



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

OPTIMALIZACE KONCENTRACE CHLORIDU VÁPENATÉHO PRO ODSTRANĚNÍ POLYSACHARIDOVÉ KONTAMINACE PŘI IZOLACI ROSTLINNÉ DNA

OPTIMIZATION OF CALCIUM CHLORIDE CONCENTRATION FOR REMOVAL OF POLYSACCHARIDE
CONTAMINATION DURING PLANT DNA ISOLATION

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ekaterina Frnčová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Lenka Fialová, Ph.D.

BRNO 2024

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1911/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Ekaterina Frnčová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **Ing. Lenka Fialová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Optimalizace koncentrace chloridu vápenatého pro odstranění polysacharidové kontaminace při izolaci rostlinné DNA

Zadání bakalářské práce:

- Literární rešerše (izolace rostlinné DNA, inhibitory PCR a jejich odstraňování, PCR)
- Izolace DNA z jablek či modelových výrobků s vysokým obsahem jablek s využitím různých koncentrací chloridu vápenatého pro odstranění polysacharidové kontaminace
- Analýza čistoty a amplifikovatelnosti DNA
- Vyhodnocení výsledků a diskuse

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2024:

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

Ekaterina Frnčová
studentka

Ing. Lenka Fialová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Největší potíží při izolaci DNA je přítomnost kontaminujících látek, které způsobují nežádoucí účinky. V ovoci nejrozšířenějšími kontaminanty jsou polysacharidy. Spolu s dalšími látkami (například proteiny nebo fenolické látky) mohou zkreslovat výsledky při spektrofotometrickém stanovení čistoty nebo působit jako inhibitory při PCR analýze. Cílem této práce bylo zkoumání vlivu různých koncentrací chloridu vápenatého na proces izolace DNA. V experimentální části byla izolovaná DNA z jablka pomocí různě koncentrovaných roztoků chloridu vápenatého. Izolace byla provedena čtyřikrát a pokaždé byl vzorek upraven různými způsoby. Bylo zjištěno, že použitá izolační metoda funguje jenom na vzorku, který byl předem lyofilizován. Izolace DNA z čerstvého plodu poskytovala velmi nízké výtěžky. Pravděpodobně to bylo způsobeno velkým obsahem vody ve vzorku a podíl pevné složky byl menší. Následně byly provedeny PCR analýza a elektroforéza pro zjištění amplifikovatelnosti izolované DNA. Pro tyto analýzy byly použity dvě sady primerů s různou specifitou. Při použití 100 mM roztoku CaCl_2 byla potvrzena amplifikovatelnost pouze při použití primerů specifických pro DNA jabloně. U ostatních vzorků byly prokázány amplifikovatelnost při použití obou typů primerů. Pravděpodobně, vzorky izolované pomocí 100 mM roztoku CaCl_2 měly větší množství inhibitorů, které neovlivňují všechny PCR reakce stejně, což také může ukazovat na malou účinnost tohoto množství CaCl_2 .

ABSTRACT

The greatest difficulty in isolating DNA is the presence of contaminants that cause side effects. Polysaccharides are the most common contaminants in fruits. They can distort the results in spectrophotometric determination of purity or act as inhibitors in PCR analysis together with other substances (for example, proteins or phenolic substances). The aim of this work was to investigate the influence of different concentrations of calcium chloride on the process of DNA isolation. In the experimental part, DNA from the apple was isolated using different concentrations of calcium chloride. The isolation was carried out four times, and each time the sample was adjusted in different ways. It was found that the isolation method used works only with a sample that has been lyophilized. Isolation of DNA from fresh fruit provided very low yields. Probably, this was due to the large water content in the sample, and the proportion of the solid component was smaller. Subsequently, PCR analysis and electrophoresis were performed to determine the amplifiability of the isolated DNA. Two sets of primers with different specificity were used for this analysis. Amplifiability was confirmed only when using primers specific to apple DNA when using 100 mM solution of CaCl_2 . Other samples have been amplifiable using both types of primers. Probably, samples isolated using a 100 mM solution of CaCl_2 had a larger amount of inhibitors that do not affect all PCR reactions equally, which may also indicate a small effectiveness of this amount of CaCl_2 .

KLÍČOVÁ SLOVA

Ovoce, jablko, rostlinný vzorek, izolace DNA, polysacharidy, polysacharidová kontaminace, chlorid vápenatý, polymerázová řetězová reakce (PCR), elektroforéza

KEYWORDS

Fruit, apple, plant sample, DNA isolation, polysaccharides, polysaccharide contamination, calcium chloride, polymerase chain reaction (PCR), electrophoresis

FRNČOVÁ, Ekaterina. *Optimalizace koncentrace chloridu vápenatého pro odstranění polysacharidové kontaminace při izolaci rostlinné DNA* [online]. Brno, 2024 [cit. 2024-03-31]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156688>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Lenka Fialová.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Ing. Lence Fialové, Ph.D, za její ochotu, trpělivost a cenné rady při zpracovávání této práce. Ráda bych poděkovala mé rodině za podporu během celého studia.

OBSAH

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | ÚVOD | 7 |
| 2 | TEORETICKÁ ČÁST | 8 |
| 2.1 | JABLKO | 8 |
| 2.1.1 | Charakteristika | 8 |
| 2.1.2 | Složení jablek | 8 |
| 2.2 | ROSTLINNÉ POLYSACHARIDY | 8 |
| 2.2.1 | Obecná charakteristika | 8 |
| 2.2.2 | Celulóza | 9 |
| 2.2.3 | Hemicelulóza | 9 |
| 2.2.4 | Pektin | 9 |
| 2.3 | EXTRAKCE DNA | 10 |
| 2.3.1 | Vhodný materiál a jeho uchovávání | 10 |
| 2.3.2 | Homogenizace rostlinné tkáně a lyze buněk | 10 |
| 2.3.3 | Techniky izolace a purifikace DNA | 11 |
| 2.3.4 | Kontaminující látky | 12 |
| 2.4 | ANALÝZA DNA | 12 |
| 2.4.1 | Gelová elektroforéza | 12 |
| 2.4.2 | Real-time PCR | 13 |
| 2.4.3 | Stanovení čistoty DNA | 15 |
| 3 | CÍL PRÁCE | 16 |
| 4 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 17 |
| 4.1 | POUŽITÝ MATERIÁL | 17 |
| 4.1.1 | Rostlinný materiál | 17 |
| 4.1.2 | Chemikálie | 17 |
| 4.1.3 | Přístroje a pomůcky | 17 |
| 4.2 | POUŽITÉ METODY | 18 |
| 4.2.1 | Izolace DNA | 18 |
| 4.2.2 | Měření koncentrace a čistoty izolované DNA | 19 |
| 4.2.3 | Polymerázová řetězová reakce v reálném čase | 19 |
| 4.2.4 | Agarózová gelová elektroforéza | 20 |
| 5 | VÝSLEDKY A DISKUZE | 22 |
| 5.1 | PRVNÍ IZOLACE DNA Z JABLKA; HOMOGENIZACE VZORKU POMOCÍ PÍSKU | 22 |
| 5.1.1 | Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA | 22 |
| 5.2 | DRUHÁ IZOLACE DNA Z JABLKA; HOMOGENIZACE VZORKU VE TŘECÍ MISCE | 23 |
| 5.2.1 | Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA | 23 |
| 5.3 | TŘETÍ IZOLACE DNA Z JABLKA; HOMOGENIZACE VZORKU VE TŘECÍ MISCE A DVOJITÁ INKUBACE S CTAB PUFREM | 24 |
| 5.3.1 | Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA | 25 |
| 5.4 | ČTVRTÁ IZOLACE DNA Z JABLKA; LYOFILIZACE VZORKU | 25 |
| 5.4.1 | Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA | 26 |
| 5.4.2 | PCR analýza a agarózová gelová elektroforéza s využitím primerů specifických pro rostlinnou DNA | 27 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 5.4.3 | PCR analýza a agarózová gelová elektroforéza s využitím primerů specifických pro DNA jabloně | 28 |
| 6 | ZÁVĚR..... | 31 |
| 7 | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:..... | 32 |
| 8 | PŘÍLOHY | 36 |

1 ÚVOD

Izolace nukleových kyselin je krok, který se často používá pro různé molekulárně-biologické analýzy. V praxi je možné setkat se s různými postupy. Izolovaná DNA musí být kvalitní a čistá, proto se postupy pořád doplňují a upravují. K dalším důležitým faktorům (kritériím) patří složitost daného postupu nebo jeho finanční náročnost.

Izolace DNA z rostlinného vzorku je často složitá kvůli velkému množství faktorů, které způsobují různé komplikace. Pozornost musí být věnována už výběru, skladování a úpravě vzorku. Nesmírně důležité je i použití vhodné extrakce pro odstranění kontaminujících látek, které se v rostlinných vzorcích často vyskytují ve velkých množstvích. Příkladem problematických kontaminujících látek jsou proteiny, polysacharidy nebo fenolické látky.

