vyvážený pomer A/T a C/G párov, nebyť vzájomne komplementárne, neobsahovať sekundárnu štruktúru, ich teplota topenia by mala byť optimálna pre špecifické nasadnutie na templát a tiež by mala byť podobná u oboch z nich, ich optimálna koncentrácia by mala byť 0,1–0,6 mmol·m⁻³ [37, 40].
3. Termostabilná DNA-polymeráza: je enzým, ktorý katalyzuje reakciu. Dôležitá je jej tepelná stabilita, vďaka čomu môže prebiehať viac cyklov za sebou bez poškodenia polymerázy pri pôsobení vysokej denaturačnej teploty. Najpoužívanejšia je Taq polymeráza izolovaná z termofilnej baktérie *Thermus aquaticus*, jej polčas rozpadu pri 95 °C je 40 minút. Okrem nej poznáme aj polymerázy iných bakteriálnych kmeňov, ako sú napr. Pfu, Tma, Tfi [36, 39].
4. 3'-deoxynukleotid-5-trifosfáty (dNTP): sú stavebnými blokmi DNA, patria sem dATP, dCTP, dGTP, dTTP. So zvyšujúcou sa koncentráciou dNTP klesá reakčná špecificita, zatiaľ čo sa účinnosť reakcie zvyšuje [38, 40].
5. Mg²⁺ ióny: sú kofaktory enzýmov. S jednotlivými dNTP tvoria rozpustný komplex rozpoznávaný DNA-polymerázou. Pre jednotlivé aplikácie je nutné stanoviť ich koncentráciu empiricky, nakoľko okrem s NTP reagujú aj s primermi, templátovou DNA a chelatačnými činidlami [31].
6. Pufer: udržuje pH a iónovú silu reakčného roztoku vhodnú pre aktivitu enzýmov [40].

2.6.3 Real-time PCR

Na rozdiel od tradičnej PCR, ktorá sa spolieha na detekciu a analýzu amplikónov po prebehnutí všetkých cyklov, real-time PCR súčasne amplifikuje a detekuje DNA, čím prináša rýchlejšie výsledky. Vylepšená rýchlosť, ktorú ponúka real-time PCR, je do značnej miery dôsledkom odstránenia post-PCR detekčných postupov a použitia fluorescenčných techník a citlivých metód detekcie ich emisií. Termocyklyry sú u real-time PCR zariadenia kombinujúce cyklické striedanie teplôt spolu s detekciou fluorescencie a monitorovaním priebehu PCR. Produkt je analyzovaný v exponenciálnej fáze amplifikácie (v tomto okamihu sa cieľová koncentrácia DNA po každom trojkrovovom teplotnom cykle zdvojnásobuje), poskytované sú nielen spoľahlivé a reprodukovateľné kvalitatívne výsledky (cieľ detekovaný/nezistený), ale aj kvantitatívne výsledky pre presné miery počtu kópií východiskového templátu s presnosťou a vysokou citlivosťou v širokom dynamickom rozsahu [41].

Fluorescenciu je možné u amplikónov docieľiť viacerými metódami, ktoré sú založené na použití fluorescenčného farbiva viazajúceho sa na dsDNA, fluorescenčne značených sond či fluorescenčne značených primerov. Najčastejšie využívaným farbivom je SYBR Green, ktorého podstata je založená na fakte, že sa po väzbe na dsDNA intenzita fluorescencie výrazne zvýši [31, 42].

Sonda (napr. TaqMan) obsahuje okrem fluorescenčného farbiva aj kovalentne naviazaný zhášač, t. j. molekulu, v prítomnosti ktorej k fluorescencii nedochádza. Ak na sondu pripojenú na templátovom vlákne DNA narazí DNA-polymeráza, prejaví svoju exonukleázovú aktivitu – pokračuje v syntéze nového komplementárneho vlákna, pričom sondu postupne odbúrava. Tým sa preruší kontakt farbiva so zhášačom, vďaka čomu následne dochádza k emisii fluorescencie [31, 42].

2.6.4 HRM analýza

HRM analýza je jednoduchá, rýchla, nedeštruktívna a ekonomicky nenáročná metóda analyzujúca vzorku DNA. Jej princípom je premena dvojreťazovej molekuly DNA na jednoreťazovú, pričom sa veľmi presne a v postupných intervaloch zvyšuje teplota. Priebeh je monitorovaný, výsledkom merania je pre lepšiu čitateľnosť diferenčná krivka topenia, ktorá predstavuje závislosť derivovanej intenzity fluorescencie na teplote. Vzniknuté píky odpovedajú teplote topenia daných amplikónov. Teplotu topenia možno charakterizovať ako teplotu, pri ktorej došlo k rozdeleniu práve polovice dvojreťazových molekúl DNA na jednoreťazové. Metóda je veľmi citlivá, dokáže zaznamenávať rozdiely už jednej bázi. Často sa využíva ako doplnková analýza na overenie teploty topenia vzniknutých špecifických produktov PCR [43, 44].

2.6.5 Praktické využitie

PCR nachádza uplatnenie pri syntéze fragmentov na základe chromozómovej DNA alebo RNA napr. v klinickej diagnostike pri mapovaní a charakterizácii genómov, prenatálnej diagnostike dedičných chorôb a stanoveniu pohlavia, monitorovaní terapie rakoviny, no taktiež aj v iných oblastiach, napr. pri detekcii infekčných mikroorganizmov a vírusov v potravinách, vode a pôde, analýze prehistorických DNA z fosílií či dôkazoch identity v kriminalistike [31, 37].

Aplikácia konkrétne kvantitatívnej PCR v reálnom čase je rozsiahla predovšetkým pre virológiu. Okrem toho, že real-time PCR je veľmi presná a citlivá metóda, umožňuje tiež vysokovýkonné automatizované procesy, postačujú malé objemy vzoriek a dá sa využiť v širokej škále aplikácií, čo z nej robí metódu voľby v dnešných molekulárnych laboratóriách. Real-time PCR sa považuje za zlatý štandard pre kvantifikáciu a identifikáciu rôznych cieľov vrátane baktérií, húb, vírusov alebo onkologických mutácií. Možno ju rýchlo prispôsobiť tak, aby poskytovala dôkladné odpovede pri identifikácii vznikajúcich chorôb, čím sa výrazne zlepšuje zdravotná starostlivosť [41].

2.7 Agarózová gélová elektroforéza

2.7.1 Separácia nukleových kyselín

Oddelenie nukleových kyselín na základe ich veľkosti je potrebné pre mnoho bežných laboratórnych postupov (napr. subklonovanie, diagnostika genotypov, qPCR). Separácia nukleových kyselín elektroforézou na agarózovom géle funguje na základe využitia negatívneho náboja fosfátového reťazca nukleových kyselín. Molekuly DNA a RNA majú negatívny náboj rovnomerne rozložený po celej svojej dĺžke, kvôli čomu sa pohybujú cez agarózovú maticu v elektrickom poli smerom k pozitívnemu pólu (anóda). Kratšie nukleové kyseliny (menšie) sú schopné za dané časové obdobie migrovať cez maticu rýchlejšie ako väčšie. Tento faktor je hlavný pri ovplyvnení elektroforetickej pohyblivosti molekúl DNA, ktorá je nepriamo úmerná logaritmu ich veľkosti. Pri elektroforéze je možné priamo sledovať polohu jednotlivých fragmentov a porovnaním s polohou dĺžkového štandardu stanoviť ich veľkosť.

Okrem toho je elektroforetická pohyblivosť ovplyvnená tiež koncentráciou agarózového gélu, ktorý je pri vyšších koncentráciách tvorený hustejšou sieťou, čo sťažuje priechodnosť molekúl. Samotná elektroforéza je ďalej ovplyvnená intenzitou elektrického poľa, teplotou a zložením elektroforetického pufrov. Pri elektroforéze na agarózovom géle sa používa jeden z dvoch pufrov: Tris-Acetát EDTA (TAE) alebo Tris-Borát EDTA (TBE), pričom TBE má a vyššiu tlmiacu kapacitu ako TAE [34, 44, 45].

Agaróza je polysacharid získavaný z rias, chemicky polymér D-galaktózy a L-galaktózy pospojovaných esterovou väzbou. Okrem agarózového je často využívaný aj gél tvorený polyakrylamidom. U agarózového sú separované molekuly nukleových kyselín veľkosti 100 bp až 50 kp. Polyakrylamidové gély sa používajú na separáciu menších molekúl, ich súčasťou sú jedovaté chemické látky (TEMED, samotný akrylamid) a sú drahšie, v čom spočíva výhoda používania agarózových [31, 34].

2.7.2 Vizualizácia DNA na géle

Vizualizácia výsledkov elektroforézy na agarózovom géle sa vykonáva pridaním farbív, konkr. zvyčajne jedným z dvoch spôsobov:

- a) pridaním fluoroforu vmedzerujúceho sa medzi dve vlákna DNA priamo do gélu pred jeho stuhnutím
- b) udržaním fluoroforu v tlmivom roztoku, premytím agarózového gélu v ňom a použitím tohto roztoku pre viacero vizualizácií gélových elektroforéz

V oboch prípadoch sa používa ultrafialové svetlo na excitáciu fluoroforu a zobrazenie výsledkov experimentu. Najbežnejším fluoroforom viažucim DNA je etidiumbromid (EtBr). EtBr je toxický a po osvetlení červeno fluoreskuje, pričom molekuly DNA o rovnakej veľkosti sú na géle zobrazené ako pružky a ich intenzita sfarbenia je úmerná koncentrácii DNA. Ďalším bežným fluoroforom, ktorý sa používa, je skupina kyaninových farbív s komerčným označením SYBR. U polyakrylamidových gélov je možné aj farbenie striebrom, poprípade farbivom Coomassie Brilliant Blue [31, 45, 46].

2.8 HPLC

2.8.1 Princíp metódy

HPLC (high-performance/pressure liquid chromatography) je zdokonalením chromatografických metód za účelom efektívnejšej a rýchlejšej separácie. Všeobecne je chromatografia jednou z najvýznamnejších separačných analytických metód, umožňuje separáciu, identifikáciu a stanovenie veľkého množstva anorganických a organických látok. Jej podstatou je rozdielna distribúcia zložiek zmesi medzi dve nemiesiteľné fázy, a to fázu stacionárnu (nepohyblivú) a mobilnú (pohyblivú). Stacionárnu fázu predstavuje tuhá látka alebo kvapalina ukotvená na tuhom nosiči, je umiestnená v chromatografickej kolóne vo forme sorbentu. Mobilná fáza je u kvapalinovej chromatografii kvapalina, ktorá preteká sorbentom. Unáša vzorku chromatografickým systémom a jednotlivé zložky sa delia, pretože rôzne interagujú so stacionárnou fázou – čím viac sa k nej pútajú, tým pomalšie sa pohybujú. Pri HPLC usporiadaní je mobilná fáza do systému pričerpávaná pomocou čerpadla za vysokého tlaku [47].

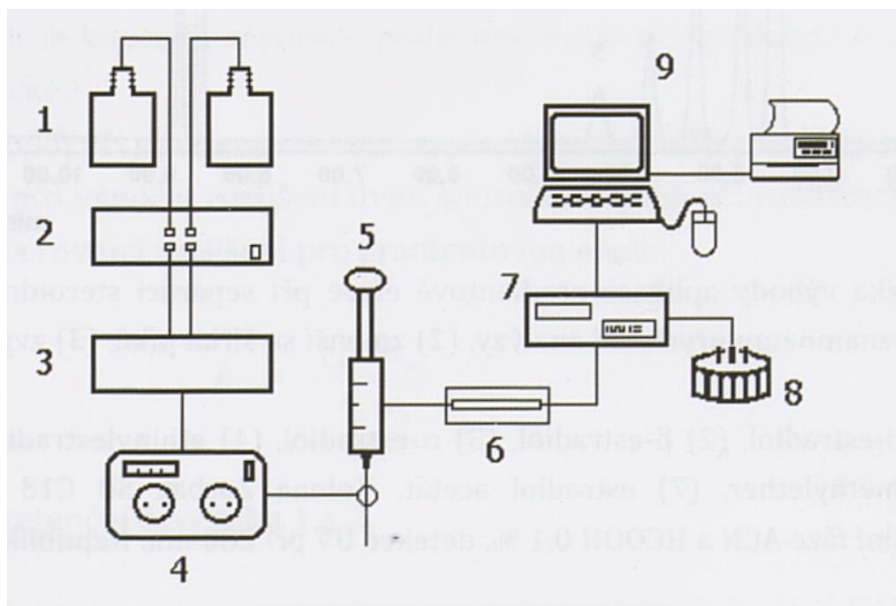
K elúcii analytov je možné použiť izokratickú alebo gradientovú elúciu. Pri izokratickej elúcii je zloženie mobilnej fázy konštantné. Pri gradientovej elúcii sa, naopak, toto zloženie v čase mení, v priebehu separácie dochádza k zvyšovaniu elučnej sily mobilnej fázy [47].

Výstupom merania je chromatogram, na ktorom sú píky (elučné krivky). Kvalitatívnej informácii odpovedá retenčný čas, ktorý možno charakterizovať ako dobu od nástreku vzorky po vrchol príslušného píku. Kvantitatívna informácia je daná výškou a tiež plochou daného píku [48].

2.8.2 Inštrumentácia

Kvapalinový chromatograf sa skladá z viacerých častí, ktoré plnia nasledujúce funkcie:

- rezervoári mobilnej fázy, vysokotlakové čerpadlo (uchovávanie a transport mobilnej fázy, popr. aj odplynenie a zmiešavanie mobilnej fázy)
- autosampler/manuálny dávkovač (dávkovanie vzorky)
- chromatografická kolóna, termostat kolóny (separácia látok)
- detektor, napr. UV-VIS, refraktometrický, fluorescenčný, elektrochemický (detekcia látok)
- počítač (záznam nameraných dát) [47, 49]



Obrázok 4: Základná schéma HPLC: (1) zásobníky mobilných fáz, (2) odplyňovač, (3) zmiešavač, (4) vysokotlakové čerpadlo, (5) dávkovač, (6) kolóna, (7) detektor, (8) zberač frakcií, (9) počítač [47]

2.8.3 Využitie v praxi

HPLC je jedným z chromatografických systémov, ktoré majú široké použitie v oblasti klinického výskumu, biochemického výskumu, kontroly priemyselnej kvality atď. Medzi aplikácie HPLC patrí detekcia, analýza, stanovenie a kvantifikácia molekúl zo zmesí biologickej, rastlinnej a medicínskej podstaty. Použitie HPLC a GC sa líši od odvetvia k odvetviu a veľmi závisí od zlúčenín, ktoré sa majú separovať. HPLC je optimálna na separáciu neprchavých chemických a biologických zlúčenín, ako sú napríklad:

- farmaceutiká ako aspirín či ibuprofen
- soli ako chlorid sodný či fosforečnan draselný
- proteíny ako vaječné bielko či krvné proteíny
- organické polyméry ako polystyrén či polyetylén
- jednotlivé zložky rastlinných extraktov a bylenných liečiv
- termicky nestabilné zlúčeniny ako TNT či enzýmy [50, 51]

3 CIEĽ PRÁCE

- vypracovanie literárnej rešerše k danej problematike
- izolácia DNA zo samotného ovocia, modelových a komerčných zmesí detských pyré
- výber a testovanie špecifických primerov na detekciu vybraných druhov ovocia pomocou qPCR
- výber látok využiteľných ako markery pri charakterizácii ovocnej zložky potravín
- charakterizácia ovocnej zložky komerčných a modelových zmesí pomocou inštrumentálnych a molekulárne-biologických metód
- vyhodnotenie a diskusia výsledkov

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Rastlinný materiál

4.1.1 Komerčné výrobky

Na analýzu boli v komerčných sieťach zakúpené tri druhy ovocných detských pyréd s rôznym percentuálnym obsahom manga.

4.1.1.1 *Lupilu BIO Organic Ovocné pyréd jablko, broskyňa, mango*

- Zloženie: ovocie z kontrolovaného ekologického poľnohospodárstva – 68 % jablko; 16 % broskyň; 16 % manga
- Hmotnosť výrobku: 90 g
- Určenie: deti od ukončeného piateho mesiaca
- Energetická hodnota na 100 g výrobku: 247 kJ/58 kcal



Obrázok 5: Detské pyréd Lupilu

4.1.1.2 *Nestle NaturNes BIO Mango*

- Zloženie: 95,5 % mangové pyréd z ekologického poľnohospodárstva; koncentrát citrónovej šťavy
- Hmotnosť výrobku: 90 g
- Určenie: deti od ukončeného šiesteho mesiaca
- Energetická hodnota na 100 g výrobku: 260 kJ/62 kcal



Obrázok 6: Detské pyré Nestle

4.1.1.3 Hello Ovocné pyré s mangom

- Zloženie: 85 % ovocia – 52 % jablčná dreň, 33 % mangová dreň; voda; cukor; modifikovaný škrob; antioxidant – kyselina askorbová; vitamín C
- Hmotnosť výrobku: 190 g
- Určenie: deti od ukončeného ôsmeho mesiaca
- Energetická hodnota na 100 g výrobku: 323 kJ/6 kcal



Obrázok 7: Detské pyré Hello

4.1.2 Modelové zmesi

Ovocie obsiahnuté v analyzovaných detských pyr (mango, broskyne a jablká) bolo zakúpené v čerstvom stave z komerčných sietí. Okrem neho boli zakúpené aj ďalšie potrebné suroviny, ktoré sú súčasťou zloženia komerčných výrobkov (cukor, kukuričný škrob).