Cílem této práce je optimalizace metody pro izolaci DNA úpravou koncentrace chloridu vápenatého použitého v jednom z kroků této metody. Jako vzorek bylo použito jablko, které se v různých ovocných výrobcích často vyskytuje ve velkých množstvích, a které zároveň obsahuje velké množství polysacharidů i jednoduchých sacharidů, například glukózu, fruktózu, celulózu, pektin, škrob a deriváty zmíněných látek. Přítomnost těchto látek komplikuje izolaci DNA i její následnou analýzu. Chlorid vápenatý vytváří nerozpustnou sraženinu s polysacharidy a tím pádem snižuje jejich koncentraci v roztoku, ale jeho koncentraci je nutno optimalizovat, protože nižší koncentrace chloridu vápenatého nemusí stačit k odstranění dostatečného množství polysacharidů, a naopak při vyšší koncentraci vápenaté ionty působí jako inhibitory PCR, pokud nejsou během purifikace DNA odstraněny.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Jablko

2.1.1 Charakteristika

Jablko je ovoce stromu jabloní. Ovoce je velmi významná potravinářská komodita. Zahrnuje velký počet druhů, které jsou zpracovávány mnoha způsoby. Ovoce může být zkonsumované v čerstvém stavu nebo může být využito jako surovina pro nejrůznější potravinářské výrobky. Pod slovem ovoce se rozumí jedlé plody, plodenství a semena různých kulturních či planě rostoucích dřevin a bylin. Při konzumování v čerstvém má ovoce stavu nejčastěji charakteristickou sladkou chuť [1].

Jabloně tvoří největší podíl mezi jádrovinami. To je skupina rostlin jejichž semena se ukrývají do pěti „komůrek“ uspořádaných do tvaru hvězdy. Tato pouzdra (komůrky) jsou uložena v dužině, která vzniká z květního lůžka. Jádrové ovoce patří do čeledi růžokvětých [2].

2.1.2 Složení jablek

Vnější vzhled jablek je charakterizován kulovitým tvarem a tenkou hladkou slupkou, která se v závislosti na odrůdě při zrání barví do různých odstínů žluté, červené a zelené. Složení jablek zahrnuje mnoho různých látek. Obsah nutričních látek závisí na odrůdě jabloní, klimatických, půdních a pěstitelských podmínkách proto všechny níže uvedené hodnoty jsou průměrné. Jablko obsahuje přibližně 85 % vody a jeho energetická hodnota je přibližně 50 až 70 kcal/kus. Je tedy ideální jako nízkokalorické občerstvení. Značnou část ve složení tvoří cukry (6,5 až 11,8 % fruktózy, 2,5 až 5,5 % glukózy a 1,0 až 5,3 % sacharózy). Rychle doplní energii a napomáhají udržovat stabilní hladinu krevního cukru. Vysoký podíl vlákniny ve formě celulózy a pektinu, jehož zastoupení je ve zralých plodech 0,1 až 1 %, podporuje trávení příznivým povzbuzováním střevní peristaltiky. Dusíkaté látky tvoří jen malý podíl (do 1 %) ze všech látek obsažených v jablkách. Z toho polovina je bílkoviny a zbytek dusitany a dusičnany [3-5].

K celkové hmotnosti plodů přispívají i minerální látky, které tvoří 0,25 až 0,75 % ovoce. Největší zastoupení má draslík, vápník, hořčík a železo, proto jsou jablka velmi často povolena nebo i doporučena při různých dietách a některých nemocech. V jablkách jsou také přítomny vitamín A, a některé vitaminy skupiny B, konkrétně vitamín B1, B2, B3, B6 a B9. Důležitou roli mají i vitaminy E a C, které jsou v jablkách také obsaženy, protože mají antioxidační schopnosti. Některé studie ukazují na to, že konzumace ovoce obsahujícího zmíněné vitaminy snižuje rizika některých onemocnění, například ischemické choroby srdeční, mrtvice nebo revmatoidní artritidy [3-5].

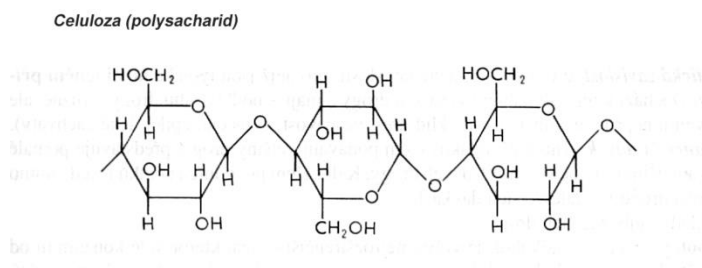
2.2 Rostlinné polysacharidy

2.2.1 Obecná charakteristika

Polysacharidy rostlinných buněčných stěn jsou nejhojnějšími organickými sloučeninami nacházejícími se v přírodě. Tvoří 90 % buněčné stěny rostlin a mohou být rozděleny do tří skupin: celulóza, hemicelulózy a pektiny. Strukturu buněčné stěny rostlin tvoří spojení celulosových řetězců uspořádaných paralelně a stabilizovaných vodíkovými můstky. Spojení mezi stěnami je tvořeno dalšími polysacharidy s větvenou strukturou, hemicelulózami, které jsou tvořeny různými monosacharidy, jako jsou například L-arabinóza D-galaktóza, D-xylóza a další. V základní hmotě primární buněčné stěny jsou obsaženy ještě pektiny a lignin [6-7, 10].

2.2.2 Celulóza

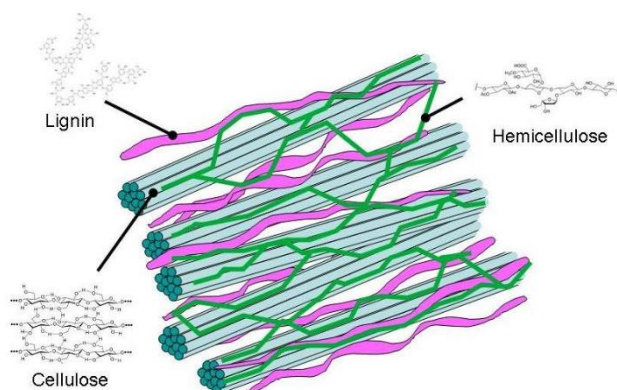
Celulóza představuje hlavní složku polysacharidů buněčné stěny a skládá se z lineárního polymeru β -1,4-vázaných zbytků D-glukózy. Polymery celulózy jsou přítomny jako uspořádané struktury neboli vlákna, která se nazývají celulózní mikrofibrily a mají šířku 10-15 nm. Na její stabilizaci se podílí hlavně vodíkové můstky. Mikrofibrily vytvářejí vyšší strukturální jednotky – makrofibrily. Jejich hlavní funkcí je zajistit tuhost buněčné stěny [6-7].



Obrázek 1. Chemická struktura celulózy

2.2.3 Hemicelulóza

Druhou nejpočetnější skupinou organických struktur v buněčné stěně rostlin jsou hemicelulózy. To jsou heterogenní polysacharidy, které se skládají z různých polymerů, jako jsou pentózy (například arabinóza a xylóza), hexózy (například glukóza, manóza a galaktóza) a cukerné kyseliny. Chemické složení hemicelulóz se může u jednotlivých skupin značně lišit. Hemicelulóza slouží jako spojení a vyplňuje prostor mezi ligninem a celulóзовými vlákny a dodává celé síti větší tuhost. Na rozdíl od celulózy je chemicky méně odolná, a proto se při zpracování rozpustí a vyplaví. Podíl hemicelulóz tvoří 15–25 % u jehličnanů a 25–45 % u listnatých stromů [6-8, 11-12].



Obrázek 2. Struktura lignocelulóz [9]

2.2.4 Pektin

Pektiny a bílkoviny tvoří necelulózní složku primární buněčné stěny. Pektin je komplexní směs polysacharidů, které se skládají ze zbytků α -1,4-vázané kyseliny d-galakturonové. Tato složka tvoří asi jednu třetinu ze sušiny v buněčných stěnách vyšších rostlin. Mnohem menší podíly těchto látek se nacházejí v buněčných stěnách travin. Nejvyšší koncentrace pektinu se nacházejí uprostřed lamel buněčné stěny, s postupným poklesem od primární stěny směrem k plazmatické membráně. Pektin, takzvaný protopektin, je nerozpustný ve vodě. S účinkem kyselin nebo protopektináz, je ve vodě rozpustný. Vyniká schopností vázat na sebe vodu, proto se podílí na

hospodaření buněk s vodou. Velký význam má při dozrávání ovoce, a to přeměnou nerozpustných pektinů na rozpustné. Při zranění dochází k postupné depolymeraci neboli enzymovému štěpení pektinových látek. Tento proces způsobuje měknutí plodu [6-7, 11-13].

2.3 Extrakce DNA

U mnoha rostlinných druhů může být extrakce velkého množství vysoce kvalitní DNA s vysokou molekulovou hmotností problematická kvůli vysokému množství fenolických sloučenin, vysokým koncentracím DNáz a přítomnosti velkého množství organelové DNA. Rostlinné buňky mají tři typy genomu, nukleární, plastidové a mitochondriální. Počet organel a kopií genomu na organelu závisí na stáří tkáně, rostlinném druhu a typu buněk [14].

Samotná extrakce DNA z buněk začíná homogenizací tkáně a lyzí buněk, a pokračuje odstraněním polyfenolických sloučenin a cukerných složek. Potom následuje deproteinizace DNA, srážení a její purifikace neboli přečištění pro odstranění nežádoucích nečistot ze vzorku. Častým problémem je vytváření komplexních sloučenin některých uvedených látek s částmi nukleových kyselin [15].

Pro izolaci DNA z rostlinné matrice můžou být použité nejrůznější metody. Existuje několik kritérií, podle kterých vybereme tu metodu, která nejvíce vyhovuje našim potřebám. Metoda pro izolaci DNA by měla být rychlá, jednoduchá, nákladově efektivní a spolehlivá. Pro izolaci DNA existuje mnoho různých postupů, ale kvůli chemické heterogenitě rostlin mohou být mnohé z těchto postupů aplikovány pouze na omezený počet rostlinných druhů. Rostliny, zejména léčivé a aromatické rostliny, obsahují řadu sekundárních metabolitů, které při izolaci DNA zasahují do postupu izolace [16].

Obecně platí, že účinná eliminace kontaminujících chemických složek hraje klíčovou roli při izolaci vysoce kvalitní DNA z rostlinných tkání. Chemické látky, které nejčastěji způsobují potíže při izolaci DNA, obvykle patří mezi polysacharidy, proteiny, nebo fenolické látky. Ke snížení negativního vlivu těchto chemických složek na kvalitu a výtěžek izolace DNA bylo široce používáno několik činidel. Například pro snížení polysacharidů byl do extrakčního pufru aplikován sorbitol, mannitol, glukóza, sacharóza a vyšší koncentrace NaCl [17].

Jednou z nejpoužívanějších metod izolace DNA je fenol-chloroformová extrakce a následovaná srážení DNA alkoholem. Je náročná na čas a používají se nebezpečné chemikálie. Na druhou stranu tato metoda umožňuje dosáhnout vysokých výtěžků a získat prakticky čistou DNA [18].

2.3.1 Vhodný materiál a jeho uchování

Nejvhodnějším materiálem pro izolaci DNA je čerstvý rostlinný vzorek, který může být uchováván na krátkou dobu při teplotě 4 °C, aniž by došlo k porození struktury DNA. V případě, že vzorek byl odebrán na vzdáleném místě, práce s čerstvým materiálem často není možná a je nutno uchovávat vzorek suchý nebo polosuchý. Jednou z výhod usušených vzorků je možnost skladovat materiál při pokojové teplotě. Proto je důležité dodržování správných podmínek při sušení. Musí být zachována celistvost tkání a nesmí dojít k porušení DNA [19].

2.3.2 Homogenizace rostlinné tkáně a lyze buněk

Začátkem izolace genomové DNA je rozbití buněčných stěn působením mechanické energie. To se provádí např. za přítomnosti kapalného dusíku, kdy dochází k dehydrataci rostlinné tkáně. Dalším krokem je rozemletí zmrazeného vzorku pomocí třecí misky a tloučku. Po rozbití buněčných stěn je nutno narušit celistvost buněčných membrán, aby došlo k uvolnění DNA do

extrakčního pufru. K dosažení tohoto cíle se používají hlavně dva detergenty. SDS neboli dodecylsírán sodný nebo CTAB, což je cetyltrimethylamoniumbromid. Extrakční pufr by měl obsahovat EDTA, plný název je kyselina ethylendiamintetraoctová. Tato kyselina chrání DNA před působením endogenních nukleáz. EDTA vytváří komplexní sloučeniny s ionty hořčíku, které jsou nezbytné pro fungování většiny nukleáz. Pro efektivní extrakci DNA musí být udržováno pH 8,0 nebo vyšší, protože při nižším pH je deoxyribonukleová kyselina selektivně zadržována v organické fázi. Navíc nižší pH způsobuje depurinaci DNA [20].

2.3.3 Techniky izolace a purifikace DNA

2.3.3.1 Izolace DNA pomocí pevných nosičů

Při izolaci nukleových kyselin se často používají magnetické nosiče. Separace nukleových kyselin je důležitý krok využívaný v molekulární biologii. Předtím, než mohly být použity moderní technologie, byla separace nukleových kyselin časově a pracově náročným procesem založeným na několika extrakčních a centrifugačních krocích, často omezených malými výnosy a nízkou čistotou separačních produktů. V posledních několika letech byly vyvinuty specificky funkcionalizované magnetické částice. Spolu s vhodným pufrovým systémem umožňují rychlé a účinné čištění ihned po extrakci ze surových buněčných materiálů. Nový přístup navíc umožnil snadnou automatizaci celého procesu a izolaci nukleových kyselin z větších objemů vzorků [20].

Magnetická separace je nově vznikající technologie, která využívá magnetismus pro efektivní separaci para- a feromagnetických částic o velikosti mikrometrů z chemických nebo biologických suspenzí. Magnetická separace nukleových kyselin má několik výhod ve srovnání s jinými technikami používanými pro stejný účel. Nukleové kyseliny mohou být izolovány přímo ze surových vzorkových materiálů [19].

Existuje možnost použití silikagelových částic. Při neutrálním pH silikagel nabývá záporný náboj kvůli deprotonizaci silanolových skupin. DNA se adsorbuje na povrch částic za přítomnosti chaotropních látek jako například jodid sodný, chloristan sodný nebo guanidinium chlorid [19].

Dalším způsobem izolování DNA může být aplikace elektrostatických sil spolu s magnetickými nosiči na které jsou navázané aminoskupiny. Skupina $-NH_2$ se protonuje na $-NH_3^+$. Částice s kladným nábojem má schopnost interagovat s molekulou deoxyribonukleové kyseliny, která má záporný náboj [21].

Neselektivním typem adsorpce DNA pro její izolaci je používání magnetických nosičů obsahujících karboxylové skupiny. Dochází k reverzibilnímu navázání DNA v přítomnosti NaCl a PEG (polyethylenglykol). V závislosti na koncentraci těchto látek se mění množství adsorbované DNA na nosič. Zvýšením koncentrace přítomných látek dojde k poklesu aktivity vody, a to způsobuje kondenzaci dvoušroubovice DNA. Neutrální polymer a monovalentní sůl mají vliv na osmotický tlak, který pomáhá kondenzovat DNA působením vnějších sil [22].

2.3.3.2 Fenol-chloroformová extrakce

Fenol-chloroformová metoda je často využívána způsobem extrakce DNA. Tato metoda využívá nemísitelnost fenolu a chloroformu s vodou. Do buněčného lyzátu vzniklého po homogenizaci tkáně se přidává pufrovaný fenol. Následně směs je homogenizována a centrifugována. Dojde k oddělení vodné fáze, která obsahuje DNA, od organické části, ve kterou zůstanou polysacharidy, lipidy, proteiny nebo volné nukleotidy. K odstranění zbytků fenolické fáze

z fáze obsahující DNA se do ní přidává směs chloroformu s isoamylalkoholem. Dále následuje purifikace. Pro ni se využívá alkoholové srážení, kdy do směsi s DNA se přidá isopropanol, aceton nebo 96 % ethanol s následným okyselením octanem amonným nebo sodným. Potom následuje inkubace po dobu minimálně 30 minut v teplotách pod bodem mrazu. K vzniklému sedimentu se přidává 70 % vodný roztok ethanolu. Směs se nechá vysušit. V posledním kroku se DNA rozpustí ve vhodném pufru, často se využívá TE pufr [23].

2.3.4 Kontaminující látky

2.3.4.1 Polysacharidy

Při izolaci DNA z ovoce (hlavně z jablek) se nejvíce řeší polysacharidová kontaminace. Poprvé kvůli vysokému zastoupení sacharidů ve složení. Podruhé kvůli tomu, že přítomnost DNA ve vzorku na první pohled vypadá stejně, jako přítomnost polysacharidů. Polysacharidy ve vzorcích inhibují enzymatickou aktivitu Taq polymerázy a také aktivitu restrikčních endonukleáz [24-25].

2.4 Analýza DNA

V Evropě roste zájem o spolehlivé techniky kvantifikace genetických složek potravinových matric kvůli potřebě dodržovat evropský legislativní rámec pro potravinářské výrobky. Real-time polymerázová řetězová reakce (real-time PCR) je v současné době jednou z nejspolehlivějších technik pro kvantifikaci specifických sekvencí nukleových kyselin. K analýze DNA se rovněž využívají agarózová gelová elektroforéza a UV spektrofotometrie [26].

2.4.1 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je jedna z nejpraktičtějších a nejúčinnějších metod používaných pro separaci fragmentů DNA. Principem separaci je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Separaci molekul umožňuje použití porézních gelů, jako jsou například agarózový a polyakrylamidový gel. Využívá se princip síťového efektu a elektroforetická pohyblivost separovaných látek. Nukleové kyseliny obsahují fosfátové skupiny, které nesou záporný náboj, a proto se ve stejnosměrném elektrickém poli pohybují k anodě. Gely využívané pro elektroforézu tvoří komplikovanou síťovou strukturu polymerních molekul a pórů, na jejichž velikost má vliv složení roztoku nebo koncentrace polymeru. Agarózové gely jsou vhodné pro separaci nukleových kyselin o velikosti 100 bp až po 50 kb. Polyakrylamidové gely se využívají pro separaci menších molekul [27-28].

Rychlost pohybu molekul DNA v gelu označovaná jako elektroforetická pohyblivost a je nepřímo úměrná logaritmu velikosti molekul. Velikost molekul nebo fragmentu DNA, která se vyjadřuje v počtu párů bází se stanovuje srovnáním pohyblivosti analyzovaného vzorku s molekulou nebo fragmentem o známé velikosti [28].

Pro zviditelnění molekul DNA se gely barví pomocí vhodných barviv. V minulosti byl často používán etidiumbromid, který se dostává mezi sousední páry bází a vytváří s nimi komplex. Po osvětlení ultrafialovým světlem tento komplex fluoreskuje červenou barvou. Molekuly DNA se pak na gelu ukazují jako proužky a intenzita jejich fluorescence je úměrná koncentraci DNA. Kromě etidiumbromidu pro barvení může být použita skupina fluorescenčních kyaninových barviv, nebo stříbro [28].