4.2 Vybavenie laboratória

4.2.1 Chemikálie

- Izolačný kit EliGene Plant DNA (Elisabeth Pharmacon, ČR)
- Izolačný kit Chemagic DNA Plant Kit (PerkinElmer, Nemecko)
- Etanol (Penta, ČR)
- RNáza A (Serva, Nemecko)
- qPCR 2x SYTO-9, Master Mix (Top-Bio, ČR)
- PCR ultra H₂O (Top-Bio, ČR)
- Oligonukleotidové primery (Elisabeth Pharmacon, ČR)
- Ethylendiaminotetraoctová kyselina (Serva, Nemecko)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Serva, Nemecko)
- Kyselina boritá (Penta, ČR)
- Agaróza na gélovú elektroforézu (Sigma-Aldrich, USA)
- GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, USA)
- Midori Green Advance (Elisabeth Pharmacon, ČR)
- DNA standard FastGene 100 bp DNA Ladder (Malamité, ČR)
- PCR loading buff. Yellow load (Top-Bio, ČR)
- PCR loading buff. (Top-Bio, ČR)
- Metanol (Penta, ČR)
- Acetonitril, Chromasolv Plus, for HPLC, $\geq 99,9$ %, Honeywell Riedel-de Haën (Termo Fisher Scientific, USA)
- Kyselina trifluoroctová, 99 % (Acros Organics, Belgicko)

4.2.2 Prístroje a pomôcky

- Lyofilizátor FreeZone Triad (Labconco, USA)
- Miniinkubátor LABNET 230 V (Termo Fisher Scientific, USA)
- Centrifúga U-32R (BOECO Germany, Nemecko)
- Laboratórne váhy KERN CM 60-2N (UNIPRO-ALPHA, ČR)
- Mikropipety Discovery (HTL, Poľsko)
- Mikropipety Finnpiptette F2 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- NanoDrop Spectrophotometer 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- PCR box (Biosan, Litva)
- Termocyklér Rotor-Gene 6000 (Quigen, Austrália)
- Mikrovlnná rúra (SENCOR, ČR)
- Zariadenie na elektroforézu Easy – Cast, (Owl Scientific, USA)
- Zdroj elektrického napätia na elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, USA)
- Transluminátor Azure Biosystems c200 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Ultrazvuková lázeň PS 02000 (Power Sonic, USA)
- HPLC Dionex UltiMate 3000 series (Thermo Fisher Scientific, USA)
- PDA detektor Vanquish (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Autosampler Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA)

- Pump UltiMate (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Kolona Kinetex F5, 2,6 μm , 4,6 x 150 mm (Phenomenex, USA)
- Mraznička a chladnička
- Laboratórne sklo, plastový materiál a laboratórne pomôcky – Eppendorfove skúmavky, špičky, stojany

4.3 Metódy

4.3.1 Izolácia DNA

4.3.1.1 *Príprava rastlinných vzoriek na analýzu*

Čerstvé ovocie bolo pokrúšané na kúsky a varené až do zmäknutia, následne bolo rozmixované tyčovým mixérom. Na základe zloženia komerčných produktov boli vytvorené modelové zmesi s dodržaním percentuálneho podielu jednotlivých komponentov u každého analyzovaného detského pyré. Celkom boli vytvorené tri repliky detských pyréd a dve vzorky samostatného ovocia – jablka a broskyne. Hotové modelové zmesi aj spolu s komerčnými výrobkami boli uchovávané v mrazničke.

Pred izoláciou DNA z nich bolo navážených po 1 g do Eppendorfových skúmaviek. Bolo pridaných 55 U pektinázy a nasledovala inkubácia po dobu dvoch hodín pri teplote 37 °C. Vzorky boli zmrazené na -80 °C po dobu jednej hodiny a cez noc lyofilizované.

4.3.1.2 *Izolácia DNA pomocou izolačného kitu EliGene Plant DNA*

Izolácia DNA prebiehala podľa priloženého návodu ku izolačnému kitu. Do mikroskúmavky o objeme 1,5 ml bolo pridaných 0,2 g vzorky. Vzorka bola pomocou homogenizačného tĺčika rozdrvená a bolo pridaných 450 μl roztoku P1. Po premiešaní bolo pridaných 50 μl roztoku P2. Obsah skúmavky bol krátko vortexovaný a následne inkubovaný 10 minút pri 70 °C. Po 10 minútach nasledovala centrifugácia po dobu 3 minút pri 10 000 x g a izbovej teplote. Supernatant bol prevedený do čistej 1,5 ml mikroskúmavky, bolo pridaných 175 μl roztoku P3. Obsah skúmavky bol vortexovaný, inkubovaný na ľade po dobu 5 minút a centrifúgovaný po dobu 3 minút pri 10 000 x g a izbovej teplote. Z mikroskúmavky bolo odobratých 500 μl supernatantu do čistej 2 ml mikroskúmavky, pridaných bolo 500 μl roztoku P4. Zmes bola vortexovaná a krátko centrifúgovaná. Následne bol postup zopakovaný s roztokom P5 (prídavok v množstve 500 μl , vortexovanie, krátka centrifugácia). 750 μl supernatantu bolo premiestnených do mikroskúmavky s kolonkou a centrifúgovaných po dobu 1 minúty pri 10 000 x g a izbovej teplote. Odstredený roztok bol odstránený a zvyšný supernatant z predchádzajúceho kroku bol prevedený do mikroskúmavky s kolonkou. Znova nasledovala centrifugácia po dobu 1 minúty pri 10 000 x g a izbovej teplote. Kolonka bola presunutá do čistej mikroskúmavky o objeme 2 ml, bolo pridaných 500 μl roztoku P6 a obsah bol centrifúgovaný (1 minúta, 10 000 x g, izbová teplota). Odstredený roztok bol odstránený, bolo pridaných 500 μl roztoku P7 a prebehla centrifugácia (1 minúta, 10 000 x g, izbová teplota). Kolonka bola následne zbavená zvyškov roztoku P7 pomocou centrifugácie po dobu 25 minút pri 12 000 x g a izbovej teplote. Po centrifugácii bola kolonka opatrne vybratá a premiestnená do čistej 2 ml mikroskúmavky. Bolo na ňu nanosených 100 μl roztoku P8, obsah bol centrifúgovaný (1 minúta, 10 000 x g, izbová teplota). Po odstránení kolonky bola získaná DNA uchovávaná v chladničke [52].

4.3.1.3 *Izolácia DNA pomocou izolačného kitu Chemagic DNA Plant Kit*

Princípom kitu Chemagic DNA Plant Kit je izolácia DNA na magnetických nosičoch. Samotná izolácia prebiehala podľa postupu priloženého výrobcom.

Do mikroskúmavky o objeme 1,5 ml bolo pridaných 0,2 g vzorky alebo lyofilizát z 1 g ovocného pyréd. Vzorka bola pomocou homogenizačného tĺčika rozdrvená a po pridaní 400 μl lyzačného roztoku

B1 a 2 μl RNázy A (100 mg/ml) bol obsah dôkladne premiešaný. Zmes bola centrifúgovaná po dobu 5 minút pri 12 000 rpm a izbovej teplote. Supernatant bol prenesený do čistej mikroskúmavky. Bolo doň pridaných 30 μl resuspendovaných magnetických guľôčok, 320 μl roztoku B2, zmes bola premiešaná 6 ťahmi pipety a ponechaná po dobu 5 minút pri izbovej teplote. Následne bola mikroskúmavka premiestnená do magnetického stojana. Po dvoch minútach bol supernatant odstránený a mikroskúmavka odobratá z magnetického stojana. Bolo pridaných 900 μl premývacieho roztoku B3. Vzniknutá vrstva na stene mikroskúmavky bola resuspendovaná a zmiešaná spolu s roztokom pomocou 15 ťahov pipety. Po minúte bola mikroskúmavka presunutá do magnetického stojana a supernatant bol odstránený. Tento mycí proces bol zopakovaný s 900 μl premývacieho roztoku B4 a 70 % etanolom. Po odstránení supernatantu a ponechaní mikroskúmavky v magnetickom stojane bol opatrne pridaný 1 ml mycieho roztoku B5. Všetok mycí roztok B5 bol po minúte odstránený. Bolo pridaných 200 μl elučného roztoku B6 a magnetická vrstva bola resuspendovaná ťahmi pipety. Mikroskúmavka bola po inkubácii (10 minút, 55 °C) presunutá do magnetického stojana. Po minúte bol eluát obsahujúci DNA presunutý do čistej 1,5 ml mikroskúmavky, ktorá bola uchovávaná v chladničke [53].

4.3.2 Meranie koncentrácie a čistoty DNA

Koncentrácia vyizolovanej DNA bola zistená spektrofotometricky prostredníctvom prístroja NanoDrop 2000. Jednotlivé vzorky boli nanášané v objeme 2 μl a merané proti elučnému pufru (blank) z príslušného kitu, pomocou ktorého bola daná DNA izolovaná. Absorbancia bola meraná v rozmedzí vlnových dĺžok od 220 nm do 360 nm. Z nameraných hodnôt bola zistená koncentrácia DNA a z pomerov absorbancií $A_{260/280}$ a $A_{260/230}$ bola určená jej čistota.

4.3.3 PCR

4.3.3.1 Príprava vzoriek na analýzu

Všetky qPCR reakcie boli vykonávané s MasterMix SYTO-9. Pomer jednotlivých zložiek uvádza Tabuľka 4, použité primery a teplotné profily Tabuľka 5, Tabuľka 6 a Tabuľka 7. Práca prebiehala v dvoch sterilných boxoch, pričom jeden z nich bol určený na manipuláciu s DNA. Na qPCR analýzu boli použité vzorky o celkovom objeme 25 μl , ktoré boli dávkované do špeciálnych PCR mikroskúmaviek o objeme 0,2 ml.

Tabuľka 4: Komponenty pre PCR a ich množstvo na jednu vzorku

| Zložka | Objem [μl] | | | |
|-------------|-------------------------|----------------------------|------|------|
| | Predvolený pomer | Pomery pri optimalizáciách | | |
| Voda | 9,5 | 7,5 | 5,5 | 1,5 |
| SYTO-9 | 12,5 | 12,5 | 12,5 | 12,5 |
| Primer 1 | 1 | 2 | 3 | 3 |
| Primer 2 | 1 | 2 | 3 | 3 |
| DNA matrica | 1 | 1 | 1 | 5 |

4.3.3.2 Použité primery

Tabuľka 5: Sekvencie a dĺžky amplicónov jednotlivých primerov

| Primer | Sekvencia 5' → 3' | Dĺžka amplicónu [bp] | Zdroj |
|---------|-------------------------------|----------------------|----------|
| ITS-S2F | ATG CGA TAC TTG GTG TGA AT | 387–547 | [54] |
| ITS-S2R | GAC GCT TCT CCA GAC TAC AAT | | |
| 4CL-F | AAG GCT GCT TGG ATT TCT CG | 163 | [55, 56] |
| 4CL-R | TTT TCA CCG TCG ACT TGC TG | | |
| PAL-F | AGA AGC CGA GAA GCC AAG AA | 178 | [57] |
| PAL-R | TGT TGG CTT CCT TCT CAG TCT | | |
| ANR-F | TAT CGG CAT GGA TCA CTT CG | 763 | [56, 58] |
| ANR-R | CTC GGC ATA TTC GTT GTA GG | | |
| F3'H-F | TAG GAG GAG GTA GCA GTC | 155 | [56, 59] |
| F3'H-R | CGT TAG CCA GTT CCC AAT | | |
| DFR-F | GGC TCG TCA TGA GAC TCC TC | 191 | [60] |
| DFR-R | TGT GTT AAC TCC AGC AGA TGT C | | |

4.3.3.3 Teplotné profily

Tabuľka 6: Teplotný profil pre primery ITS2 [54]

| Krok | Podmienky | | |
|-----------------------|--------------|--------------|-------------|
| | Počet cyklov | Teplota [°C] | Trvanie [s] |
| Úvodná denaturácia | 40 | 95 | 300 |
| Denaturácia | | 95 | 30 |
| Hybridizácia primerov | | 52 | 30 |
| Syntéza reťazcov DNA | | 72 | 45 |
| Elongácia | | 72 | 600 |

Tabuľka 7: Teplotný profil primerov špecifických pre mango [56]

| Krok | Podmienky | | |
|-----------------------|--------------|--------------|-------------|
| | Počet cyklov | Teplota [°C] | Trvanie [s] |
| Úvodná denaturácia | 40 | 95 | 300 |
| Denaturácia | | 95 | 10 |
| Hybridizácia primerov | | 58 | 10 |
| Syntéza reťazcov DNA | | 72 | 30 |
| Elongácia | | 72 | 300 |

4.3.4 Agarózová gélová elektroforéza

Na prípravu gélu na elektroforézu bol namiešaný roztok TBE pufru, ktorý pozostával z 54 g Tris báze, 27,5 g kyseliny boritej a 20 ml 0,5 M EDTA. Látky boli rozpustené v destilovanej vode, ktorá bola doplnená na objem 1 liter. Pufer bolo pred použitím potrebné desaťkrát zriediť.

Navážka 1,2 g agarózy bola v Erlenmayerovej banke zmiešaná s 100 ml 0,5x TBE pufru. Za pomoci mikrovlnnej rúry bol roztok 4 až 5x privedený k varu až do úplného rozpustenia agarózy. Po miernom ochladení bolo pridané interkalačné farbivo GelRed (10 μ l), poprípade Midori Green (5 μ l). Roztok bol vyliaty do formy s hrebienkom a ponechaný po dobu stuhnutia gélu – minimálne 30 minút.

Do jamiek boli nanášané PCR produkty v objeme 15 μ l, ktoré boli predtým zmiešané s nanášacím pufrom v pomere 5:1. Do jednej z jamiek bolo nanesených 5 μ l dĺžkového štandardu. Takto pripravená forma s gélom bola vložená do vaničky, zaliata 0,5x TBE pufrom po rysku a pripojená ku zdroju napätia. Bolo zvolené napätie 80 V a elektroforéza prebiehala 2 hodiny.

Po elektroforéze bol gél vyfotografovaný v UV transluminátore pri vlnovej dĺžke 302 nm.

4.3.5 HPLC

Lyofilizované vzorky komerčných detských pyrú; vzorky pripravených replík a vzorky samostatného ovocia (jablka a broskyne) boli navážené do 2 ml mikroskúmaviek po 0,25 g v dvoch opakovaníach. Do každej z nich bolo pridaných 1,25 ml metanolu a boli vložené do ultrazvukovej lázne na 30 minút. Následne boli centrifúgované pri 3 000 rpm po dobu 10 minút a izbovej teplote. Z každej mikroskúmavky bol odpipetovaný supernatant (frakcia 1) a postup bol zopakovaný – prídavok metanolu, ultrazvuková lázeň, centrifugácia, odpipetovanie supernatantu (frakcia 2). Pripravené extrakty boli uchovávané v mrazničke [1].

Na HPLC analýzu bol použitý nástrek o objeme 20 μ l. Analýza prebiehala gradientovou elúciou po dobu 30 minút, mobilnými fázami boli 0,1 % vodný roztok kyseliny trifluoroctovej (MiliQ) a acetonitril, obe s prietokom 0,4 ml/min. Kolóna bola vyhriata na 35 °C a príslušné látky boli detekované pri vlnových dĺžkach 260, 280, 300 a 680 nm.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 Plod manga

5.1.1 Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty izolovanej DNA

DNA z plodu manga bola izolovaná pomocou dvoch komerčných kitov – izolačného kitu EliGene Plant DNA (Elisabeth Pharmacon) a izolačného kitu Chemagic DNA Plant Kit (PerkinElmer). Izolácia prebiehala podľa postupov uvedených v kapitolách 4.3.1.2 a 4.3.1.3.

Po izolácii bola v oboch prípadoch určená koncentrácia a miera znečistenia DNA prístrojom NanoDrop 2000. Výsledky uvádza Tabuľka 8 a Tabuľka 9. Na základe meraní je možné usúdiť, že DNA izolovaná kitom na princípe magnetických častíc vykazuje vyššiu koncentráciu. Pomer absorbancií pri 260 nm a 280 nm ($A_{260/280}$) nie je v rozmedzí hodnôt 1,8–2,0 u DNA ani jedného z použitých kitov, čo značí kontamináciu. V prípade DNA izolovanej kitom EliGene to môže byť prítomnosť RNA, ktorá hodnotu zvyšuje. U DNA izolovanej kitom Chemagic je predpoklad prítomnosti proteínov. Nízke hodnoty pomeru absorbancií $A_{260/230}$ môžu byť spôsobené prítomnosťou polyfenolických látok či zvyškov činidiel izolačného kitu – predovšetkým u DNA izolovanej kitom Chemagic DNA Plant.