Dalším využitím elektroforézy může být rozdělení molekul DNA, které se nacházejí v různých konformacích. Dají se tak odlišit kovalentně uzavřené kružnicové molekuly DNA od otevřených kružnic nebo od lineárních molekul. Otevřená kruhová, lineární nebo superhelikální

forma DNA stejné molekulové hmotnosti se pohybují agarózovým gelem různou rychlostí. Jejich relativní pohyblivost závisí na podmínkách elektroforézy [28].

2.4.2 Real-time PCR

PCR nebo polymerázová řetězová reakce je jeden z největších vědeckých pokroků 20. století. Tato metoda je rychlá a snadná a je schopná vytvořit neomezený počet kopie vláken DNA z jednoho původního vlákna. Několik málo hodin stačí na vytvoření milionů kopií úseku DNA, které pak můžou být použité v řadě různých testů což má velké využití v medicíně pro diagnostiku nebo monitoring onemocnění anebo k základnímu výzkumu v molekulární biologii [29].

Historie metody PCR se začala v roce 1983, kdy vědec Kary Mullis, PhD z Cetus Corporation představil PCR jako metodu kopírování DNA a syntézy velkých množství specifické cílové DNA a o dva roky později po hlubším zkoumání a vylepšování byla tato metoda úspěšně zavedena do praxe. Kary B. Mullis v roce 1993 byl oceněn Nobelovou cenou za tento významný objev v oblasti molekulární biologie [29].

Real-time polymerázová řetězová reakce (real-time PCR), nazývaná také kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (QRT-PCR), je technika používaná k simultánní kvantifikaci a amplifikaci určité sekvence DNA. Používá se k určení, zda je ve vzorku přítomna specifická sekvence DNA; a pokud sekvence přítomna je, k určení počtu jejích kopií ve vzorku. Principem této metody je replikace nukleových kyselin a cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků DNA prostřednictvím DNA-polymerázy. Původní DNA může být jednovláknová nebo dvouvláknová. Použití metody PCR zahrnuje tři opakující se kroky, prvním z nich je denaturace vlákna dvouřetězcové DNA na jednořetězcovou DNA, potom následuje připojení primerů, a nakonec dochází k elongační fázi [28, 30].

2.4.2.1 Princip

Prvním krokem polymerázové řetězové reakce je denaturace původního vlákna DNA. Tento krok probíhá při teplotě 94–97 °C. Vlivem vysoké teploty dochází k porušení vodíkových můstků mezi jednotlivými vlákny a rozdělení vláken DNA. Tento krok zpravidla trvá 20-30 sekund, přičemž v počátečním cyklu je tato doba prodloužen na 1-5 minut. Je důležité, aby došlo k úplnému oddělení obou vláken, protože v opačném případě by mohlo dojít k renaturaci molekuly, a to by zabránilo navázání primerů a došlo by ke zkreslení výsledků [28, 31].

Pro proběhnutí dalšího kroku třeba ochladit reakční směs na teplotu 50-65 °C. Je nezbytné pro umožnění nasednutí primerů na specifická místa DNA. Délka tohoto kroku je přibližně 30-60 sekund. Vhodná teplota závisí na teplotě tání primerů, na zastoupení párů bází A-T a C-G a délce oligonukleotidů. Pokud je teplota reakční směsi snížena příliš, primery začnou nasedat i na částečně komplementární sekvence a dojde ke vzniku nespecifických produktů. Při nedostatečném ochlazení reakční směsi budou primery málo hybridizovat a nevytvoří se dostatečné množství produktu [28, 31].

V poslední části cyklu za katalýzy DNA-polymerázou probíhá syntéza nových komplementárních řetězců DNA a vzniká nové vlákno DNA. V této části jsou jednotlivé nukleotidy komplementární k sekvenci původních řetězců DNA připojovány ve směru 5'→3'. Tento proces se trvá 60-120 sekund při teplotě 65-75 °C, která zaleží na použitém enzymu [28, 31].

Zařízení, ve kterém se provádí reakce se nazývá termocykler. V tomto zařízení dochází k automatické změně teploty dle nastavení programu. Postup se opakuje a množství vláken narůstá exponenciálně. Po ukončení posledního cyklu bude vzorek obsahovat více než miliardu kopií vybraného úseku DNA. Existuje optimální počet cyklů (obvykle 25-35 cyklů) který závisí na počáteční koncentraci původní DNA. Po překročení optimálního počtu se začne snižovat účinnost enzymu a jako důsledek se zvýší počet nespecifických produktů PCR. Také může dojít k vyčerpání složek reakce a po určitém počtu cyklů se koncentrace produktu přestane měnit [31].

2.4.2.2 Reakční směs pro PCR

Reakční směs pro PCR obsahuje několik složek. První složkou je samotná původní (templátová) DNA. To je makromolekula DNA, která obsahuje cílová místa pro primery a musí být neporušená. Dalšími komponentami jsou primery. To jsou syntetické oligonukleotidy, které mají zásadní roli pro úspěšný průběh reakce. Váží se na vlákno DNA podle komplementarity a nemely by být vzájemně komplementární. Primery se skládají obvykle z 18-25 nukleotidů a mají rovnoměrně zastoupeny báze, které mají takové rozložení, aby nedocházelo ke vzniku vnitřních sekundárních struktur nebo dimerů. Optimální koncentrace primerů v reakční směsi je 0,1–0,5 μM . Další důležitou komponentou je DNA-polymeráza. Tento enzym katalyzuje syntézu nových řetězců DNA. Existují různé typy polymeráz, které mají odlišné využití a jiné vlastnosti. V současné době se dá objednat komerční směs, ve které bude vhodně nakombinováno několik polymeráz s různými vlastnostmi. Při použití v PCR musí být polymerázy odolné vůči vysokým teplotám, a proto se používají termostabilní polymérazy, jejichž zdrojem mohou být např. termofilní bakterie *Thermus aquaticus* [31-32].

3'-deoxynukleosid-5'-trifosfáty (dNTP) jsou stavební kameny pro syntézu nového vlákna DNA. Jejich koncentrace v reakční směsi se obvykle pohybují v rozpětí 20–400 μM . Při příliš vysoké koncentraci vyvazují hořčičnaté ionty a tím pádem působí jako inhibitor PCR. Další komponentou jsou ionty Mg^{2+} . Mají velký význam, protože aktivují polymerázy tím, že tvoří rozpustný komplex s 3'-deoxynukleosid-5'-trifosfáty. Kvůli tomu, že dNTP není jediná složka, s kterou hořčičnaté ionty reagují, pro každou směs se používá určitá optimální koncentrace iontů Mg^{2+} , která se obvykle pohybuje v rozpětí 0,5–8 mM v reakční směsi. Další komponentou je PCR pufr, který vytváří pH prostředí optimální pro DNA-polymerázu. Standardní reakční pufr se skládá z 10 mM Tris-HCl (pH 8,3–8,8), 50 mM KCl a 1,5 mM MgCl_2 . PCR pufr může také obsahovat další látky jako jsou například želatina, albumin nebo acetamid. Poslední složkou reakční směsi je speciálně upravená voda pro PCR. To je ultračistá voda, která neobsahuje DNázy a RNázy, které by mohly ovlivnit konečný výsledek. Slouží pro doplnění objemu směsi. Pro reakce PCR může být použita voda o odporu 18 m Ω nebo voda pro injekce ČSL 4 [31-32].

2.4.2.3 Detekce amplikonů

Produktem amplifikace nukleových kyselin jsou amplikony. To jsou fragmenty DNA definované délky jejichž velikost se nejčastěji pohybuje v desítkách až tisících párů bází. Pro detekci a separaci vzniklých fragmentů se používají elektroforetické techniky. Produkty PCR se spolu s DNA standardem, který obsahuje fragmenty o známé velikosti pohybují agarozovým nebo polyakrylamidovým gelem, který bývá zbarven interkalačními činidly, která se vážou do dvoušroubovice DNA a po ozáření UV světlem fluoreskují. Intenzita fluorescence potom ukazuje na koncentraci PCR produktů. Rychlost pohybu částic závisí na velikosti, popřípadě na molekulové hmotnosti jednotlivých molekul. Po porovnání produktů se zmíněným DNA

standardem se popisuje a vyhodnocuje složení vzorku - např. zda obsahuje pouze specifické PCR produkty, či zda jsou přítomny nespecifické produkty nebo dimery primerů. [28,33].

Průběh amplifikace specifických produktů se provádí prostřednictvím tzv. amplifikačních křivek, které vzniknou vynesením intenzity naměřené fluorescence oproti příslušnému cyklu. Tvar typické amplifikační křivky je esovitý a lze ji rozdělit na 3 základní části. První část je fáze pozadí, kdy nárůst fluorescence není významný, protože koncentrace amplikonů je nízká. Další fáze je exponenciální a trvá jen omezené množství cyklů. V průběhu této fáze dochází k nárůstu koncentrace produktů a intenzity fluorescence. V poslední fázi, která se nazývá plató dochází k ustálení pohybu křivky, protože systém je nasycen a koncentrace produktů se nemění [34].

Pro rozpoznání specifických a nespecifických produktů PCR se využívá analýza křivek tání. Tato analýza se provádí po ukončení reakce ve stejné zkumavce bez potřeby další manipulace. Roztok obsahující DNA se ochladí a postupně se zahřívá. Zvolená teplota je vyšší, než předpokládaná teplota tání amplikonů. Zároveň se zaznamenává intenzita fluorescenčního signálu. Tvar křivky tání mohou ovlivnit délka amplikonů, sekvence a obsah GC-párů ve vlákně DNA. Specifické produkty PCR mají hodnotu teploty tání obvykle vyšší než nespecifické produkty [35].