Tabuľka 8: Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty mangovej DNA izolovanej kitom EliGene Plant DNA

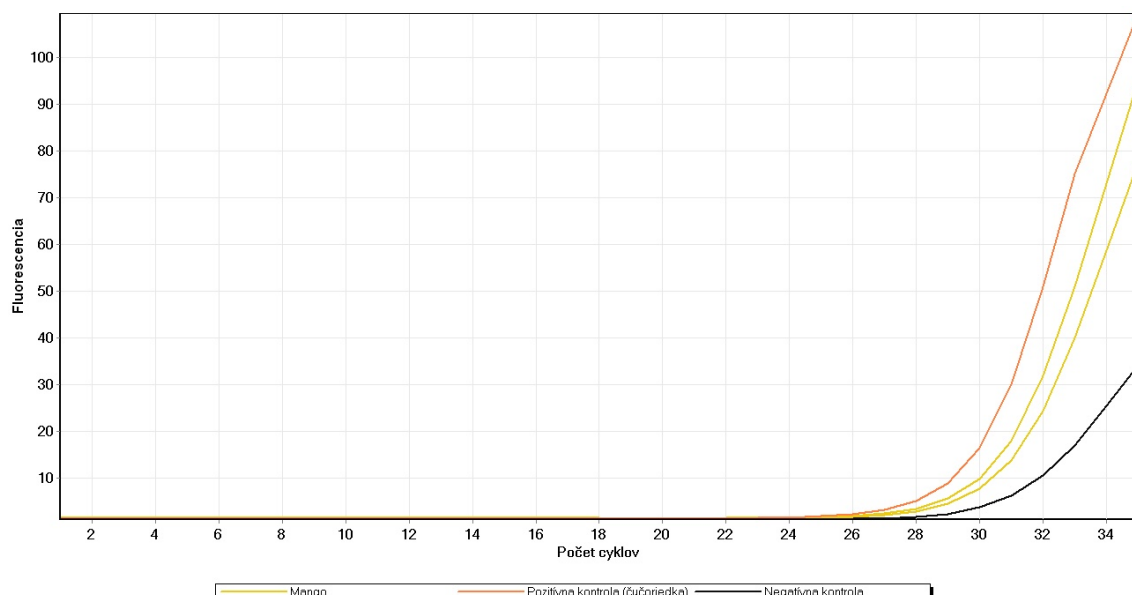
| Číslo merania | c [ng·μl ⁻¹] | $A_{260/280}$ | $A_{260/230}$ |
|-------------------|--------------------------|---------------|---------------|
| 1. | 22,40 | 2,20 | 1,59 |
| 2. | 19,10 | 2,23 | 2,23 |
| 3. | 19,10 | 2,07 | 2,21 |
| Priemerná hodnota | 20,20 | | |

Tabuľka 9: Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty mangovej DNA izolovanej kitom Chemagic DNA Plant

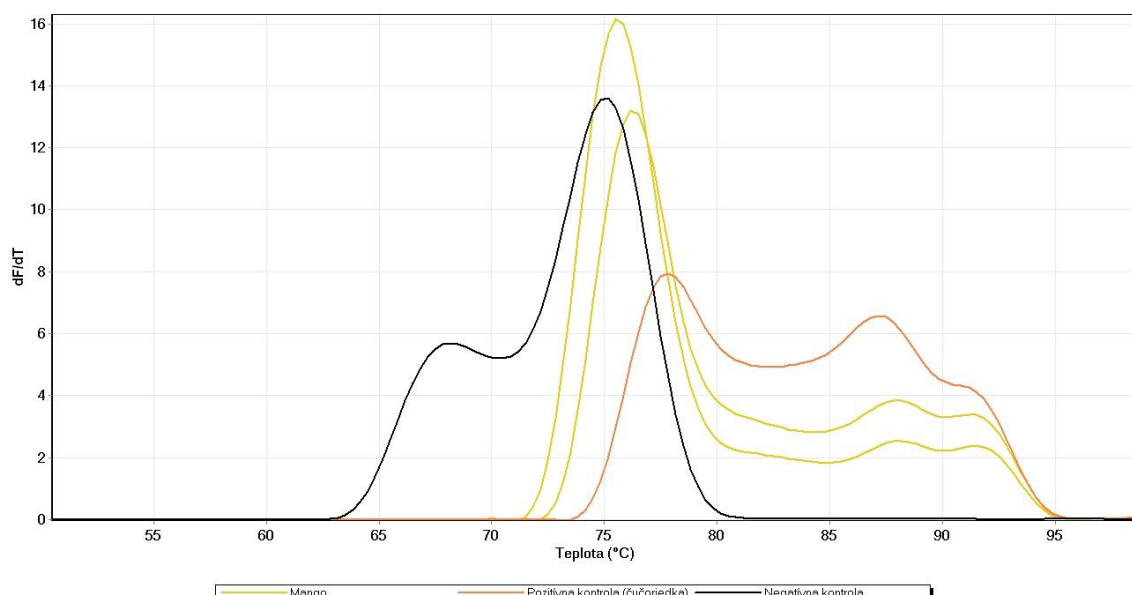
| Číslo merania | c [ng·μl ⁻¹] | $A_{260/280}$ | $A_{260/230}$ |
|-------------------|--------------------------|---------------|---------------|
| 1. | 23,8 | 1,38 | 0,37 |
| 2. | 25,2 | 1,37 | 0,36 |
| 3. | 23,1 | 1,39 | 0,35 |
| Priemerná hodnota | 24,03 | | |

5.1.2 Overenie amplifikovateľnosti

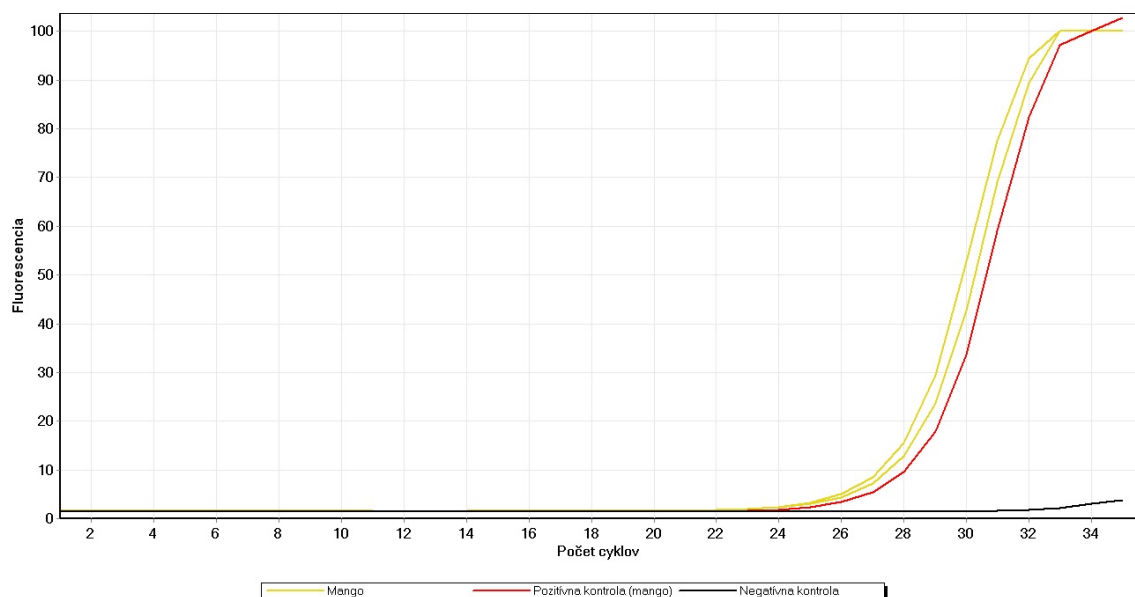
U oboch vzoriek DNA boli na overenie amplifikovateľnosti použité primery špecifické pre rastlinnú DNA – ITS2. Ako pozitívna kontrola (DNA, u ktorej už bola amplifikovateľnosť dokázaná) bola využitá DNA izolovaná z plodu čučoriedky (10 ng·μl⁻¹) a DNA plodu manga (10 ng·μl⁻¹). Výsledky qPCR analýzy sú zobrazené na nasledujúcich obrázkoch.



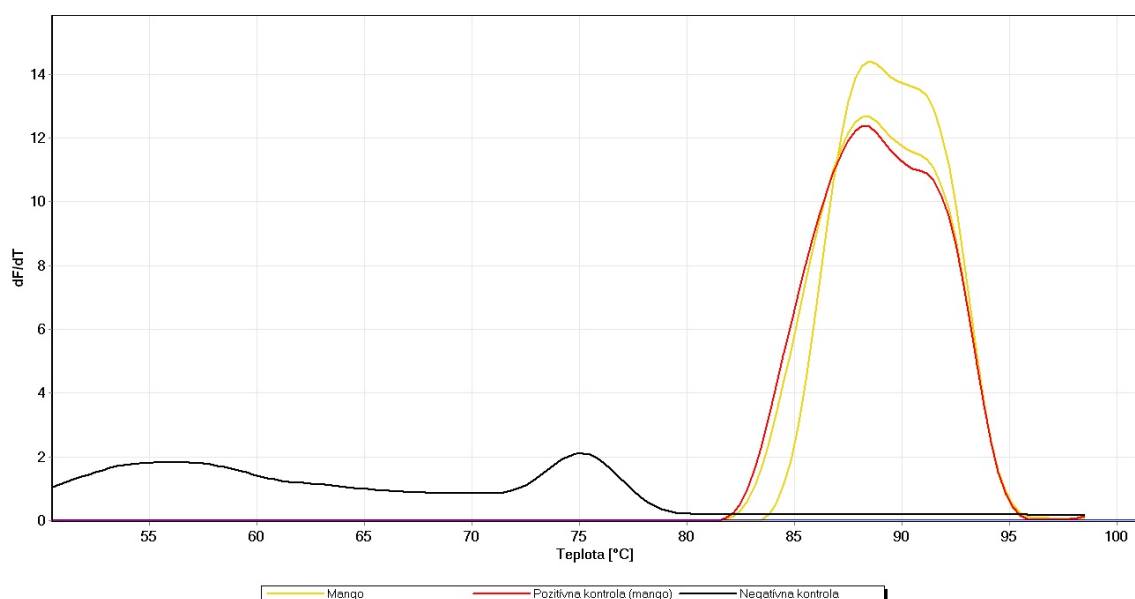
Obrázok 8: Amplifikačné krivky – DNA manga izolovaná kitom EliGenne Plant DNA



Obrázok 9: Krivky topenia – DNA manga izolovaná kitom EliGenne Plant DNA



Obrázok 10: Amplifikačné krivky – DNA manga izolovaná kitom Chemagic DNA Plant

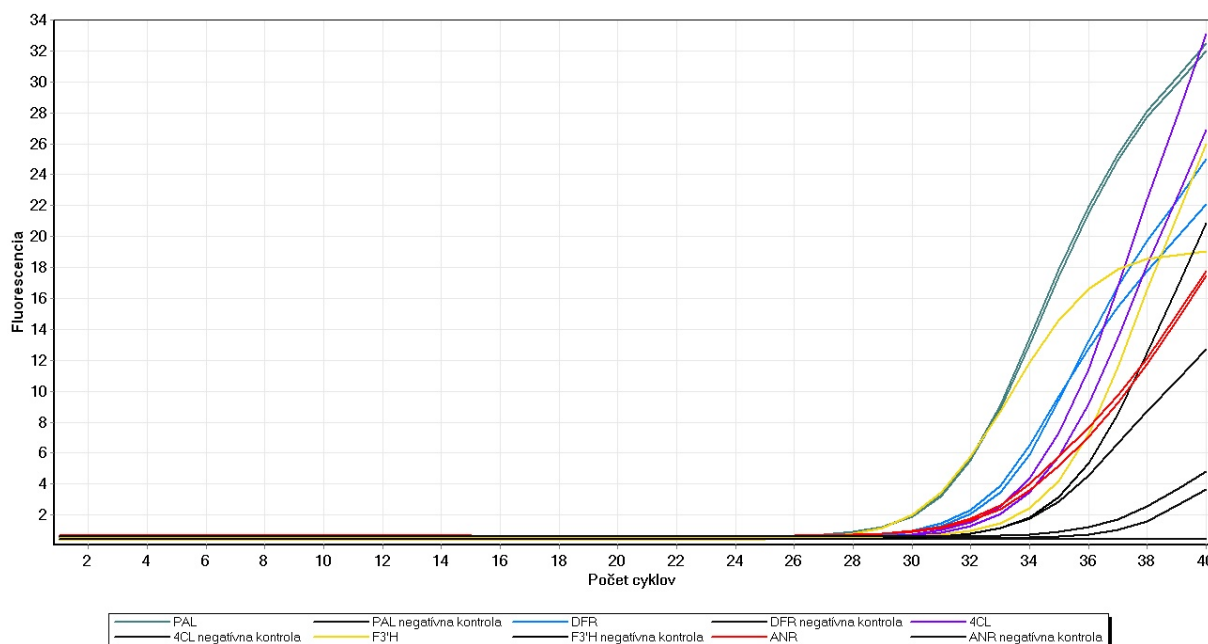


Obrázok 11: Krivky topenia – DNA manga izolovaná kitom Chemagic DNA Plant

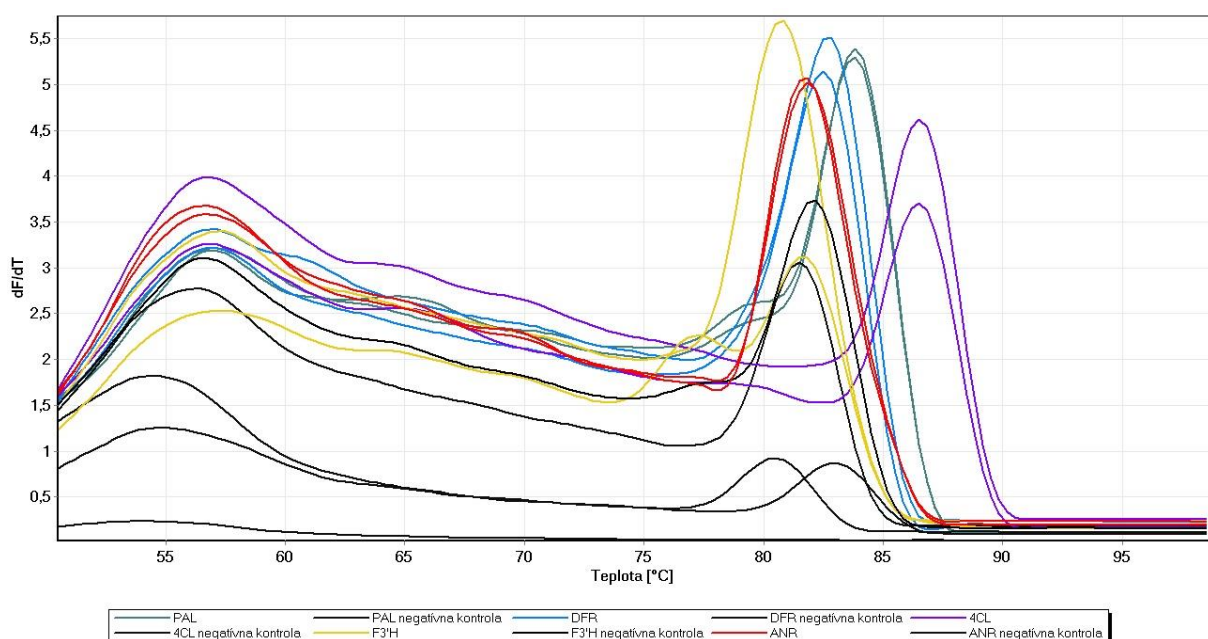
Analýza potvrdila amplifikovateľnosť DNA. Teplota topenia špecifických produktov bola v oboch prípadoch detekovaná pri približne 88 °C a 92 °C (Obrázok 9 a Obrázok 11). Na základe porovnania výsledkov z merania koncentrácie a amplifikačných kriviek (optimálny tvar, vyššia účinnosť reakcie) bol pre nasledujúcu prácu zvolený kit Chemagic DNA Plant. DNA z plodu manga izolovaná týmto kitom bola naďalej využitá pri testovaní primerov špecifických pre mango a ako pozitívna kontrola u qPCR analýz DNA izolovanej z ovocných pyré.

5.1.3 Výber špecifických primerov

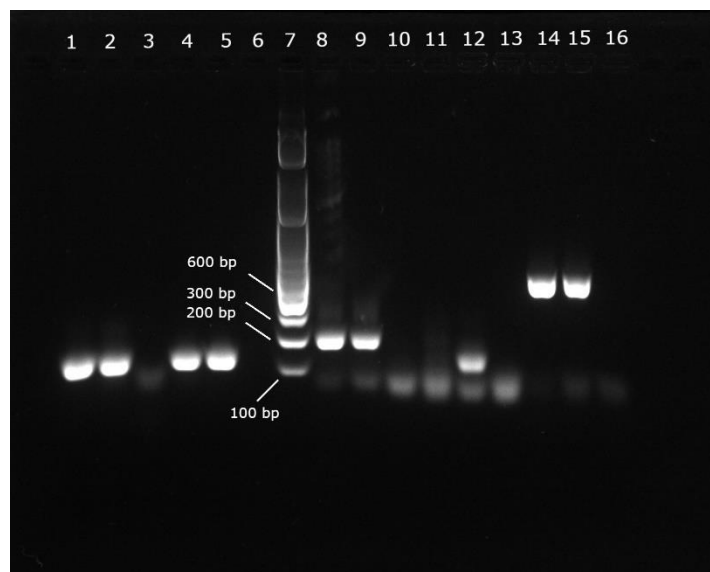
Bolo prevedených päť singleplex qPCR analýz s rôznymi párami primerov, konkr. PAL; ANR; 4CL; DFR a F3'H. Koncentrácia každého primeru v reakčnej zmesi bola $400 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Ich sekvencie uvádza Tabuľka 5. Ako pozitívna kontrola bola použitá DNA manga izolovaná kitom Chemagic DNA Plant s koncentráciou $24,03 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Výsledok qPCR analýzy je zobrazený na Obrázku 12 a Obrázku 13. Následne bola vykonaná agarózová gélová elektroforéza (Obrázok 14).



Obrázok 12: Amplifikačné krivky DNA manga za použitia rôznych primerov



Obrázok 13: Krivky topenia DNA manga za použitia rôznych primerov



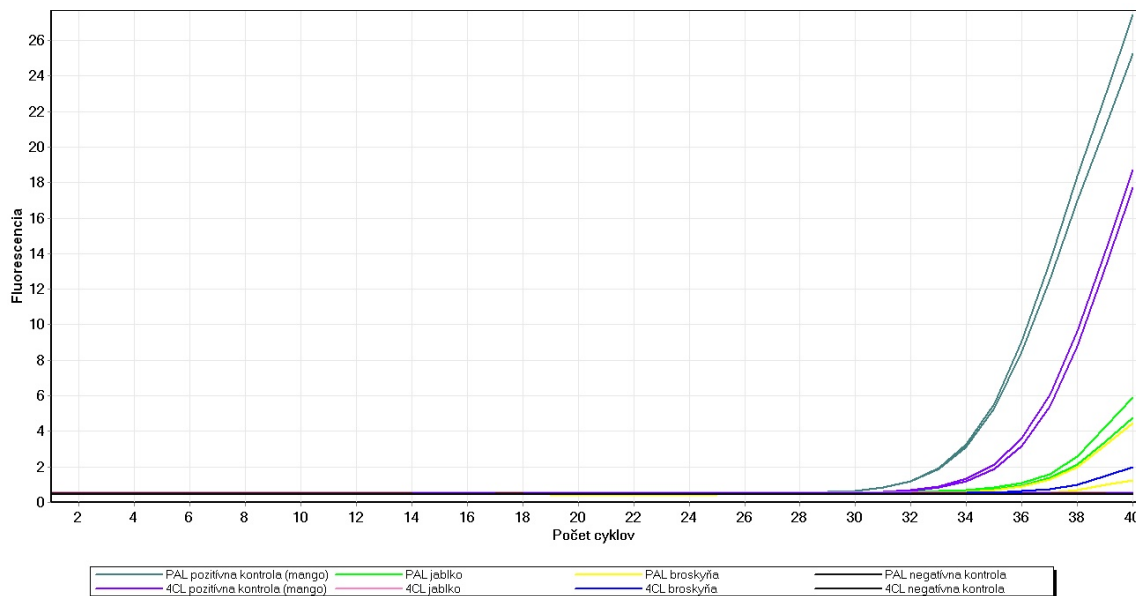
Obrázok 14: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR

Tabuľka 10: Zoznam vzoriek a ich detekcia pre Obrázok 14 (produkt: – nedetekovaný; + detekovaný)

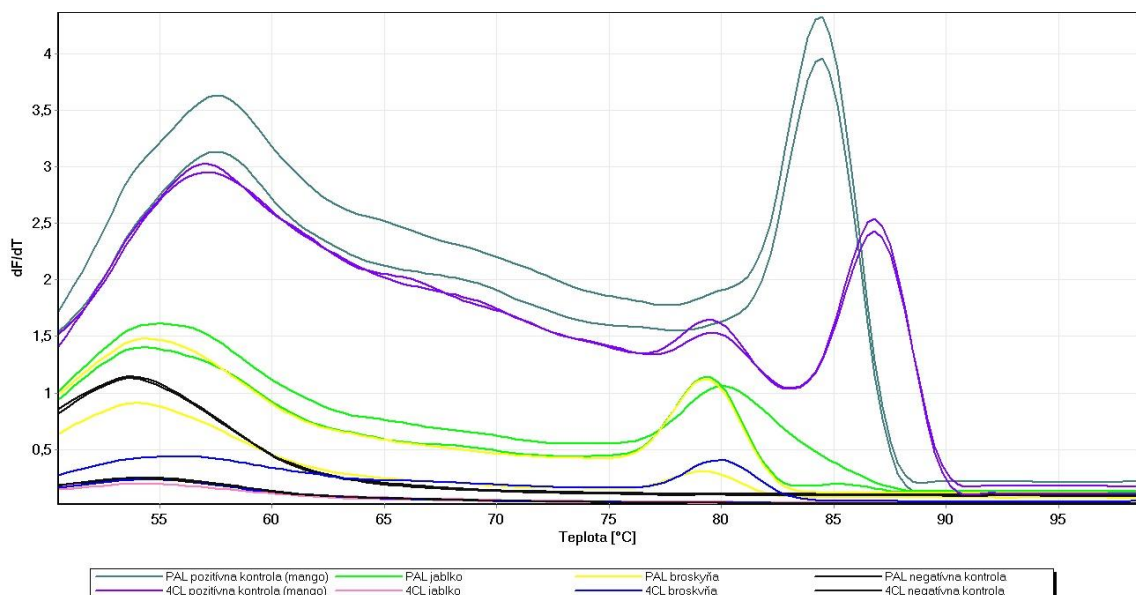
| Číslo vzorky | Vzorka | Detekcia | Číslo vzorky | Vzorka | Detekcia |
|--------------|--------------|----------|--------------|------------|----------|
| 1. | PAL mango | + | 9. | DFR mango | + |
| 2. | | + | 10. | DFR NK | – |
| 3. | PAL NK | – | 11. | F3'H mango | – |
| 4. | 4CL mango | + | 12. | | + |
| 5. | | + | 13. | F3'H NK | – |
| 6. | 4CL NK | – | 14. | ANR mango | + |
| 7. | DNA štandard | – | 15. | | + |
| 8. | DFR mango | + | 16. | ANR NK | – |

Po vyhodnotení výsledkov z qPCR a agarózovej gélovej elektroforézy boli za najvhodnejšie primery vybrané páry PAL a 4CL. Dôvodom je najoptimálnejší tvar amplifikačných kriviek, zhoda dvoch paralelných stanovení a krátka dĺžka fragmentov (približne 100–120 bp). U vzorky č. 11 (pozitívna kontrola s primerom F3'H) nebol detekovaný špecifický produkt, čo je okrem výsledku elektroforézy pozorovateľné aj z tvaru krivky topenia na Obrázku 13 (zhodná s krivkou topenia jednej z negatívnych kontrol). Vo vzorke sa zrejme prejavila kombinácia self-komplementarity primerov a kontaminácia DNA (možno pozorovať z výsledku agarózovej gélovej elektroforézy ako výrazne intenzívnejší band odpovedajúci dimérom primerov).

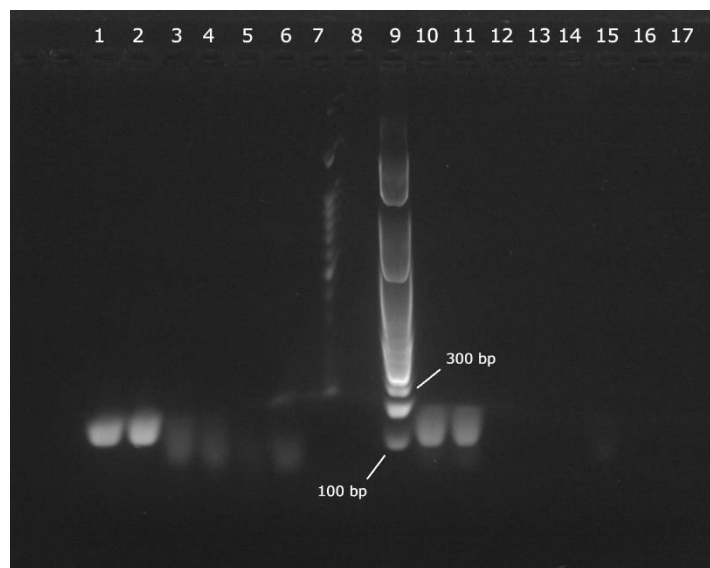
V nasledujúcej qPCR bola overovaná špecifita primerov pre mango. DNA manga bola z $24 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ nariadená na požadovanú koncentráciu $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, ktorá bola použitá ako pozitívna kontrola. Analyzovanými vzorkami bola DNA jablka a broskyne (taktiež s koncentraciami $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). Dôvodom výberu týchto ovocných vzoriek je ich prítomnosť v analyzovaných komerčných pyré. Testovanými primermi boli páry PAL a 4CL na základe predošlej analýzy, oba s koncentraciami $400 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ každého primeru v reakčnej zmesi. Výsledky sú uvedené na Obrázku 15 a Obrázku 16 aj spolu s výsledkom agarózovej gélovej elektroforézy na Obrázku 17.



Obrázok 15: Amplifikačné krivky reakčných zmesí za použitia primerov PAL a 4CL



Obrázok 16: Krivky topenia reakčných zmesí za použitia primerov PAL a 4CL



Obrázok 17: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR

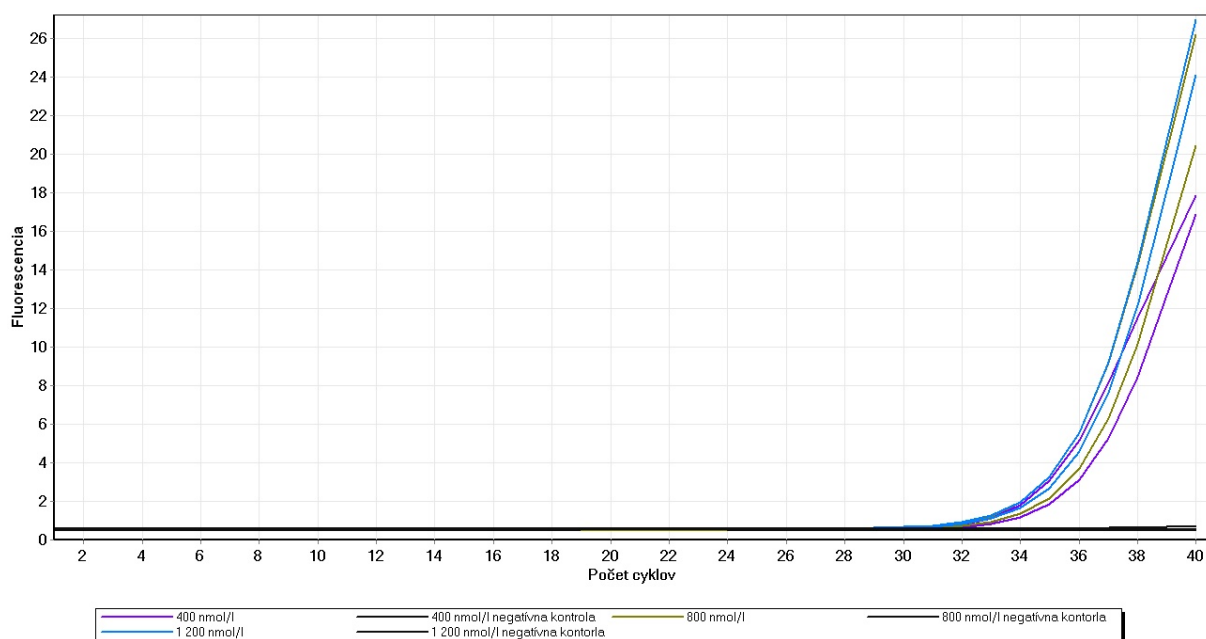
Tabuľka 11: Zoznam vzoriek a ich detekcia pre Obrázok 17 (produkt: – nedetekovaný; + detekovaný)

| Číslo vzorky | Vzorka | Detekcia | Číslo vzorky | Vzorka | Detekcia |
|--------------|--------------|----------|--------------|--------------|----------|
| 1. | PAL PK mango | + | 10. | 4CL PK mango | + |
| 2. | | + | 11. | | + |
| 3. | PAL jablko | – | 12. | 4CL jablko | – |
| 4. | | – | 13. | | – |
| 5. | PAL broskyňa | – | 14. | PAL broskyňa | – |
| 6. | | – | 15. | | – |
| 7. | PAL NK | – | 16. | PAL NK | – |
| 8. | | – | 17. | | – |
| 9. | DNA štandard | – | | | |

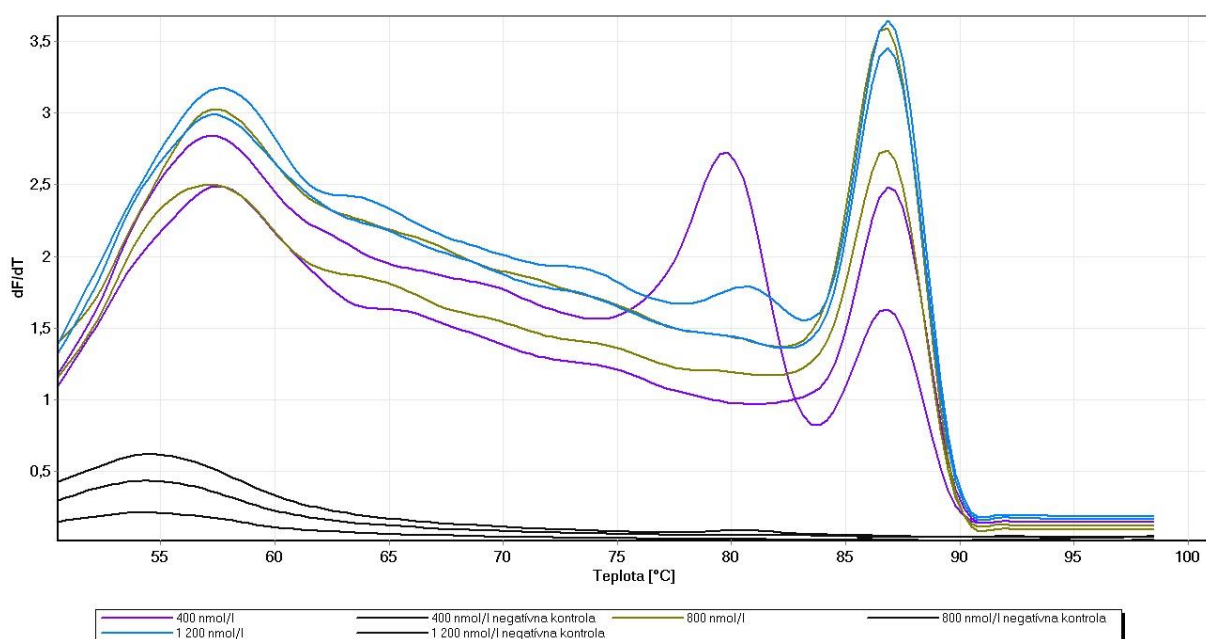
Aj napriek tomu, že u PAL bola dosiahnutá vyššia účinnosť reakcie, boli tieto primery vyhodnotené ako nevyhovujúce. Dôvodom bola, okrem väčšieho množstva vzniknutých dimérov (výsledok agarózovej gélovej elektroforézy), predovšetkým nedostatočná špecificita – na Obrázku 16 je možné pozorovať u primerov PAL malé množstvo vzniknutého produktu s teplotou topenia približne 85 °C u vzorky jablka. Na nasledujúcu analýzu boli preto vybrané primery 4CL.

5.1.4 Optimalizácia koncentrácie primerov

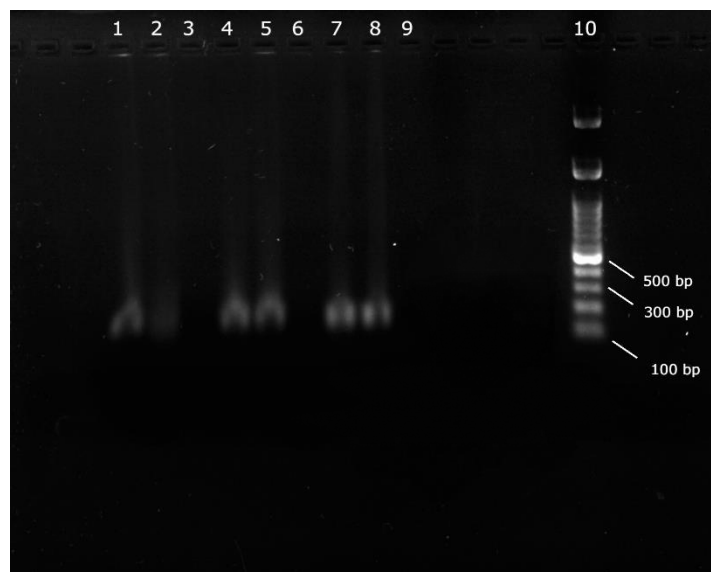
U zvoleného páru primerov – 4CL boli pripravené reakčné zmesi pre qPCR o troch rôznych koncentráciách ($400 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$; $800 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$; $1\,200 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Pomer jednotlivých komponentov znázorňuje Tabuľka 4. Ako pozitívna kontrola bola použitá DNA munga s koncentráciou $5 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Po qPCR reakcii bola prevedená agarózová gélová elektroforéza. Všetky výsledky sú zhrnuté na Obrázku 18, 19 a 20.



Obrázok 18: Amplifikačné krivky amplicónov s troma rôznymi koncentraciami primerov 4CL



Obrázok 19: Krivky topenia amplicónov s troma rôznymi koncentraciami primerov 4CL



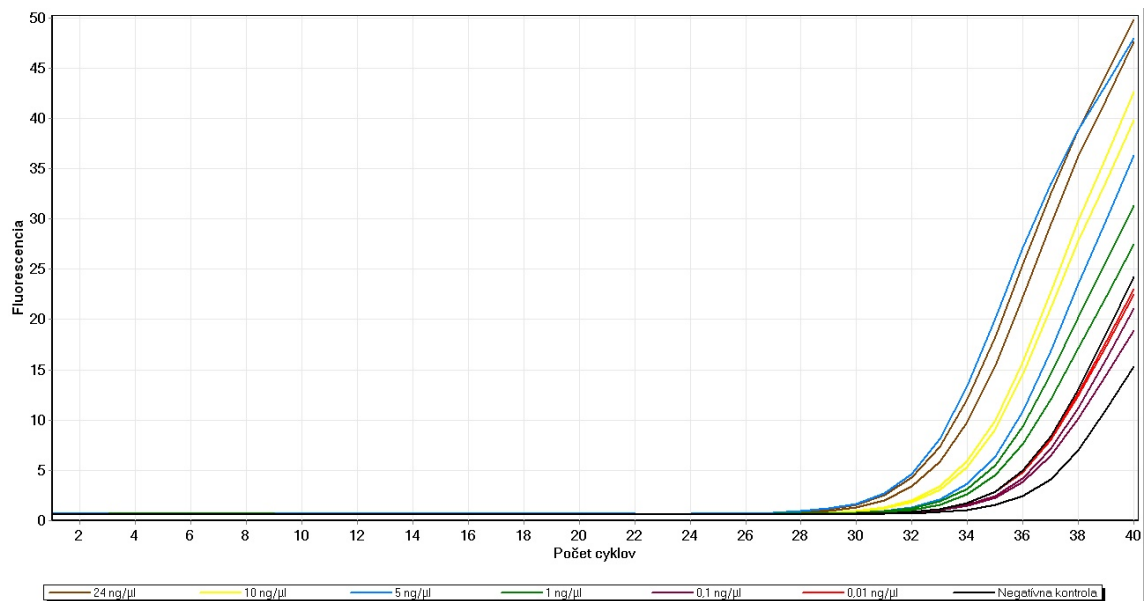
Obrázok 20: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR

Tabuľka 12: Zoznam vzoriek a ich detekcia pre Obrázok 20 (produkt: – nedetekovaný; + detekovaný)

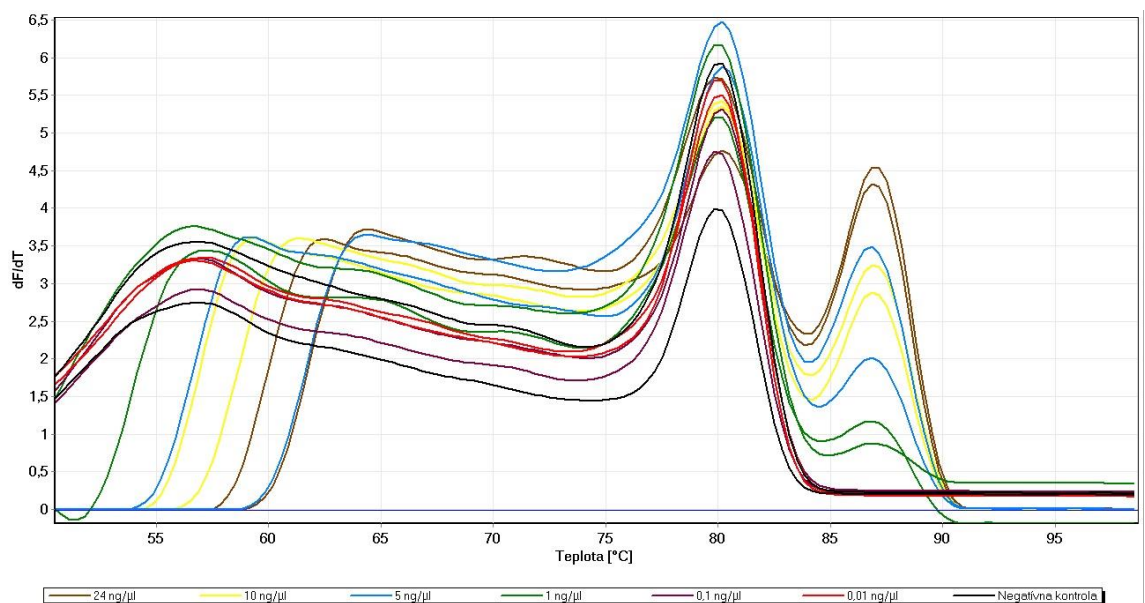
| Číslo vzorky | Vzorka | Detekcia | Číslo vzorky | Vzorka | Detekcia |
|--------------|-----------------------------|----------|--------------|-------------------------------|----------|
| 1. | PK 400 nmol·l ⁻¹ | + | 6. | NK 800 nmol·l ⁻¹ | – |
| 2. | | + | 7. | PK 1 200 nmol·l ⁻¹ | + |
| 3. | NK 400 nmol·l ⁻¹ | – | 8. | | |
| 4. | PK 800 nmol·l ⁻¹ | + | 9. | NK 1 200 nmol·l ⁻¹ | – |
| 5. | | + | 10. | DNA štandard | – |

Na základe amplifikačných kriviek a kriviek topenia bola vybraná vzorka s najvhodnejšou koncentráciou primerov, ktorá obsahovala v reakčnej zmesi 3 µl každého primeru – teda vzorka s koncentráciou 1 200 nmol·l⁻¹. Dôvodom je najväčšia účinnosť reakcie.