2.4.3 Stanovení čistoty DNA

Pro stanovení čistoty izolované DNA se nejčastěji používá spektrofotometrie. Pomocí přístroje se změří UV absorbance při vlnových délkách 230 nm, 260 nm a 280 nm a spočítají se jejich poměry, to znamená A_{260}/A_{230} a A_{260}/A_{280} . Pokud je hodnota poměru absorbancí A_{260}/A_{280} je 1,8 až 2,0, znamená to, že vzorek DNA je čistý. Takový vzorek může být použit pro PCR. Hodnota nižší, než 1,8 může ukazovat na to, že vzorek obsahuje kontaminující látky jako proteiny, fenolické látky nebo zbytky činidel použitých během izolace DNA. Vyšší hodnota než 2,0 může ukazovat na kontaminaci RNA [36].

3 CÍL PRÁCE

1. Vypracování literární rešerše
2. Izolace DNA z jablek či modelových výrobků s vysokým obsahem jablek s využitím různých koncentrací chloridu vápenatého pro odstranění polysacharidové kontaminace
3. Analýza čistoty a amplifikovatelnosti DNA
4. Vyhodnocení výsledků a diskuse

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použitý materiál

4.1.1 Rostlinný materiál

Jako pozitivní kontrola byla použita DNA, která byla izolována z listu jabloně. Tento list byl odtrhnut ze stromu a následně byl uchovávan v mrazničce. Hlavní část experimentů se prováděla na jablku, které bylo zakoupeno v obchodě. Vzorky byly lyofilizovány a uchovány v mrazničce.

4.1.2 Chemikálie

- ~ EliGene Plant DNA Isolation Kit
- ~ Cetyltriethylamoniumbromid (CTAB)
- ~ β – merkptoethanol
- ~ Chloroform:isoamyl alkohol (24:1)
- ~ Chlorid vápenatý
- ~ Isopropanol
- ~ Octan amonný
- ~ Tris-báze
- ~ EDTA
- ~ Chlorid sodný
- ~ Octan sodný
- ~ Ethanol
- ~ PCR ultra H₂O
- ~ qPCR 2x SYTO-9, Master Mix
- ~ Oligonukleotidové primery
- ~ Agaróza pro gelovou elektroforézu
- ~ Kyselina boritá
- ~ Midori Green Advance DNA Stain
- ~ PCR Loading buffer Yellow load
- ~ PCR Loading buffer Red load
- ~ DNA standard FastGene 100 bp DNA Ladder

4.1.3 Přístroje a pomůcky

- ~ Mraznička a chladnička
- ~ Mikrozkmavky různé velikosti
- ~ Mikropipety Acura Manual 825
- ~ Mikropipety Finnpipette F2
- ~ Mikropipety Discovery comfort
- ~ Laboratorní váhy
- ~ MS2 Minishaker Vortexer
- ~ Mini incubator LABNET 230 V
- ~ Centrifuga Z 216 MK
- ~ Spektrofotometr NanoDrop 2000
- ~ Termocykler Rotor-Gene 6000
- ~ Elektroforetická vana
- ~ Mikrovlnná trouba

- ~ Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V
- ~ Transluminátor Azure Biosystems c200
- ~ Lyofilizátor FreeZone Triad
- ~ Další laboratorní pomůcky – pinzeta, buničina, špičky a další

4.2 Použité metody

4.2.1 Izolace DNA

4.2.1.1 Izolace DNA z listu pomocí izolačního kitu *EliGene Plant DNA*

Tímto způsobem byla izolována DNA z listu jabloně, která potom byla použita jako pozitivní kontrola. Izolace byla provedena podle postupu uvedeného výrobcem. Do 1,5 ml zkumavky bylo přidáno 0,2 g homogenizačního písku a 0,05 g vzorku. Následně bylo přidáno 450 μ l homogenizačního pufru P1 a pomocí tloučku (kopistu) byl vzorek zhomogenizován. Do zkumavky bylo přidáno 50 μ l lyzačního pufru P2. Směs byla zvortexována. Potom byla provedena inkubace po dobu 10 minut za občasného míchaní při teplotě 70 °C. Dále následovala centrifugace po dobu 3 minut při 10 000 \times g a laboratorní teplotě. Po přenesení supernatantu do čisté 1,5 ml zkumavky, bylo do směsi přidáno 175 μ l pufru P3 na odstranění inhibitorů. Směs byla zvortexována 5 sekund a inkubována v mrazničce po dobu 5 minut. Dále proběhla centrifugace po dobu 3 minut při 10 000 \times g a laboratorní teplotě. Potom byl supernatant (přibližně 500 μ l) přemístěn do čisté 2 ml zkumavky. Po přidání 500 μ l pufru P4 směs byla zvortexována a po přidání 500 μ l pufru P5 znovu zvortexována.

Potom bylo 750 μ l směsi přeneseno do zkumavky s filtrem a byla provedena centrifugace 1 minutu při 10 000 \times g. Předchozí krok byl zopakován ještě jednou. Následně byl filtr se zachyceným vzorkem přemístěn do nové 2 ml zkumavky. Potom bylo přidáno 500 μ l promývacího pufru P6. Směs byla centrifugována 1 minutu při 10 000 \times g. Supernatant byl odstraněn a do vzorku bylo přidáno 500 μ l promývacího pufru P7. Směs byla centrifugována 1 minutu při 10 000 \times g. Dále bylo znovu provedeno odstranění supernatantu. Membrána filtru byla následně vysušena pomocí centrifugace při 12 000 \times g po dobu 2 minut. Po přemístění filtru do nové 2 ml zkumavky bylo přidáno 100 μ l elučního pufru P8 a potom byl vzorek centrifugován 1 minutu při 10 000 \times g. Nakonec byl odstraněn filtr, a roztok se vzorkem byl připraven pro další analýzy.

4.2.1.2 Homogenizace vzorku před izolací DNA pomocí *CTAB* protokolu

Izolace DNA z plodu byla provedena celkem čtyři krát. Při první izolaci vzorek byl homogenizován pomocí homogenizačního písku, při dvou dalších pokusech byl vzorek rozetřen ve třetí misce. Před provedením čtvrté izolace byly kousky jablka lyofilizované a následně bylo určité množství vzorku homogenizováno ve třetí misce.

4.2.1.3 Izolace DNA pomocí *CTAB* protokolu

Homogenizaci a navážení 0,05 g vzorku do 2 ml zkumavky, byl přidán 1 ml CTAB roztoku (pro přípravu bylo smícháno 30 ml 10 % cetyltrimethylamonium bromidu spolu s 4 ml 0,5 M EDTA, 28 ml 5 M NaCl, 10 ml 1 M Tris-HCl, 3 g polyvinylpyrrolidonu (PVP) a 24,8 ml destilované vody) a 1 μ l β -merkaptoethanolu. Následně proběhla inkubace vzorku při 65 °C po dobu 30 minut s občasným promícháváním roztoku každých 10 minut. Při 3 izolaci (z čerstvého plodu) byla odebrána tekutá složka a sediment byl centrifugován při 10 000 \times g po dobu 3 minut. Následně byl znovu přidán 1 ml CTAB roztoku, 1 μ l β -merkaptoethanolu a byla provedena druhá inkubace směsi při 65 °C po dobu 30 minut s občasným promícháváním roztoku každých 10 minut. Zbytek postupu byl pro všechny izolace stejný. Potom bylo přidáno

800 μ l směsi chloroform:isoamylalkohol v poměru 24:1. Následně proběhla centrifugace při 10 000 \times g a laboratorní teplotě po dobu 10 minut. Dále 800 μ l supernatantu bylo přeneseno do nové 2 ml zkumavky a ke vzorku bylo přidáno 200 μ l roztoku CaCl_2 o různých koncentracích, konkrétně 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM a 500 mM (pro přípravu roztoku o koncentraci 500 mM bylo naváženo 0,555 g CaCl_2 a rozpuštěno v 10 ml sterilní vody, potom pomocí ředění byly připraveny ostatní roztoky). Po zvortexování roztoku proběhla inkubace po dobu 15 minut a laboratorní teplotě. Potom byl vzorek centrifugován 3 minuty při 10 000 \times g a laboratorní teplotě.

Supernatant byl odebrán do čisté 2 ml zkumavky a bylo k němu přidáno 480 μ l isopropanolu. Vzorek byl opatrně promíchán. Dále následovala inkubace po dobu 1 minuty při laboratorní teplotě. Potom byl vzorek centrifugován po dobu 5 minut a při 10 000 \times g. Supernatant byl opatrně odlit do odpadní nádoby a k sedimentu bylo přidáno 0,5 ml 10 mM octanu amonného (pro přípravu tohoto roztoku 38,5 mg octanu amonného bylo rozpuštěno v 50 ml 70 % ethanolu). Dále byl roztok inkubován při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Po skončení inkubace následovala centrifugace po dobu 5 minut a při 10 000 \times g.

Supernatant byl odlit a jeho zbytky byly vysušeny při teplotě 65 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 3 minut. Zkumavky byly otevřené po celou dobu sušení. Potom byl sediment rozpuštěn v 250 μ l TE pufru a ke vzniklému roztoku bylo přidáno 250 μ l 5 M NaCl (pro přípravu bylo 48,83 g chloridu sodného smícháno s 150 ml destilované vody, následně byl roztok sterilizován v autoklávu), 25 μ l 3 M octanu sodného a 1250 μ l studeného 99 % ethanolu. Směs byla promíchána a inkubována 15 minut v mrazničce. Po skončení inkubace byla směs centrifugována po dobu 15 minut při 10 000 \times g. Supernatant byl znovu odstraněn a sediment byl rozpuštěn v 100 μ l TE pufru. Izolovaná DNA byla použita pro další analýzy.

4.2.2 Měření koncentrace a čistoty izolované DNA

První použitou metodou pro analýzu DNA bylo spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA. Pro tyto účely byl použit přístroj NanoDrop 2000. Měření se provádělo oproti slepému vzorku, v případě jablka byl aplikován TE pufr, který byl použit při izolaci i uchovávání vzorků. V případě izolace DNA pomocí kitu, byl použit eluční pufr P8. Při měření byly na čočku spektrofotometru nanесeny 2 μ l vzorku (vzorek obsahující DNA byl vždy dobře promíchán). Potom následovalo měření absorbance v rozmezí 220-350 nm a stanovení koncentrace izolované DNA. Měření se provádělo třikrát u každého vzorku.

4.2.3 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Před prováděním PCR analýzy byly všechny vzorky zředěny na koncentraci 10 ng/ μ l. Příprava směsí pro real-time PCR probíhala ve speciálních sterilních boxech, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků. Před použitím a po skončení práce byly boxy sterilizované UV světlem po dobu 15 minut. Komponenty potřebné k provádění PCR byly uchovávány v mrazničce a před použitím byly úplně rozmražené. Množství potřebné pro analýzu jednoho vzorku je uvedeno v Tabulka 1.

Na začátku byly všechny komponenty kromě roztoku obsahujícího templátovou DNA smíchány v prvním boxu v jedné 2 ml zkumavce, potom byl celý objem rozpipetován do mikrozkušavek po 24 μ l. V druhém boxu byl do většiny zkumavek přidán 1 μ l DNA. Jak bylo napsáno v kapitole 4.2.1.1, DNA izolovaná z listu jabloně byla použita jako pozitivní kontrola. Pro PCR analýzy byly použity dva páry primerů s různou specifitou. Jedny z těchto primerů byly specifické pro rostlinnou DNA a jedny pro DNA jabloně [37, 38].

Tabulka 1. Složení směsi pro 1 vzorek pro real-time PCR

| Komponenty | Objem (μl) |
|-----------------|------------|
| Voda | 9,5 |
| SYTO9 MasterMix | 12,5 |
| Primer R | 1 |
| Primer F | 1 |
| Vzorek | 1 |
| Celkem | 25 |

Tabulka 2. Teplotní profil pro real-time PCR při použití primerů specifických pro rostlinnou DNA

| Krok | Počet cyklů | Teplota (°C) | Čas (s) |
|----------------------|-------------|--------------|---------|
| Počáteční denaturace | 1 | 95 | 300 |
| Denaturace | 40 | 95 | 30 |
| Annealing | | 52 | 30 |
| Elongace | | 72 | 40 |
| Závěrečná elongace | 1 | 72 | 300 |

Tabulka 3. Teplotní profil pro real-time PCR při použití primerů specifických pro DNA jabloně

| Krok | Počet cyklů | Teplota (°C) | Čas (s) |
|----------------------|-------------|--------------|---------|
| Počáteční denaturace | 1 | 95 | 180 |
| Denaturace | 40 | 95 | 30 |
| Annealing | | 52 | 30 |
| Elongace | | 72 | 40 |
| Závěrečná elongace | 1 | 72 | 180 |

Tabulka 4. Sekvence primerů specifických pro rostlinnou DNA [39]

| Primery | Sekvence 5' → 3' |
|---------|-----------------------------|
| ITS-2 F | ATG CGA TAC TTG GTG TGA AT |
| ITS-2 R | GAC GCT TCT CCA GAC TAC AAT |

Tabulka 5. Sekvence primerů specifických pro DNA jabloně [38]

| Primery | Sekvence 5' → 3' |
|-------------|-----------------------------|
| MdFKBP65a F | GAT GAC CAT CGA CAG CAA GG |
| MdFKBP65a R | TGA CAG ATC CCA GGC TTT ACA |

4.2.4 Agarózová gelová elektroforéza

Pro provedení elektroforézy bylo připraveno 100 ml 1,2% agarózového gelu. Pro přípravu gelu bylo naváženo 1,2 g agarózy do Erlenmeyerovy baňky. Potom bylo přidáno 100 ml 0,5 × TBE pufu. Tato směs byla několikerým zahřátím v mikrovlnné troubě přivedena k varu (minimálně 5x) do úplného rozpuštění agarózy. Následně se počkalo 5 minut, a dále se přidalo 5 μl interkalačního barviva Midori Green. Směs byla jemně promíchána. Do předem připravené

formy se vložil hřebínek a rozpuštěná agaróza do něj byla nalita. Směs byla ponechána k zatuhnutí 30 minut.

Během tuhnutí gelu byly nachystané vzorky. Do každého vzorku byl přidán nanášecí pufir PCR Loading buffer Red load v poměru 1:5, to znamená, že na 5 dílů vzorku se přidal jeden díl nanášecího pufiru. Vzorky byly dobře promíchány. Po zatuhnutí gelu byl odebrán hřebínek a do každé jamky bylo napipetováno 5 μ l vzorku. Do jedné jamky bylo také přidáno 5 μ l standardu.

Nakonec byla forma vložena do elektroforetické vany a zalita po rysku $0,5 \times$ TBE pufrem. Vana byla připojena ke zdroji elektrického napětí, který byl nastaven na 80 V po dobu 2 hodin. Po skončení uvedeného času byly fragmenty DNA v gelu ihned vizualizovány pomocí UV záření o vlnové délce 302 nm, a gel byl vyfotografován.

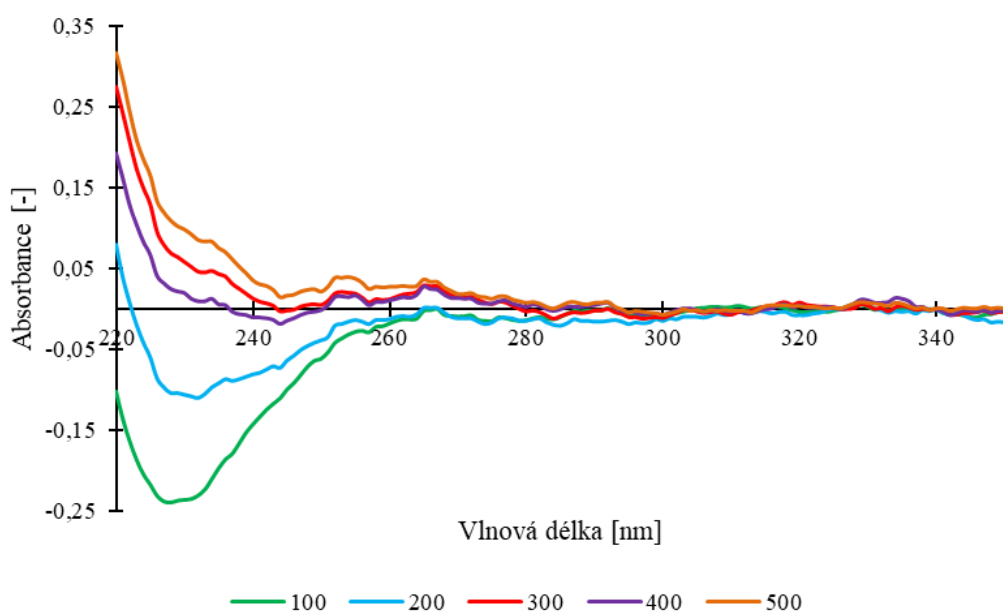
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 První izolace DNA z jablka; homogenizace vzorku pomocí písku

Jak bylo uvedeno v kapitole 4.2.1.2, vzorek byl homogenizován pomocí homogenizačního písku. Samotná izolace byla poměrně obtížná. Po smíchání vzorku s roztokem chloroformu a izoamylalkoholu a následné centrifugaci se na hladině směsi objevila vrstva sacharidů (viskózní, lepkavá kapalina) která bránila v odebrání supernatantu. Přidáním roztoku CaCl_2 se nepodařilo vysrážet celé množství sacharidů a jejich přítomnost byla patrná po celou dobu izolace.

5.1.1 Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA

Spektrofotometrické stanovení probíhalo podle postupu popsaného v kapitole 4.2.2.. Měření každého vzorku probíhalo třikrát a na vyhodnocení byla použita průměrná hodnota ze všech měření.