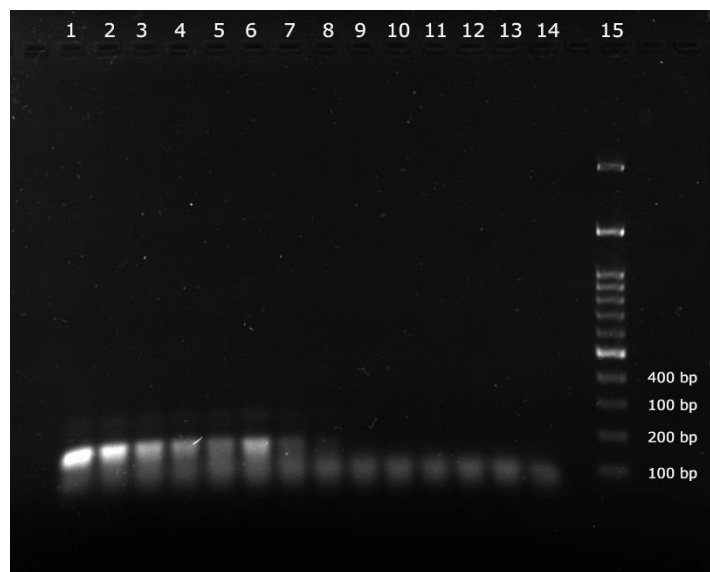
Po výbere optimálnej koncentrácie primerov sa zisťovalo, aké najnižšie množstvo DNA dokážu detekovať. Za týmto účelom bola DNA z plodu manga nariedená na tieto koncentrácie: 10 ng·µl⁻¹; 1 ng·µl⁻¹; 0,1 ng·µl⁻¹ a 0,01 ng·µl⁻¹. Na analýzu bola, okrem nariedených, použitá aj koncentrácia 5 ng·µl⁻¹ zhotovená v predošlom meraní a taktiež pôvodná koncentrácia 24 ng·µl⁻¹. Na základe predošlej analýzy bola zvolená koncentrácia primerov 4CL 1 200 nmol·l⁻¹ (táto koncentrácia je používaná aj vo všetkých nasledujúcich analýzách s primermi 4CL). Obrázok 21 a Obrázok 22 zobrazujú výsledok qPCR, Obrázok 23 výsledok agarózovej gélovej elektroforézy.



Obrázok 21: Amplifikačné krivky reakčných zmesí s rôznou koncentráciou DNA



Obrázok 22: Krivky topenia reakčných zmesí s rôznou koncentráciou DNA



Obrázok 23: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR

Tabuľka 13: Zoznam vzoriek a ich detekcia pre Obrázok 23 (produkt: – nedetekovaný; + detekovaný)

| Číslo vzorky | Vzorka | Detekcia | Číslo vzorky | Vzorka | Detekcia |
|--------------|------------------------|----------|--------------|--------------------------|----------|
| 1. | PK mango | + | 9. | PK mango | – |
| 2. | 24 ng·μl ⁻¹ | + | 10. | 0,1 ng·μl ⁻¹ | – |
| 3. | PK mango | + | 11. | PK mango | – |
| 4. | 10 ng·μl ⁻¹ | + | 12. | 0,01 ng·μl ⁻¹ | – |
| 5. | PK mango | + | 13. | NK | – |
| 6. | 5 ng·μl ⁻¹ | + | 14. | | – |
| 7. | PK mango | + | 15. | DNA štandard | – |
| 8. | 1 ng·μl ⁻¹ | + | | | |

U kriviek topenia možno pozorovať vznik dimérov primerov s teplotou topenia približne 80 °C. Teplota topenia špecifického produktu bola detekovaná pri približne 87 °C u vzoriek s koncentráciou vyššou ako 1 ng·μl⁻¹ vrátane. Okrem kriviek topenia na Obrázku 22 tomu nasvedčuje aj výsledok agarózovej gélovej elektroforézy.

5.2 Komerčné výrobky

5.2.1 Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty izolovanej DNA

Po izolácii DNA kitom Chemagic DNA Plant bola odmeraná koncentrácia a čistota DNA získanej z lyofilizovaných vzoriek komerčných výrobkov detských pyrė. Všetky výsledky sú uvedené v Tabuľke 14.

Koncentrácie DNA izolovanej z pyrė od Nestle a Hello sú takmer rovnako vysoké, zatiaľ čo koncentrácia DNA izolovanej z pyrė Lupilu je nepatrne nižšia. Výsledné namerané koncentrácie u komerčných výrobkov sú niekoľkonásobne nižšie ako koncentrácia DNA izolovanej z plodu manga (Tabuľka 8 a Tabuľka 9). Dôvodom môžu byť prídavné látky v komerčných výrobkoch (polysacharidy, ktoré môžu prostredníctvom svojej chemickej štruktúry napodobňovať správanie DNA a viazať na seba magnetické nosiče namiesto nej), taktiež fakt, že sú v obchodných reťazcoch skladované dlhú dobu v nechladených priestoroch. Veľký vplyv má aj kyslosť detských pyrė – DNA v kyslom prostredí degraduje [61].

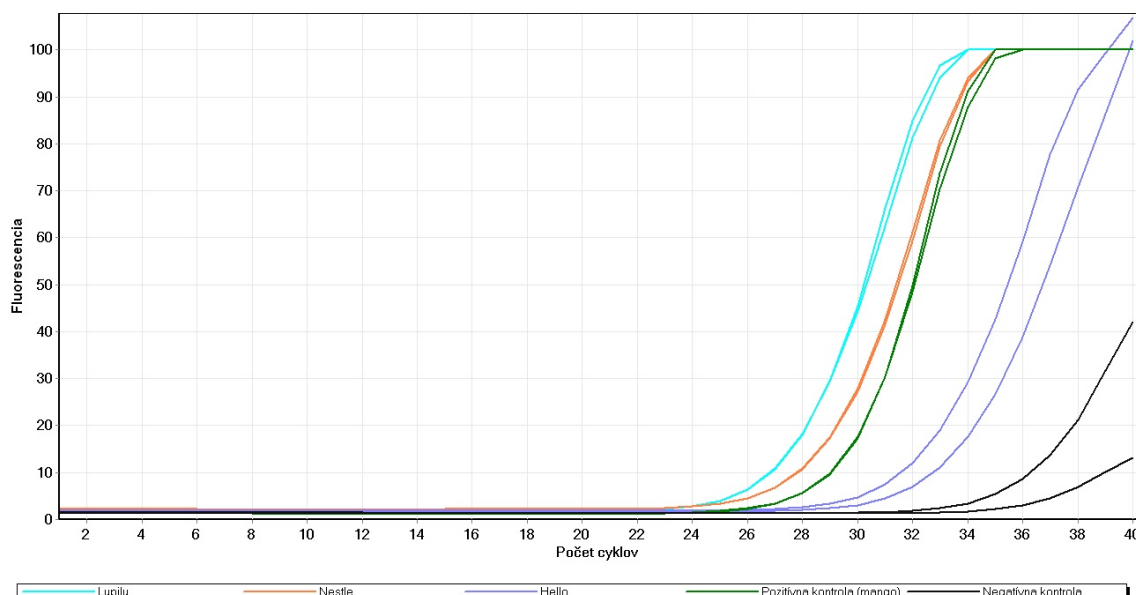
DNA u všetkých skúmaných vzoriek na základe pomeru absorbancií $A_{260/280}$ možno vyhodnotiť ako znečistenú proteínmi, keďže hodnoty sú nižšie ako 1,8. Nízke hodnoty absorbancií $A_{260/230}$ vykazujú znečistenie vzoriek polyfenolickými látkami či zbytkami činidiel izolačného kitu. Aj u tohto pomeru je požadovaná hodnota pre čistú DNA približne 1,8.

Tabuľka 14: Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty DNA izolovanej z komerčných výrobkov

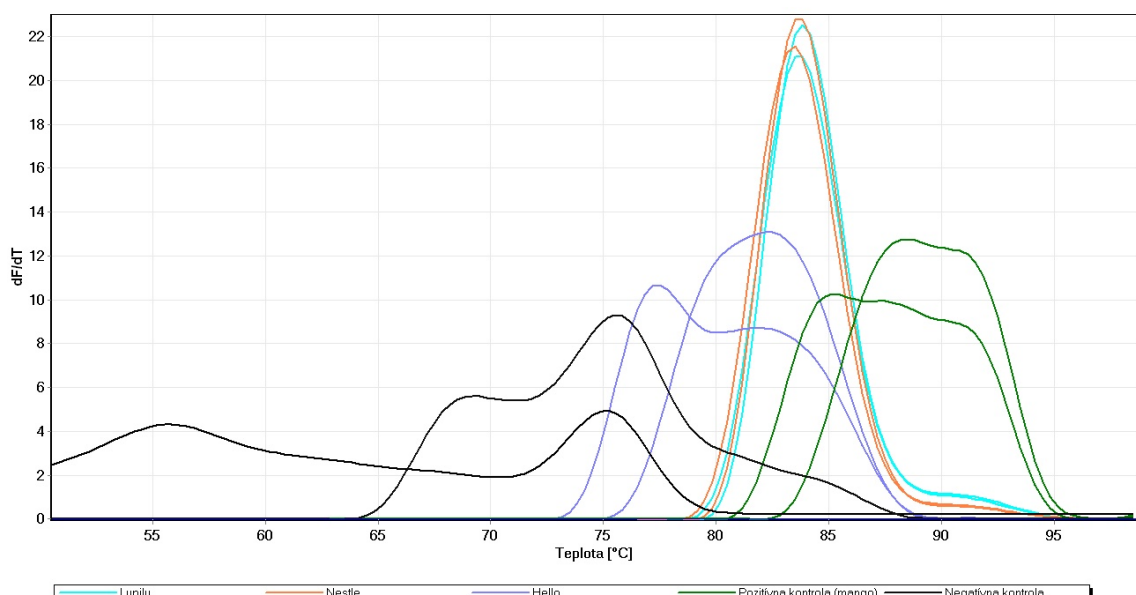
| Číslo merania | Názov vzorky | c [ng·μl ⁻¹] | $A_{260/280}$ | $A_{260/230}$ |
|-------------------|--------------|--------------------------|---------------|---------------|
| 1. | Lupilu | 3,30 | 1,19 | 0,34 |
| 2. | | 3,00 | 1,15 | 0,33 |
| 3. | | 3,30 | 1,01 | 0,35 |
| Priemerná hodnota | | 3,20 | | |
| 1. | Nestle | 5,80 | 1,24 | 0,47 |
| 2. | | 5,30 | 1,21 | 0,45 |
| 3. | | 5,70 | 1,26 | 0,45 |
| Priemerná hodnota | | 5,60 | | |
| 1. | Hello | 5,50 | 1,35 | 0,38 |
| 2. | | 5,60 | 1,25 | 0,35 |
| 3. | | 5,40 | 1,22 | 0,37 |
| Priemerná hodnota | | 5,50 | | |

5.2.2 Overenie amplifikovateľnosti

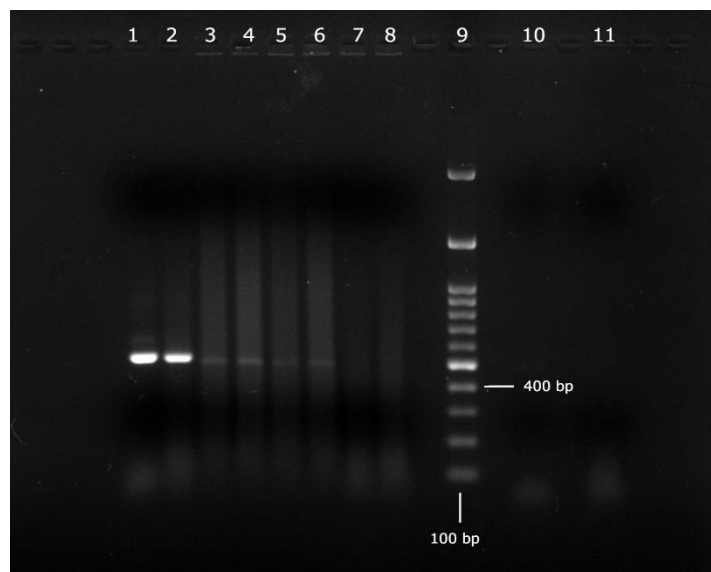
U jednotlivých vzoriek DNA izolovanej z komerčných výrobkov boli na overenie amplifikovateľnosti taktiež použité primery špecifické pre rastlinnú DNA – ITS2. Ako pozitívna kontrola bola využitá zriedená DNA plodu manga ($1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). Výsledky qPCR analýzy a agarózovej gélovej elektroforézy sú zobrazené na Obrázku 24, 25 a 26.



Obrázok 24: Amplifikačné krivky reakčných zmesí komerčných výrobkov s primerom ITS2



Obrázok 25: Krivky topenia reakčných zmesí komerčných výrobkov s primerom ITS2



Obrázok 26: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR

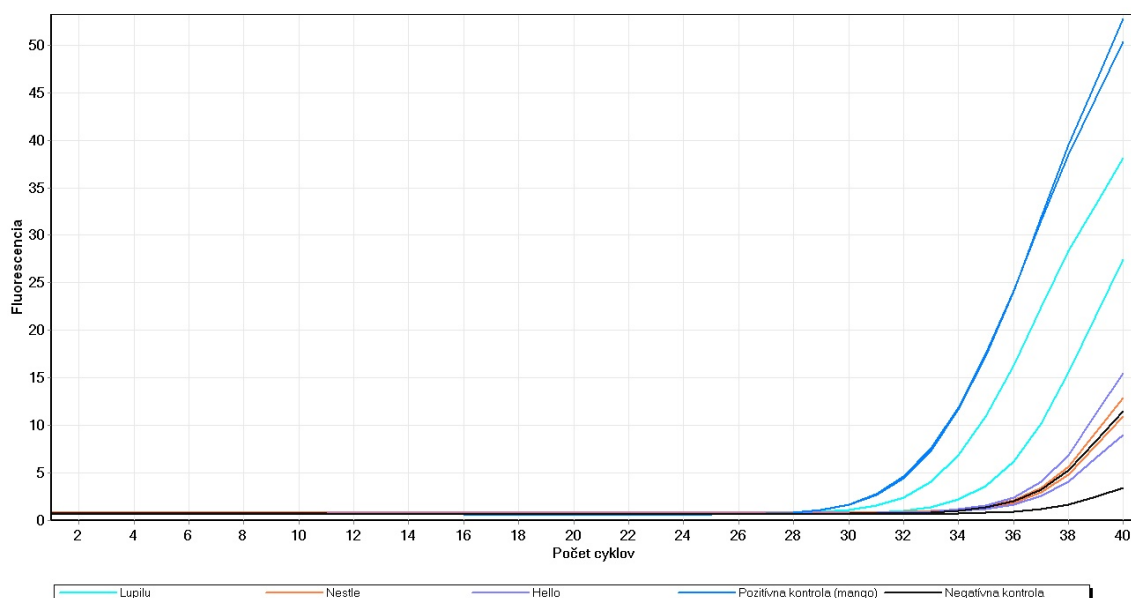
Tabuľka 15: Zoznam vzoriek a ich detekcia pre Obrázok 26 (produkt: – nedetekovaný; + detekovaný)

| Číslo vzorky | Vzorka | Detekcia | Číslo vzorky | Vzorka | Detekcia |
|--------------|----------|----------|--------------|--------------|----------|
| 1. | PK mango | + | 7. | Hello | – |
| 2. | | + | 8. | | – |
| 3. | Lupilu | + | 9. | DNA štandard | – |
| 4. | | + | 10. | NK | – |
| 5. | Nestle | + | 11. | | |
| 6. | | + | | | |

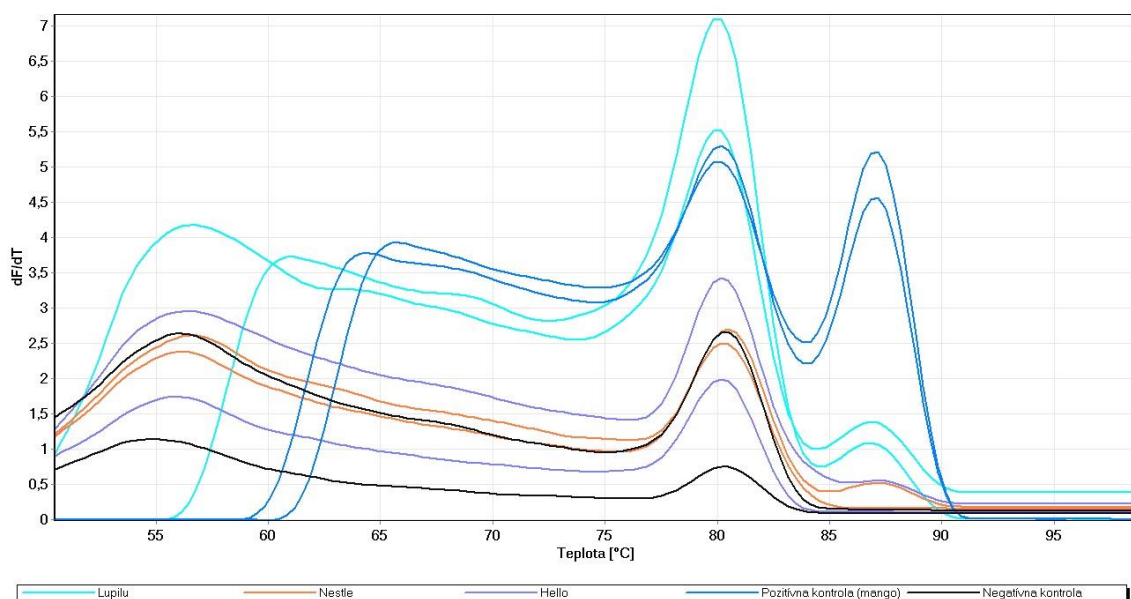
Na analýze kriviek topenia možno pozorovať vznik množstva dimérov primerov, pričom špecifický produkt bol detekovaný pri teplote približne 91 °C. To ale nemožno povedať o detskom pyrė Hello – u tejto vzorky DNA nebola amplifikovaná, čo bolo potvrdené aj agarózovou gélovou elektroforézou. Dôvodom môže byť degradácia DNA izolovanej z pyrė Hello, mohla byť teda rozbitá na kratšie kúsky než DNA zvyšných dvoch pyrė.