Obrázek 3. Absorpční spektra izolované DNA. Homogenizace vzorku pomocí písku 100/200/300/400/500 – koncentrace CaCl_2 v mmol/l

Tabulka 6. Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA. Homogenizace vzorku pomocí písku

| Číslo vzorku | Koncentrace přidaného CaCl_2 (mmol/l) | Koncentrace DNA (ng/ μ l) | A260/A280 | A260/A230 |
|--------------|--|-------------------------------|-----------------|-------------------|
| 1 | 100 | 0,60 \pm 0,26 | 1,84 \pm 1,35 | 0,05 \pm 0,02 |
| 2 | 100 | 0,03 \pm 0,21 | - | - |
| 3 | 100 | 0,87 \pm 0,45 | 1,32 \pm 0,06 | 0,07 \pm 0,04 |
| 4 | 200 | 0,23 \pm 0,21 | - | 10,99 \pm 18,63 |
| 5 | 200 | 0,60 \pm 0,10 | 0,81 \pm 0,05 | 0,11 \pm 0,01 |
| 6 | 200 | 0,40 \pm 0,09 | - | - |
| 7 | 300 | 0,50 \pm 0,37 | - | - |
| 8 | 300 | 0,00 \pm 0,01 | - | - |
| 9 | 300 | 0,60 \pm 0,22 | - | 0,20 \pm 0,08 |

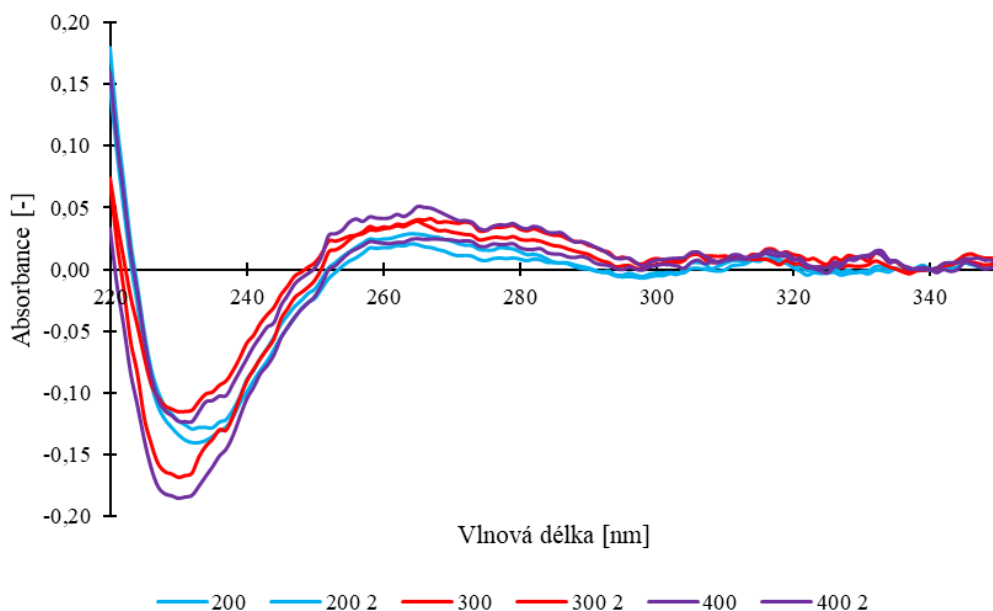
| Číslo vzorku | Koncentrace přidaného CaCl ₂ (mmol/l) | Koncentrace DNA (ng/μl) | A260/A280 | A260/A230 |
|--------------|--|-------------------------|-------------|-------------|
| 10 | 400 | 0,00 ± 0,00 | - | - |
| 11 | 400 | 0,50 ± 0,67 | 3,27 ± 2,50 | 0,54 ± 0,10 |
| 12 | 400 | 1,40 ± 2,53 | 2,45 ± 3,54 | 0,49 ± 0,23 |
| 13 | 500 | 0,40 ± 0,92 | 5,34 ± 8,30 | 0,09 ± 0,26 |
| 14 | 500 | 0,75 ± 0,49 | 0,12 ± 2,55 | - |
| 15 | 500 | 1,40 ± 1,20 | 4,05 ± 0,55 | 0,28 ± 0,07 |

Na Obrázek 3 je vidět, že žádná křivka se tvarem nepodobá spektru typickému pro čistou DNA (při typickém spektru v konvexní části je absorpční minimum při 230 nm, v konkávní je maximum při 260 nm). V Tabulka 6 jsou hodnoty koncentrací velmi malé (v rozmezí 0,0-1,4 ng/μl). Je vidět, že hodnoty koncentrací jsou o málo vyšší při použití 400 mM a 500 mM roztoků CaCl₂ než u ostatních vzorků. Hodnoty poměrů A260/A280 a A260/A230 neodpovídají rozmezí 1,8-2,0, což ukazuje na přítomnost kontaminujících látek. Na základě grafu a hodnot v tabulce lze udělat závěr, že reálná koncentrace přítomné DNA ve všech vzorcích je příliš nízká na to, aby mohla být zaznamenána přístrojem. Z tohoto důvodu nebyla tyto vzorky dále analyzovány.

5.2 Druhá izolace DNA z jablka; homogenizace vzorku ve třecí misce

Jak už bylo zmíněno, při druhé izolaci byl vzorek jablka homogenizován ve třecí misce a potom bylo potřebné množství přidáno do zkumavek. V průběhu izolačního procesu se na hladině směsi obsahující vzorek objevila vrstva sacharidů. Přidáním roztoků CaCl₂ se nepodařilo vysrážet celé množství sacharidů a jejich přítomnost byla patrná po celou dobu izolace. Tento krát byly použity pouze roztoky CaCl₂ s koncentracemi v rozmezí 200-400 mmol/l.

5.2.1 Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA



Obrázek 4. Absorpční spektra izolované DNA. Homogenizace vzorku ve třecí misce

Tabulka 7. Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA. Homogenizace vzorku ve třecí misce

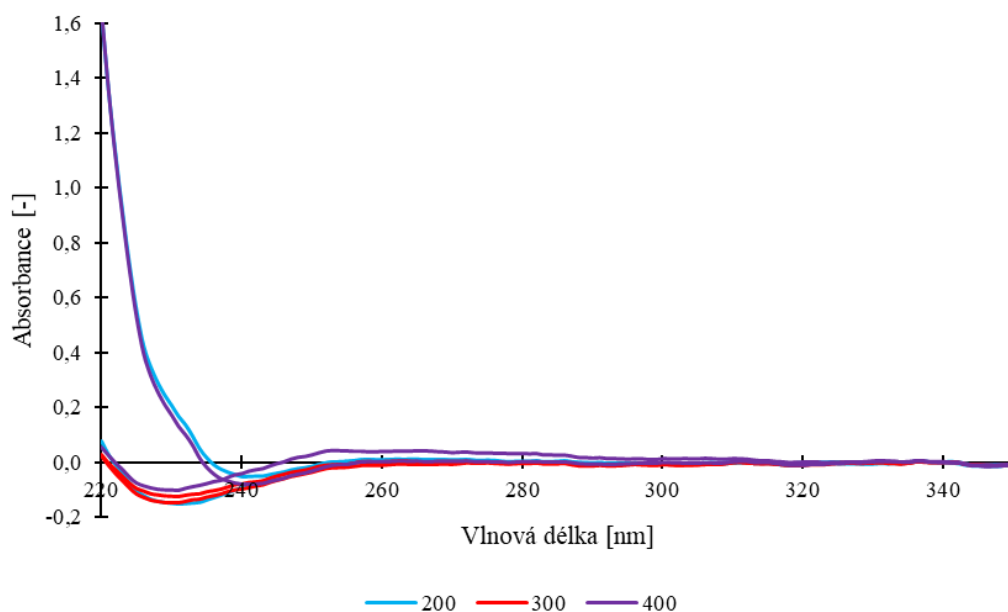
| Číslo vzorku | Koncentrace přidaného CaCl ₂ (mmol/l) | Koncentrace DNA (ng/μl) | A260/A280 | A260/A230 |
|--------------|--|-------------------------|-------------|-----------|
| 1 | 200 | 0,87 ± 0,61 | 0,34 ± 2,89 | - |
| 2 | 200 | 1,23 ± 0,12 | 1,71 ± 0,38 | - |
| 3 | 300 | 1,60 ± 0,26 | 1,46 ± 0,43 | - |
| 4 | 300 | 1,70 ± 0,85 | 1,00 ± 0,28 | - |
| 5 | 400 | 1,07 ± 0,06 | 1,29 ± 0,40 | - |
| 6 | 400 | 2,07 ± 0,42 | 1,26 ± 0,21 | - |

V Tabulka 7 je vidět, že hodnoty koncentrace DNA jsou velmi nízké (v rozmezí 0,87-2,07 ng/μl). Ve srovnání s předchozím postupem jsou však vyšší proto tento typ homogenizace (rozmělnění vzorku v třecí misce) byl použit při dalších izolacích. Při porovnání jednotlivých vzorků je vidět, že při použití více koncentrovaného roztoku CaCl₂ trochu vzrůstá i koncentrace izolované DNA. Hodnoty poměru absorbancí při vlnových délkách 260/280 a 260/230 jsou výrazně nižší, než 1,8 co ukazuje na přítomnost kontaminujících látek, jako jsou proteiny, sacharidy, fenolické látky nebo zbytky činidel použitých během izolace. V tomto případě všechny křivky mají podobný tvar, proto je možné uvažovat, že změna úpravy vzorku měla pozitivní vliv na izolační proces. Navzdory tomu ale izolační křivky (Obrázek 4) obsahují záporné hodnoty, k čemu by nemělo vůbec docházet. Obecně se dá udělat závěr, že přístroj nebyl schopen přesně zachytit a určit množství DNA ve vzorcích kvůli příliš nízké koncentrace DNA a velkému množství kontaminantů, proto izolována DNA nebyla použita při dalších analýzách.

5.3 Třetí izolace DNA z jablka; homogenizace vzorku ve třecí misce a dvojitá inkubace s CTAB puforem

Při provedení třetího pokusu o izolaci DNA došlo k další úpravě postupu (popsáno v kapitole 4.2.1.3). Zmíněné úpravy by měly sloužit k odstranění většího množství fenolických látek a polysacharidů, které kontaminují vzorek a ruší spektrofotometrické měření. Z křivek grafu můžeme předpokládat, že úprava postupu neměla význam pro izolaci DNA z jablka. Jak už bylo zmíněno při správném tvaru absorpčního spektra má křivka minimum při 230 nm a maximum při 260 nm. Na Obrázek 5 je vidět, že absorpční spektra většiny vzorků leží téměř na ose x, což odpovídá slepému vzorku (jako slepý vzorek byl použit TE pufr). To, že použitá úprava vzorků nebyla úspěšná potvrzují výsledky měření koncentrací. Výsledky jsou viditelně nižší, než v kapitole 5.2.