5.2.3 Dôkaz prítomnosti manga

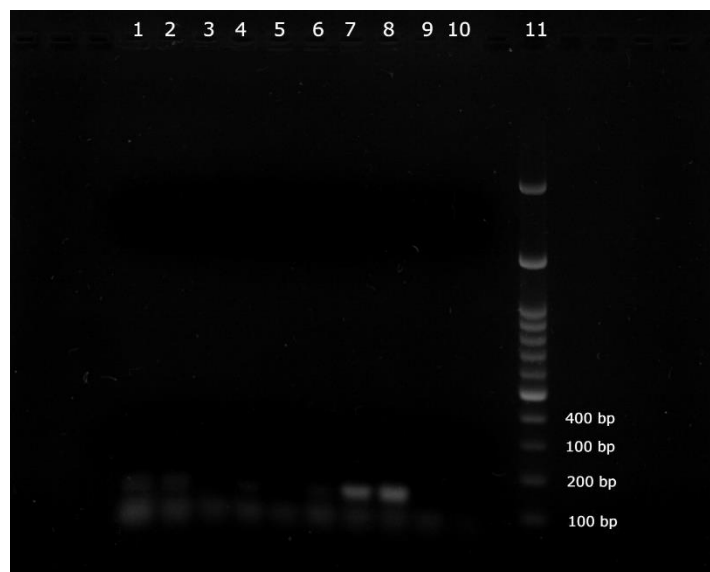
Bola uskutočnená qPCR analýza so špecifickým primerom pre mangovú DNA – 4CL. Ako pozitívna kontrola bola použitá DNA plodu manga s koncentráciou $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. DNA komerčných výrobkov aj pozitívnej kontroly bola do rekčnej PCR zmesi pipetovaná vo väčšom množstve, namiesto $1 \mu\text{l}$ bolo pridaných $5 \mu\text{l}$, a to z dôvodu nízkej koncentrácie DNA. Pomer jednotlivých komponentov znázorňuje Tabuľka 4. Výsledky sú zaznamenané na Obrázku 27 a Obrázku 28. Po amplifikácii bola prevedená agarózová gélová elektroforéza (Obrázok 29).



Obrázok 27: Amplifikačné krivky DNA komerčných výrobkov



Obrázok 28: Krivky topenia DNA komerčných výrobkov



Obrázok 29: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR

Tabuľka 16: Zoznam vzoriek a ich detekcia pre Obrázok 29 (produkt: – nedetekovaný; + detekovaný)

| Číslo vzorky | Vzorka | Detekcia | Číslo vzorky | Vzorka | Detekcia |
|--------------|--------|----------|--------------|--------------|----------|
| 1. | Lupilu | + | 7. | PK mango | + |
| 2. | | + | 8. | | + |
| 3. | Nestle | – | 9. | NK | – |
| 4. | | + | 10. | | – |
| 5. | Hello | – | 11. | DNA štandard | – |
| 6. | | + | | | |

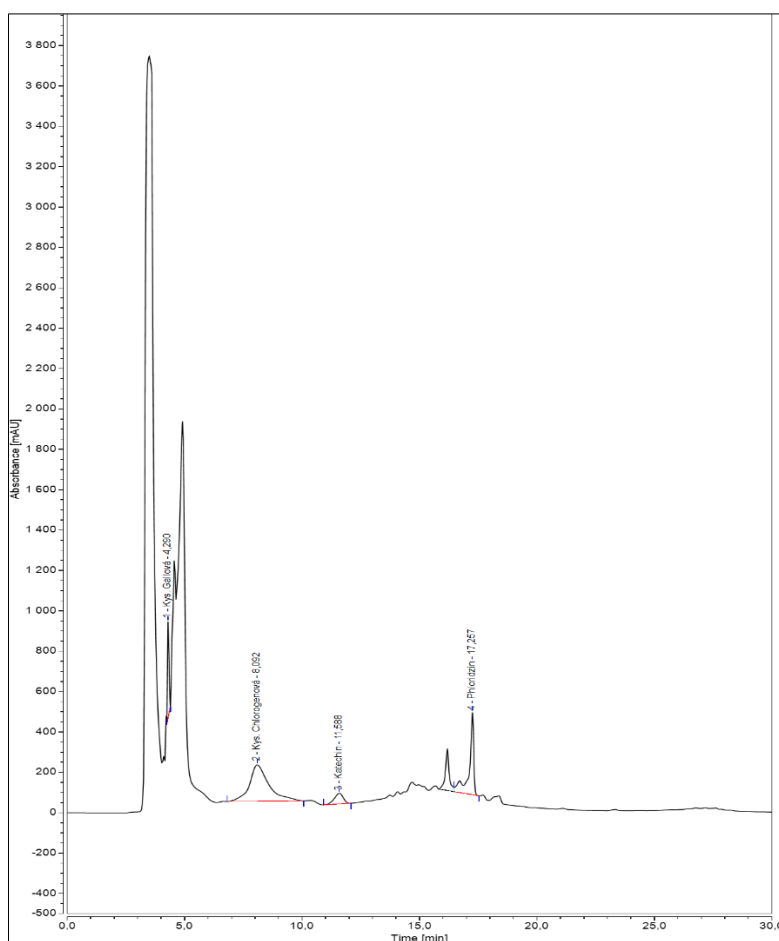
U kriviek topenia možno pozorovať vznik dimérov primerov s teplotou topenia približne 80 °C. Špecifický produkt bol detekovaný pri približne 87 °C, a to u oboch paralelných pozitívnych kontrol a u detského pyrú Lupilu. Len v jednom z dvoch paralelných stanovaní u Nestle a Hello bol detekovaný špecifický produkt. Výsledok elektroforézy tieto tvrdenia potvrdil. Najpravdepodobnejším dôvodom nedetekovaného produktu u vzoriek č. 3 a 5 môže byť inhibícia DNA polymerázy v dôsledku kontaminácie DNA (Tabuľka 14). Analýza s primermi 4CL vyvrátila výsledok predošlého merania u vzorky Hello, keďže DNA bola nie len amplifikovateľná, no taktiež v nej bol detekovaný aj špecifický produkt.

5.2.4 HPLC

Podľa potupu uvedenom v kapitole 4.3.5 boli vzorky komerčných detských pyrú podrobené HPLC analýze. Na základe retenčných časov a UV spektier boli identifikované isté fenolické látky, ktoré sú uvedené v Tabuľke 17. Na Obrázku 30 je znázornený výsledok HPLC analýzy komerčného pyrú Lupilu, u ktorého bolo identifikovaných najviac fenolických látok.

Tabuľka 17: Zoznam fenolických látok identifikovaných v jednotlivých komerčných vzorkách detského pyrú (látka: – nedetekovaná; + detekovaná)

| Detekovaná látka | Lupilu | Nestle | Hello |
|-----------------------|--------|--------|-------|
| Kyselina gallová | + | + | – |
| Kyselina chlorogenová | + | – | – |
| Katechín | + | – | – |
| Florizín | + | – | – |



Obrázok 30: Chromatogram komerčného pyrú Lupilu

Na základe predošlých štúdií je špecifickou látkou pre mango kyselina ellagová a predovšetkým mangiferín, ktoré v komerčných pyrú detekované neboli. Vzhľadom ku pomerne nízkemu počtu detekovaných látok možno usúdiť, že zvolená extrakčná metóda zrejme nie je postačujúca a je potreba ju optimalizovať tak, aby bol extrakt koncentrovanejší [62].

5.3 Modelové zmesi

5.3.1 Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty izolovanej DNA

DNA z replík detských pyr é a čistého ovocia bola izolovaná a jej koncentrácia bola odmeraná obdobným spôsobom ako v predošlých prípadoch.

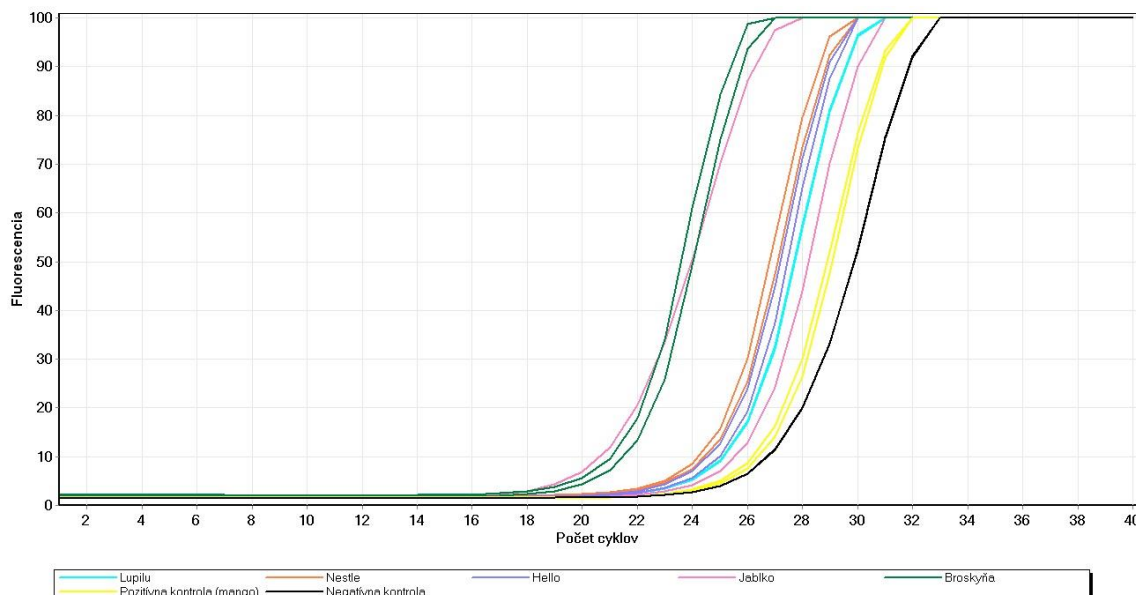
U replík boli namerané koncentrácie vyššie ako u samotných komerčných výrobkov. Hodnota koncentrácie DNA repliky Nestle (100% mango) nie je zhodná s koncentráciou DNA izolovanej z plodu manga ($24 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). Nižšia hodnota môže byť spôsobená tepelnou úpravou vzorky (DNA varom degraduje), taktiež jej rozmixovaním tyčovým mixérom (poškodenie makromolekúl DNA mechanickou silou). Najnižšia koncentrácia bola zaznamenaná u repliky Hello, čoho príčinou môžu byť prídavné látky – cukor, modifikovaný škrob. Kontaminácia u vzoriek bola očakávaná, prispieť k nej mohol aj fakt, že repliky boli pripravované v domácom prostredí, kde nebolo možné zabezpečiť sterilitu použitého riadu. Na nízkom pomere absorbancií $A_{260/230}$ môže mať, ako aj v predošlých prípadoch, podiel prítomnosť zvyškov činidiel izolačného kitu.

Tabuľka 18: Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty DNA izolovanej z modelových zmesí

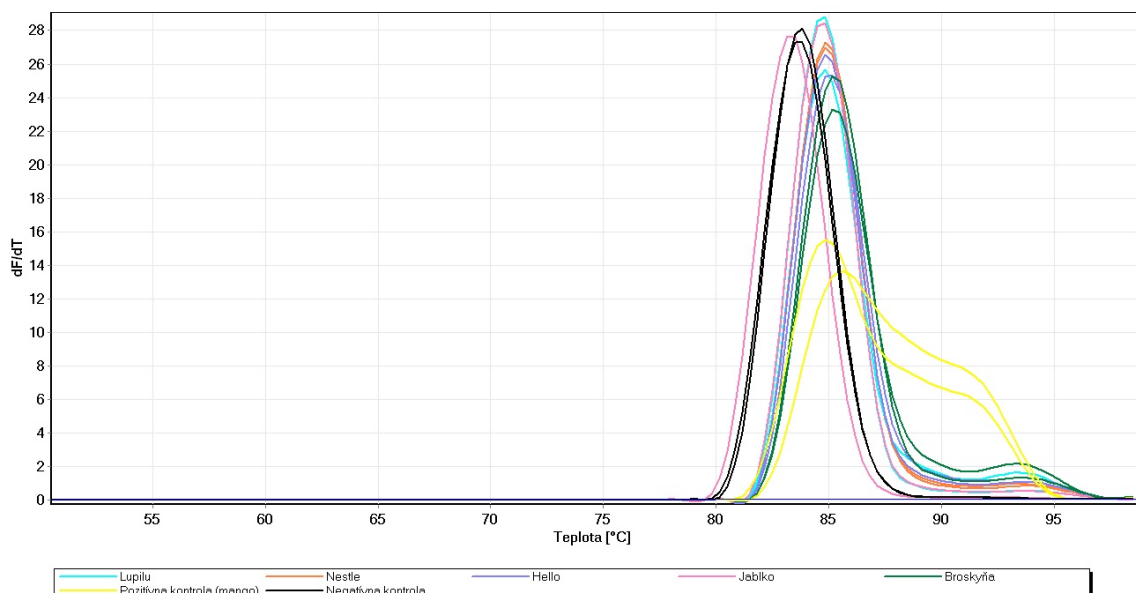
| Číslo merania | Názov vzorky | c [$\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$] | $A_{260/280}$ | $A_{260/230}$ |
|-------------------|----------------|------------------------------------------|---------------|---------------|
| 1. | Replika Lupilu | 14,10 | 1,28 | 0,39 |
| 2. | | 14,60 | 1,29 | 0,40 |
| 3. | | 14,00 | 1,22 | 0,39 |
| Priemerná hodnota | | 14,23 | | |
| 1. | Replika Nestle | 10,20 | 1,22 | 0,39 |
| 2. | | 10,70 | 1,18 | 0,36 |
| 3. | | 10,50 | 1,20 | 0,36 |
| Priemerná hodnota | | 10,47 | | |
| 1. | Replika Hello | 9,30 | 1,36 | 0,48 |
| 2. | | 9,10 | 1,22 | 0,44 |
| 3. | | 9,10 | 1,37 | 0,45 |
| Priemerná hodnota | | 9,17 | | |
| 1. | Jablko | 13,30 | 1,17 | 0,35 |
| 2. | | 13,00 | 1,25 | 0,35 |
| 3. | | 13,10 | 1,20 | 0,36 |
| Priemerná hodnota | | 13,13 | | |
| 1. | Broskyňa | 12,40 | 1,51 | 0,60 |
| 2. | | 12,30 | 1,57 | 0,63 |
| 3. | | 11,90 | 1,53 | 0,63 |
| Priemerná hodnota | | 12,20 | | |

5.3.2 Overenie amplifikovateľnosti

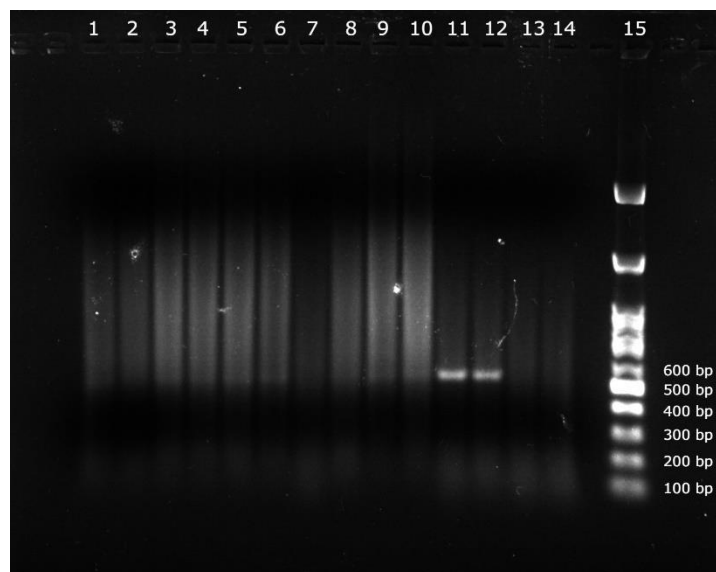
U DNA izolovanej z replík detských pyrô a taktiež čistého ovocia bola najprv overovaná ich amplifikovateľnosť pomocou primerov ITS2. Ako pozitívna kontrola bola použitá DNA manga s koncentráciou $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Amplifikačné krivky reakcie spolu s krivkami topenia sú zobrazené na Obrázku 31 a Obrázku 32. Výsledok agarózovej gélovej elektroforézy je na Obrázku 33.



Obrázok 31: Amplifikačné krivky DNA replík a čistého ovocia s primermi ITS2



Obrázok 32: Krivky topenia DNA replík a čistého ovocia s primermi ITS2



Obrázok 33: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR

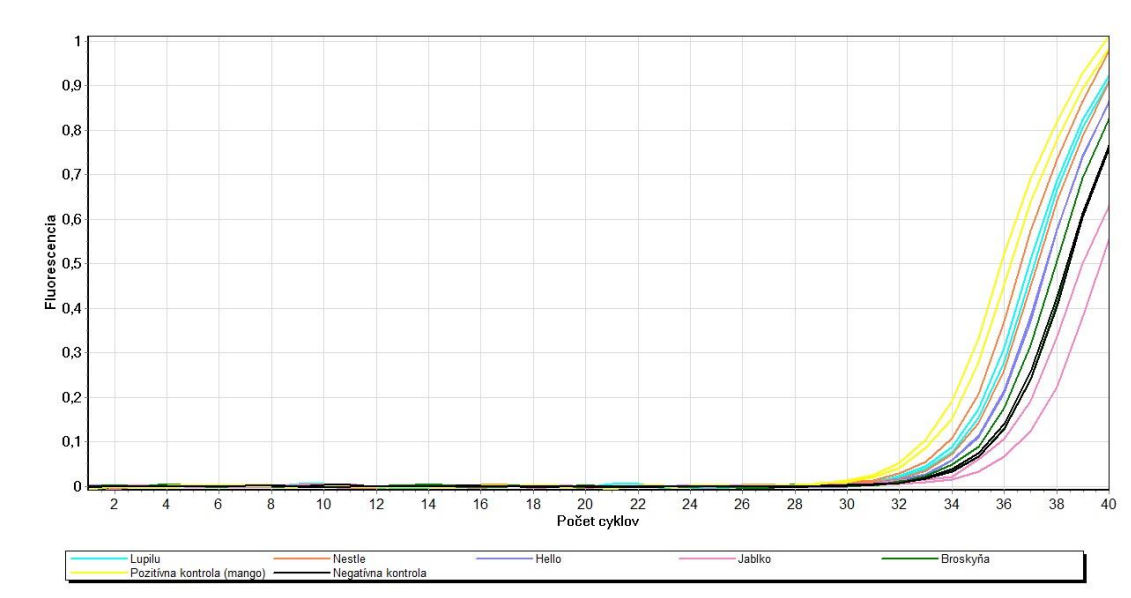
Tabuľka 19: Zoznam vzoriek a ich detekcia pre Obrázok 33 (produkt: – nedetekovaný; + detekovaný)

| Číslo vzorky | Vzorka | Detekcia | Číslo vzorky | Vzorka | Detekcia |
|--------------|----------------|----------|--------------|--------------|----------|
| 1. | Replika Lupilu | – | 9. | Broskyňa | + |
| 2. | | – | 10. | | + |
| 3. | Replika Nestle | – | 11. | PK mango | + |
| 4. | | + | 12. | | + |
| 5. | Replika Hello | + | 13. | NK | – |
| 6. | | + | 14. | | – |
| 7. | Jablko | – | 15. | DNA štandard | – |
| 8. | | – | | | |

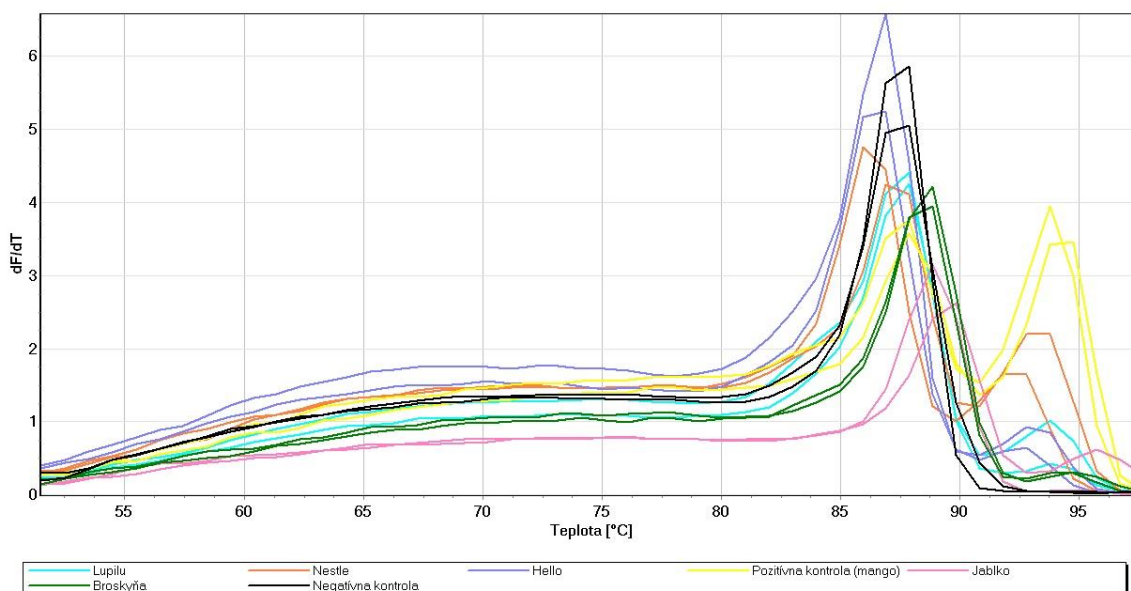
Špecifické produkty sú vidieť na krivkách topenia (Obrázok 32) pri približne 93,5 °C. Produkt bol ale obtiažne detekovateľný elektroforézou, čo znázorňuje Obrázok 33. Analýza potvrdila amplifikovateľnosť v minimálne jednom paralelnom stanovení u každej z analyzovaných vzoriek modelových zmesí.

5.3.3 Dôkaz prítomnosti manga

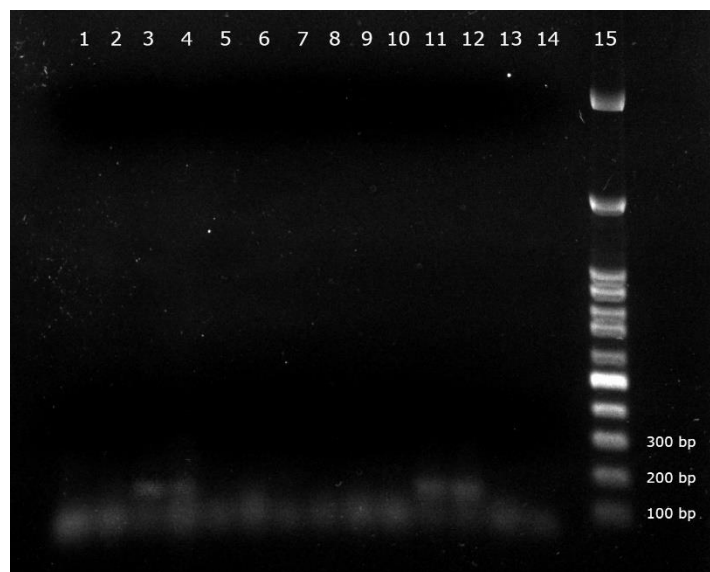
Aj v tomto prípade bola prítomnosť manga overovaná pomocou špecifických primerov 4CL. Okrem vytvorených replík detských pyrô boli analyzované aj vzorky čistého ovocia. Výsledky qPCR sú zobrazené na Obrázku 34 a Obrázku 35. Aj tentoraz bola po qPCR prevedená agarózová gélová elektroforéza s výsledkom na Obrázku 36.



Obrázok 34: Amplifikačné krivky DNA replík a čistého ovocia



Obrázok 35: Krivky topenia DNA replík a čistého ovocia



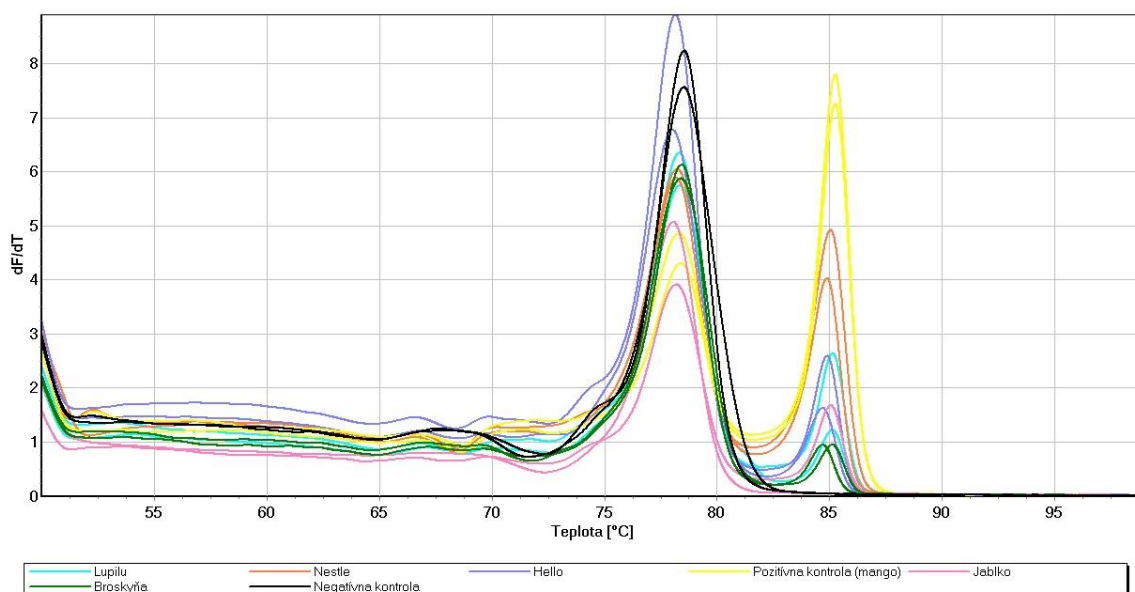
Obrázok 36: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR

Tabuľka 20: Zoznam vzoriek a ich detekcia pre Obrázok 36 (produkt: – nedetekovaný; + detekovaný)

| Číslo vzorky | Vzorka | Detekcia | Číslo vzorky | Vzorka | Detekcia |
|--------------|----------------|----------|--------------|--------------|----------|
| 1. | Replika Lupilu | – | 9. | Broskyňa | – |
| 2. | | – | 10. | | – |
| 3. | Replika Nestle | + | 11. | PK mango | + |
| 4. | | + | 12. | | + |
| 5. | Replika Hello | – | 13. | NK | – |
| 6. | | – | 14. | | – |
| 7. | Jablko | – | 15. | DNA štandard | – |
| 8. | | – | | | |

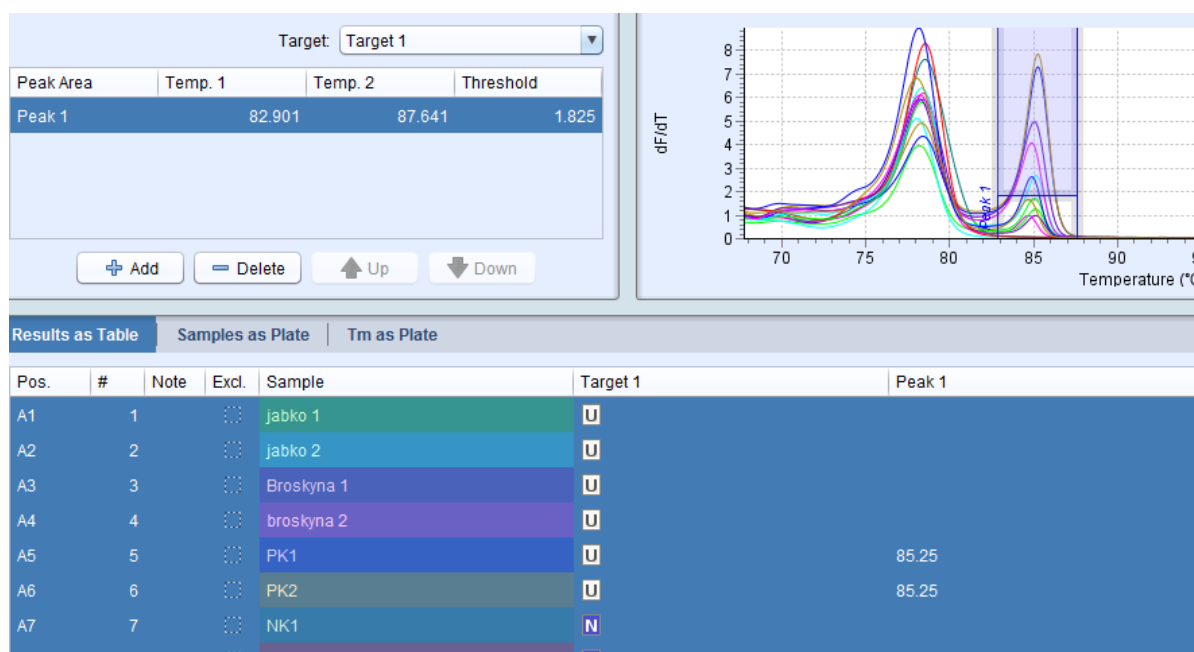
Na krivkách topenia (Obrázok 35) možno pozorovať vznik špecifického produktu s teplotou topenia približne 94 °C u všetkých vytvorených replík, čím v nich bola dokázaná prítomnosť manga. Píky s približne rovnakou teplotou topenia sa však vyskytli aj u vzoriek jablka a broskyne. Gélová elektroforéza u týchto vzoriek nepotvrdila prítomnosť špecifického produktu, no tá nebola potvrdená ani u všetkých vzoriek replík, z čoho možno usúdiť, že produkt bol obtiažne detekovateľný elektroforézou. Z tohto dôvodu boli všetky vzorky podrobené HRM analýze.

Na základe nejasností predošlej analýzy boli všetky vzorky podrobené HRM analýze s cieľom overenia získaných výsledkov. Analýza prebiehala na prístroji LightCycler v rozsahu teplôt 50–99 °C s krokom 0,01 °C/s. Jej výsledok je znázornený na Obrázku 37.



Obrázok 37: Výsledok vysokorozlišovacej analýzy kriviek topenia u DNA replík detského pyrú a čistého ovocia

Na Obrázku 37 sú patrné dvojice pík. Píky s teplotou topenia približne 77–78 °C patria dimérom primerov. Druhé píky s teplotou topenia približne 85 °C sú špecifické amplikóny. Vysokorozlišovacia analýza kriviek topenia okrem výskytu špecifického produktu v replikách zaznamenala slabú nešpecifickú amplifikáciu v jednej z paralelných stanovení vzoriek jablka a v oboch paralelných stanoveniach vzoriek broskyne. Preto bolo potrebné upraviť nulovú líniu píku odpovedajúceho produktu primerov 4CL tak, aby všetky píky s hodnotou dF/dT vo vrchole nižšou ako 1,8 boli považované za šum pozadia (Obrázok 38). Aj po tejto úprave bolo ešte stále možné potvrdiť prítomnosť manga vo všetkých replikách ovocných pyrú.



Obrázok 38: Ukážka nastavenia nulovej línie na cca 1,8

5.3.4 HPLC

Podobne ako komerčné zmesi, aj repliky detských pyr  boli podroben  HPLC analýze podl'a postupu uvedenom v kapitole 4.3.5. Jednotlivé identifikovan  látky sú uveden  v Tabuľke 21. Ani v prípade replik nebola potvrden  pr tornosť fenolických l tkov špecifických pre mango (kyselina ellagová a mangiferín), aj keď mangov  pyr  do modelových výrobkov pridan  bolo. U replik Nestle a Hello nebola detekovan  žiadna z identifikovatel'n ch l tkov. Na základe porovnania s výsledkami HPLC u komerčných zmesí (Tabuľka 17) možno konštatovať, že počet detekovaných l tkov je ešte men i, čo dokazuje nedokonalosť extrakčnej metódy. Tento fakt potvrdzuje aj porovnanie s vedeckým článkom, kde boli okrem špecifických l tkov v du ine manga detekovan  aj mnoh  d'alšie fenolické látky [62].

Tabuľka 21: Zoznam fenolických l tkov identifikovaných v jednotlivých modelových zmesiach detského pyr  a čistom ovocí (látka: – nedetekovan ; + detekovan )

| Detekovaná látka | Replika Lupilu | Replika Nestle | Replika Hello | Jablko | Broskyňa |
|-----------------------|----------------|----------------|---------------|--------|----------|
| Kyselina gallová | + | – | – | – | – |
| Kyselina chlorogenová | – | – | – | – | – |
| Katechín | – | – | – | – | + |
| Floriz n | + | – | – | + | – |

6 ZÁVER

Falšovanie potravín je aktuálnym problémom, ktorý postihuje rôzne potravinárske komodity. Nie je tomu inak ani u detských ovocných pyré, ktoré často falšovaniu podliehajú. Je potrebné a veľmi dôležité optimalizovať metódy s cieľom možného odhalenia falšovania – v tejto práci bola optimalizácia zameraná konkrétne na qPCR s primermi špecifickými pre mango. Optimalizovaná metóda bola následne využitá na dôkaz prítomnosti manga vo vybraných detských príkrmoch. Za týmto účelom boli zakúpené tri komerčné detské pyré obsahujúce mango v rôznom percentuálnom zastúpení. Na analýzu boli pripravené aj ich repliky.

Pred samotnou qPCR analýzou bolo potrebné zvoliť vhodnú metódu izolácie DNA. Boli otestované dva izolačné kity – kolonkový a kit s princípom magnetických nosičov. Pomocou týchto kitov bola z plodu manga izolovaná DNA s následným stanovením jej koncentrácie a overením amplifikovateľnosti. Na základe výsledkov bolo usúdené, že kit s magnetickými nosičmi poskytol lepšie výsledky a tým pádom bol naďalej používaný aj na izoláciu DNA z ovocných pyré.

Jedným z hlavných cieľov práce bol výber a testovanie vhodných primerov na detekciu mangovej DNA vo vzorkách detských pyré. Po testovaniach boli ako najvhodnejšie vybrané primery 4CL s koncentráciou $1\ 200\ \text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ každého primeru v PCR zmesi. Následne bolo zistené, že dokážu detekovať DNA v najmenšom množstve $1\ \text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Použitím týchto primerov sme boli schopní dokázať prítomnosť manga vo všetkých troch komerčných výrobkoch ako aj v ich pripravených replikách.

V závere u HRM analýzy replík detských pyré bola ale pozorovaná nešpecifická amplifikácia vo vzorkách iného ovocia ako manga (jablka a broskyne). Upravením nulovej línie je možné tieto píky považovať za šum pozadia. Z analýzy teda vyplýva, že s daným teplotným profilom PCR reakcie môžeme primery 4CL použiť na detské pyré, kde je vyšší percentuálny obsah manga. U detských pyré s jeho nižším podielom sú dané primery použiteľné, no bolo by potrebné optimalizovať teplotný profil reakcie (pre zvýšenie účinnosti a redukciu nešpecifických produktov). Možným riešením môže prípadne byť okrem zmeny teplotného profilu aj optimalizácia koncentrácie Mg^{2+} iónov alebo nested PCR, ktorá je variáciou štandardnej PCR. Vonkajším párom primerov používaných v prvom kole nested PCR by tak mohli byť primery 4CL, na vzniknutý produkt slúžiaci ako templát by boli použité novonavrnuté primery (vnorený pár primerov), čím by sa zvýšila špecificita analýzy a výtazok požadovaných amplikónov [63, 64].

V rámci inštrumentálnej časti práce boli ako markery prítomnosti manga v ovocných pyré určené dve fenolické látky – mangiferín a kyselina ellagová. U HPLC analýzy však tieto látky neboli detekované. Analýza neposkytla postačujúce výsledky, pričom najväčší podiel na tom má pravdepodobne extrakčná metóda. Pre získanie koncentrovanejších extraktov je potrebné modifikovať postup ich prípravy – napr. odpariť metanol dosucha a rozpustiť zvyšnú frakciu obsahujúcu fenolické látky v menšom objeme rozpúšťadla či predĺžiť ultrazvukovú lázeň. Možnosťou je poprípade tiež zvoliť odlišnú prípravu – napr. použiť iné alebo viaceré organické rozpúšťadlá (acetón, hexán) či zvýšiť teplotu extrakcie. Optimalizácia samotnej HPLC analýzy nie je považovaná za potrebnú, keďže rovnaké parametre použité pri stanovovaní fenolických látok u iných rastlinných vzoriek vykazovali pozitívne výsledky [62, 65, 66].

7 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] STEFOVA, Marina, Ana PETKOVSKA, Sonja UGARKOVIC a Jasmina PETRESKA STANOEVA. Strategy for optimized use of LC-MSn for determination of the polyphenolic profiles of apple peel, flesh and leaves. *Arabian Journal of Chemistry*. 2019, (8), 5180–5186. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2016.12.009
- [2] HAMR, K. a P. CUHRA. Falšování potravin a jeho prokazování, zajímavé případy. *Výživa a potraviny*. 2004, 59(4), 92–93.
- [3] FÜGEL, R., R. CARLE a A. SCHRIEBER. Quality and authenticity control of fruit purées, fruit preparations and jams—a review. *Trends in Food Science & Technology*. 2005, 16(10), 433–441. Dostupné z: doi: 10.1016/j.tifs.2005.07.001
- [4] KRÁLOVCOVÁ, Petra, Eliška MATYÁŠOVÁ a Jiří MAYER. *Jídlo jako jed, jídlo jako lék*. Praha: Tarsago Česká republika, 2016. ISBN 978-80-7406-317-6.
- [5] Mango (*Mangifera indica* L.). YAHIA, Elhadi. *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits*. Mexico: Woodhead Publishing, 2011, s. 492–567. ISBN 9781845697334.
- [6] SCHIEBER, Andreas. Introduction to Food Authentication. *Modern Techniques for food Authentication*. 2018, 1–21. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814264-6.00001-3
- [7] KUBÁŇ, Vlastimil a Petr KUBÁŇ. *Analýza potravin*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. ISBN 978-80-7375-036-7.
- [8] ČÍŽKOVÁ, Helena, Rudolf ŠEVČÍK, Aleš RAJCHL, Jan PIVOŇKA a Michal VOLDŘICH. Trendy v Autenticitě potravin a v přístupech k detekci falšování. *Chemické listy*. 2012, 106(10), 903–910
- [9] SALEEM DAR, M., P. OAK, H. CHIDLEY, A. DESHPANDE, A. GIRI a V GUPTA. Nutrient and Flavor Content of Mango (*Mangifera indica* L.) Cultivars. SIMMONDS, M. a V. PREEDY. *Nutritional Composition of Fruit Cultivars*. India: Academic Press, 2016, 445–467. ISBN 9780124081178.
- [10] DRDÁK, Milan a kol. *Základy potravinářských technologií*. Bratislava: Malé centrum, 1996. ISBN 80-967064-1-1.
- [11] KOŽÍŠEK, František. Je vodovodní voda vhodná pro kojence? *SOVAK*. Státní zdravotní ústav v Praze, 2005, 14(11), 5–6.
- [12] ODSTRČIL, Jaroslav a Milada ODSTRČILOVÁ. *Chemie potravin*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2006. ISBN 80-7013-435-6.
- [13] ČÍŽKOVÁ, H., R. ŠEVČÍK, A. RAJCHL a M. VOLDŘICH. Nutritional Quality of Commercial Fruit Baby Food. *Czech Journal of Food Sciences*. 2009, 27(1), 134–137. Dostupné z: doi: 10.17221/616-CJFS. ISSN 12121800.
- [14] KADLEC, Pavel, Karel MELZUCH, Michal VOLDŘICH a FAKULTA POTRAVINÁŘSKÉ A BIOCHEMICKÉ TECHNOLOGIE. *Přehled tradičních potravinářských výrob*. Ostrava: Key Publishing, 2012. ISBN 978-80-7418-145-0.
- [15] KADLEC, Pavel a kol. *Technologie potravin I*. Praha: VŠCHT Praha, 2007. ISBN 80-7080-509-9.

- [16] LÁNSKÁ, Dagmar. *Ovoce na stovky chutí*. Velké Bílovice: TeMi CZ, 2009. ISBN 978-80-87156-34-6.
- [17] SCHLETT, Siegfried. *100 potravin pro zdraví*. Praha: Ikar, 2008. ISBN 978-80-249-0991-2.
- [18] OBERBEIL, Klaus a Christiane LENTZOVÁ. *Ovocie a zelenina ako liek*. Fortuna Libri SK, 2001. ISBN 8088980429.
- [19] MANDŽUKOVÁ, Jarmila. *Léčivá síla vitaminů, minerálů a dalších látek*. Benešov: Start, 2005. ISBN 80-86231-36-4.
- [20] JURČÁK, Jaroslav. *Komentovaný atlas anatomie vyšších rostlin*. Třebíč: Radek Veselý, 2007. ISBN 80-86376-39-4.
- [21] VICIANOVÁ, Katarína, Lucia ZAMIEŠKOVÁ a Jana ŽIAROVSKÁ. Parametre výťažnosti a čistoty DNA pri rôznych typoch homogenizácie dužín ovocia. In: FIALKOVÁ, Veronika a Jana BILČÍKOVÁ. *Recenzovaný zborník vedeckých prác Výskumného centra AgroBioTech 2019*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2019, 45–54. ISBN 978-80-552-2053-6. Dostupné z: doi:10.15414/2019.978805520536.p7
- [22] NAVRÁTILOVÁ, Božena, Dagmar SKÁLOVÁ a Radim J. VAŠUT. *Poznáваме listy dřevin: Morfologie a anatomie listů dřevin Botanické zahrady Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci*. Olomouc: Vydavatelství Univerzity Palackého v Olomouci, 2009. ISBN 978-80-244-2440-8.
- [23] SLABÝ, Karel a Petra KREJČÍ. *Anatomie a morfologie rostlin*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2005. ISBN 978-80-7157-873-4.
- [24] SIMPSON, Michael G. PLANT ANATOMY AND PHYSIOLOGY. *Plant systematics*. 3rd edition. California: Academic Press, 2019, 537 – 566. ISBN 978-0128126288.
- [25] VINTER, Vladimír. *Rostliny pod mikroskopem: Základy anatomie cévnatých rostlin*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2009. ISBN 978-80-244-2223-7.
- [26] SLAVÍKOVÁ, Zdeňka. *Morfologie rostlin*. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 80-246-0327-6.
- [27] GBELCOVÁ, Hana, Vanda REPISKÁ a Ivana SHAWKATOVÁ. *Nukleové kyseliny a proteíny: Analytické metody a postupy*. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave, 2017. ISBN 978-80-223-4472-2.
- [28] KYLE, R. A. a M. SHAMPO. Wilkins, Crick, and Watson: Nobel Prize for Work on the Structure of DNA. *Mayo Clinic Proceedings*. 1998, **73**(4), 362. Dostupné z: doi:10.1016/S0025-6196(11)63703-8
- [29] Introduction to the Structure, Properties, and Reactions of DNA. SINDEN, Richard R. *DNA Structure and Function*. Houston, Texas: Academic Press, 1994, s. 1–57. ISBN 978-0-08-057173-7.
- [30] *Lumen: Microbiology* [online]. [cit. 2020-11-30]. Dostupné z: <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/structure-and-function-of-dna/>
- [31] ŠMARDA, Jan, Jiří DOŠKAŘ, Roman PANTUČEK, Vladislava RŮŽIČKOVÁ a Jana KOPTÍKOVÁ. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2008. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [32] VONDREJS, Vladimír a Zuzana STORCHOVÁ. *Genové inženýrství*. Praha: Karolinum, 2003. ISBN 80-246-0586-4.

- [33] VINOD, K. K. Total genomic DNA extraction quality check and quantitation. *Proceedings of the training programme on "Classical and modern plant breeding techniques – A hands on training"*. India: Coimbatore, 2004, (14), 109–121.
- [34] BURDYCHOVÁ, Radka a Pavla SLÁDKOVÁ. *Mikrobiologická analýza potravin*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. ISBN 978-80-7375-116-4.
- [35] VARMA, Astha, Harish PADH a Neeta SHRIVASTAVA. Plant genomic DNA isolation: An art or a science. *Biotechnology Journal*. India, 2007, **2**(3), 386–392. Dostupné z: doi:10.1002/biot.200600195
- [36] AMADO, André M., Wallance M. PAZIN, Amando S. ITO a Vladimir A. KUZMIN. Acridine orange interaction with DNA: Effect of ionic strength. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2017, 1861(4), 900–909. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2017.01.023
- [37] RUMLOVÁ, Michaela, Václav PAČES a Tomáš RUMML. *Základní metody genového inženýrství*. Praha: JPM Tisk, 2003. ISBN 80-86313-12-3.
- [38] MAZURA, Ivan. *Speciální metody molekulární biologie*. Praha: Karolinum, 2001. ISBN 80-246-0258-X.
- [39] MONIS, Paul T., Steven GIGLIO a Christopher P. SAINT. Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Analytical Biochemistry*. 2005, 340(1), 24–34. DOI: 10.1016/j.ab.2005.01.046. ISSN 00032697.
- [40] NAJAFOV, Ayaz a Greta HOXHAJ. *PCR Guru: An Ultimate Benchtop Reference for Molecular Biologists*. Boston: Academic Press, 2017. ISBN 978-0-12-804231-1.
- [41] ENGSTROM-MELNYK, Julia, Pedro L. RODRIGUEZ, Olivier PERAUD a Raymond C. HEIN. Clinical applications of quantitative real-time PCR in virology. *Methods in Microbiology: Current and Emerging Technologies for the Diagnosis of Microbial Infections*. Volume 42. 2015, 161–197. ISBN 978-0-12-803297-8.
- [42] KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 2007. ISBN 978-80-7013-450-4.
- [43] 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. 2021-7-16]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.111
- [44] RUMML, Tomáš, Michaela RUMLOVÁ a Václav PAČES. *Genové inženýrství*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 80-708-0499-8.
- [45] KOONTZ, Laura. Agarose Gel Electrophoresis. *Methods in Enzymology*. Volume 529. Academic Press, 2013, 35 – 45. ISBN 978-0-12-418687-3.
- [45] CORTHELL, J. T. Agarose Gel Electrophoresis. *Basic Molecular Protocols in Neuroscience: Tips, Tricks, and Pitfalls*. Academic Press, 2014, 21–25. ISBN 978-0-12-801461-5.
- [46] AUSTIN, B. AEROMONAS Detection by Cultural and Modern Techniques. *Encyclopedia of Food Microbiology* [online]. Second edition. 2014, s. 31–37 [cit. 2021-7-1].
- [47] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Klatovy: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.

- [48] LACOURSE, W. R. HPLC Instrumentation. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Baltimore, 2017. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.11123-0
- [49] LACOURSE, M. E. General instrumentation in HPLC*. *Liquid Chromatography*. 2017, 417–429.
- [50] PERTILE, Eva. *Instrumental methods of analysis*. Ostrava: VŠB, 2017. ISBN 978-80-248-4124-3.
- [51] SMITH, Clare. Disadvantages & Advantages of an HPLC. Sciencing [online]. Santa Monica: Leaf Group Media, 2020 [cit. 2021-7-1]. Dostupné z: <https://sciencing.com/disadvantages-advantages-hplc-5911530.html>
- [52] *EliGene® Plant DNA Isolation Kit* [online]. Elisabeth Pharmacon [cit. 2021-7-1]. Dostupné z: <https://www.elisabeth.cz/produkt-eligene-plant-dna-isolation-extraction-kit.html>
- [53] *DNA purification from plant tissue* [online]. PerkinElmer [cit. 2021-7-1]. Dostupné z: <https://chemagen.com/Kits/1220-plant-dna-kits/>
- [54] CHEN, Shilin, Hui YAO, Jianping HAN et al. Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. *PLoS ONE*. 2010, **5**(1) Dostupné z: 10.1371/journal.pone.0008613
- [55] KHAKDAN, Fatemeh, Jaber NASIRI, Mojtaba RANJBAR a Houshang ALIZADEH. Water deficit stress fluctuates expression profiles of 4Cl, C3H, COMT, CVOMT and EOMT genes involved in the biosynthetic pathway of volatile phenylpropanoids alongside accumulation of methylchavicol and methyleugenol in different Iranian cultivars of basil. *Journal of Plant Physiology*. 2017, **218**, 74–83. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jplph.2017.07.012
- [56] HOANG, V.L.T., INNES, D.J., SHAW, P.N. et al. Sequence diversity and differential expression of major phenylpropanoid-flavonoid biosynthetic genes among three mango varieties. *BMC Genomics*. 2015, 16, 561. Dostupné z: doi:10.1186/s12864-015-1784-x
- [57] MIRJANI, Leila, Azam SALIMI, Mohammad MATINIZADEH, Khadijeh RAZAVI a Maryam SHAHBAZI. The role of arbuscular mycorrhizal fungi on acclimatization of micropropagated plantlet *Satureja khuzistanica* Jam. by ameliorating of antioxidant activity and expression of PAL gene. *Scientia Horticulturae*. 2019, **253**, 364–370. Dostupné z: doi: 10.1016/j.scienta.2019.04.060
- [58] HONG, Soo Chang, Akio KURODA, Tsukasa IKEDA, Noboru TAKIGUCHI, Hisao OHTAKE a Junichi KATO. The Aerotaxis Transducer Gene *aer*, but Not *aer-2*, Is Transcriptionally Regulated by the Anaerobic Regulator ANR in *Pseudomonas aeruginosa*. *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING*. 2004, **97**(3), 184–190. Dostupné z: doi:10.1016/s1389-1723(04)70188-7
- [59] ZHAO, W., J. ZHAO, L. HE, Y. SUN a H. CAI. Molecular structure and the second introns variation of gene F3'H of two medicinal *Chrysanthemum morifolium* populations. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2013, 51, 251–258. Dostupné z: doi:10.1016/j.bse.2013.09.012
- [60] SARGENT, D. J., A. RYS, S NIER, D. W. SIMPSON a K. R. TOBUTT. The development and mapping of functional markers in *Fragaria* and their transferability and potential for mapping in other genera. *Theoretical and Applied Genetics*. 2007, **114**(2), 373–384. Dostupné z: doi:10.1007/s00122-006-0441-9

- [61] ŠTÍPEK, Stanislav. Uchování a exprese genetické informace. *Stručná biochemie*. Medprint, 1998, s. 12–13. ISBN 80-902036-2-0.
- [62] AGRIC, J. Influences of Harvest Date and Location on the Levels of β -Carotene, Ascorbic Acid, Total Phenols, the in Vitro Antioxidant Capacity, and Phenolic Profiles of Five Commercial Varieties of Mango (*Mangifera indica* L.). *Food Chem.* 2009, 57(22), 10825–10830. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1021/jf902606h>
- [63] Taq PCR Kit Troubleshooting Guide. New England Biolabs [online]. USA [cit. 2021-7-13]. Dostupné z: <https://international.neb.com/tools-and-resources/troubleshooting-guides/taq-pcr-kit-troubleshooting-guide?fbclid=IwAR3cZ9DFEOg9WLkNH0FqkkP5ien0fkkHxIH18uyjxrIiZJPxpYRGpQmHNI0>
- [64] PCR Methods—Top Ten Strategies: Nested PCR. Thermo Fisher scientific [online]. [cit. 2021-7-26]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-methods.html#Nested>
- [65] TOMÍŠEK, Martin. Charakterizace rostlinné složky vybraných potravin pomocí technik molekulární biologie a instrumentálních metod [online]. Brno, 2020 [cit. 2021-7-26]. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=216716. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.
- [66] ONDRUCH, Petr. Detekce vybraných druhů ovoce v potravinách rostlinného původu pomocí instrumentálních a molekulárně biologických metod [online]. Brno, 2020 [cit. 2021-7-26]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/124175>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Lenka Fialová.

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- RNA – ribonukleová kyselina
- dsDNA – dvojvláknová deoxyribonukleová kyselina
- RTG – rentgenové žiarenie/rentgenový
- EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina
- SDS – dodecylsulfát sodný
- CTAB – cetrimoniumbromid
- PVP – polyvinylpyrolidón
- PVPP – polyvinylpolypyrolidón
- TE – Tris EDTA
- TEA – Tris-Acetát EDTA
- TBE – Tris-Borát EDTA
- PCR – polymerázová reťazová reakcia
- qPCR – kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia
- dATP – deoxyadenozín trifosfát
- dCTP – deoxycytidín trifosfát
- dGTP – deoxyguanozín trifosfát
- dTTP – deoxythymidín trifosfát
- HPLC – vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
- GC – plynová chromatografia
- UV-VIS – ultrafialová a viditeľná spektroskopia
- UV – ultrafialové žiarenie
- TNT – trinitrotoluén
- PK – pozitívna kontrola
- NK – negatívna kontrola
- HRM – vysokorozlišovacia analýza kriviek topenia
- bp – počet párov báz
- kp – kbp, 1 000 bp