5.3.1 Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA



Obrázek 5. Absorpční spektra izolované DNA. Homogenizace vzorku ve třecí misce a dvojitá inkubace s CTAB puřrem

Tabulka 8. Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA. Homogenizace vzorku ve třecí misce a dvojitá inkubace s CTAB puřrem

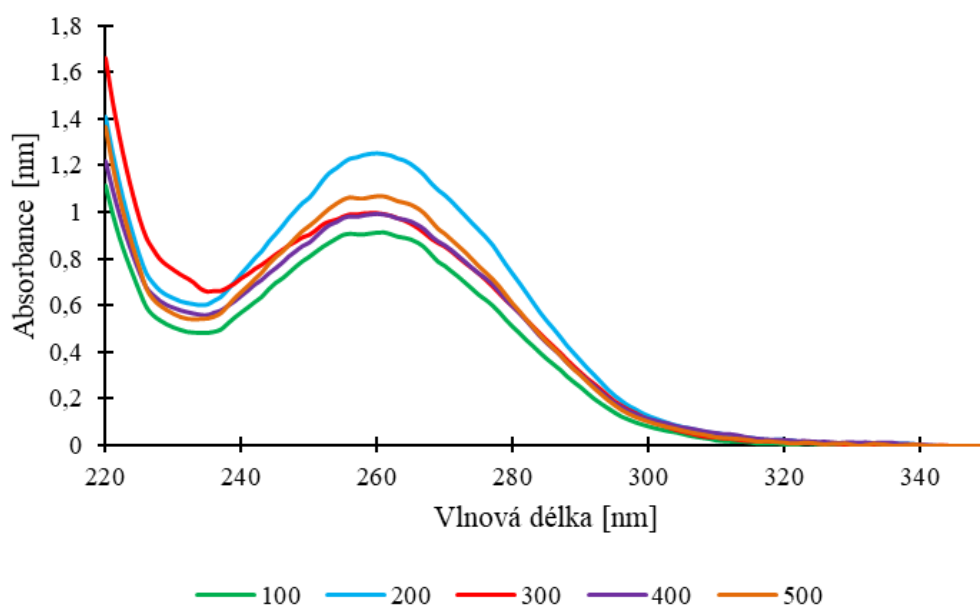
| Číslo vzorku | Koncentrace přidaného CaCl ₂ (mmol/l) | Koncentrace DNA (ng/μl) | A260/A280 | A260/A230 |
|--------------|--|-------------------------|-------------|-------------|
| 1 | 200 | 0,50 ± 0,50 | 1,47 ± 1,25 | - |
| 2 | 200 | 0,33 ± 0,15 | - | 0,03 ± 0,02 |
| 3 | 300 | 0,07 ± 0,23 | - | - |
| 4 | 300 | 0,57 ± 0,23 | - | 0,05 ± 0,03 |
| 5 | 400 | 0,00 ± 0,69 | 3,63 ± 2,00 | - |
| 6 | 400 | 2,03 ± 1,25 | 1,45 ± 0,51 | - |

Z dat v Tabulka 8 je vidět, že hodnoty naměřené koncentrace jsou ještě nižší, než v předchozí kapitole. Souhrn informací z tabulky a grafu ukazuje, že koncentrace izolované DNA je příliš malá na to, aby byla použitelná na další analýzy.

5.4 Čtvrtá izolace DNA z jablka; lyofilizace vzorku

Když se nepodařilo izolovat DNA z čerstvého jablka, bylo rozhodnuto upravit vzorek pomocí lyofilizace, abychom snížili množství tekuté složky. Následně byl vzorek homogenizován ve třecí misce. V průběhu izolace nebyla zaznamenána viditelná přítomnost sacharidů ve vzorcích. Roztoky byly průhledné a neměli na hladině vrstvu viskózní, lepkavé kapaliny.

5.4.1 Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA



Obrázek 6. Izolační křivky izolované DNA. Lyofilizace vzorku

Tabulka 9. Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA. Lyofilizace vzorku

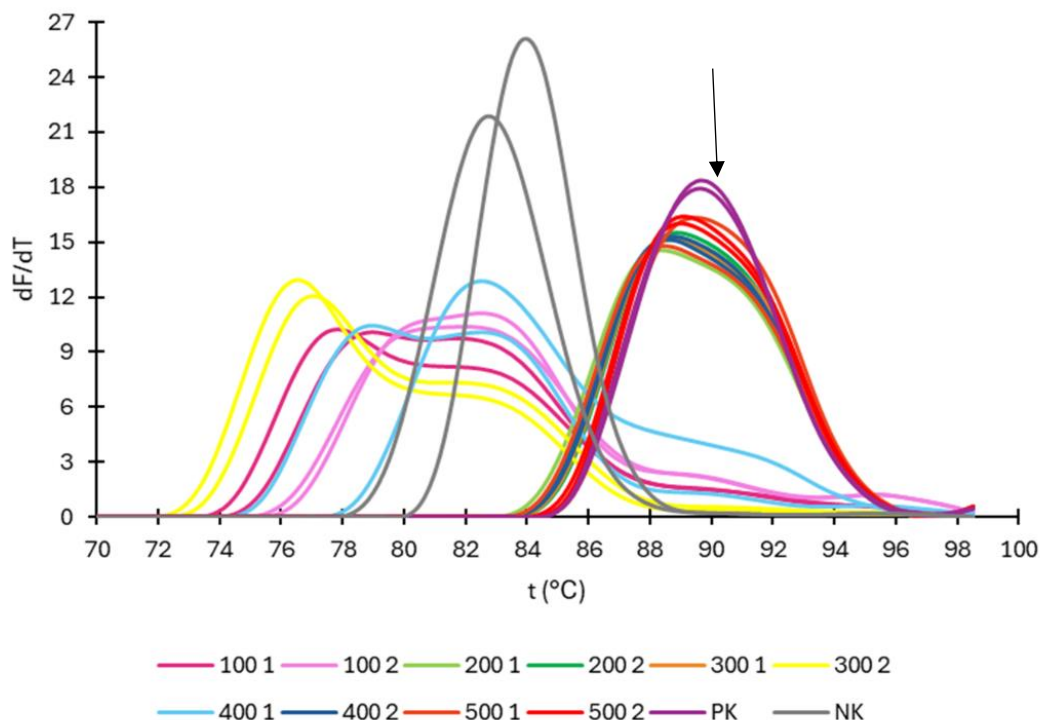
| Číslo vzorku | Koncentrace přidávaného CaCl ₂ (mmol/l) | Koncentrace DNA (ng/μl) | A260/A280 | A260/A230 |
|--------------|--|-------------------------|-------------|-------------|
| 1 | 100 | 45,87 ± 1,77 | 1,78 ± 0,03 | 1,57 ± 0,04 |
| 2 | 100 | 45,73 ± 1,50 | 1,79 ± 0,04 | 1,80 ± 0,08 |
| 3 | 200 | 69,93 ± 1,70 | 1,68 ± 0,01 | 1,92 ± 0,05 |
| 4 | 200 | 62,67 ± 0,76 | 1,71 ± 0,05 | 2,00 ± 0,16 |
| 5 | 300 | 49,77 ± 3,46 | 1,68 ± 0,08 | 1,40 ± 0,30 |
| 6 | 300 | 38,87 ± 0,65 | 1,73 ± 0,03 | 2,08 ± 0,09 |
| 7 | 400 | 28,03 ± 0,84 | 1,88 ± 0,03 | 1,87 ± 0,17 |
| 8 | 400 | 49,50 ± 2,29 | 1,67 ± 0,04 | 1,69 ± 0,10 |
| 9 | 500 | 53,27 ± 2,48 | 1,77 ± 0,06 | 1,90 ± 0,03 |
| 10 | 500 | 48,27 ± 1,27 | 1,77 ± 0,02 | 1,81 ± 0,22 |

Na Obrázek 6 je vidět, že výsledky jsou výrazně lepší než v předchozích případech. Absorpční spektra mají tvar typický pro čistou DNA. To ukazuje, že připravené vzorky obsahují množství DNA, které může být zachyceno přístrojem. Z výsledku je vidět, že na lyofilizovaném vzorku izolační proces funguje úplně jinak, než na čerstvém jablku. Z tohoto důvodu je možné udělat závěr, že úprava obsahu vody je nezbytná. Největší množství DNA bylo izolováno ze vzorků, ke kterým byl přidán 200 mM roztok CaCl₂. Poměr absorbancí A260/A280 je ve většině případů trochu nižší než 1,8. Může to znamenat přítomnost kontaminujících látek, jako jsou proteiny. Poměr absorbancí A260/A230 má ve většině případů hodnoty označující čistou DNA a spadající do rozmezí 1,8-2,0. Vzorky číslo 1, 5 a 8 mají nižší hodnoty, než 1,8 co ukazuje na přítomnost fenolických látek nebo zbytek činidel použitých během izolace. V obou případech

poměrů je kontaminace mírná a proto DNA, která byla izolována v tímto způsobem byla využita pro PCR analýzu a následnou elektroforézu.

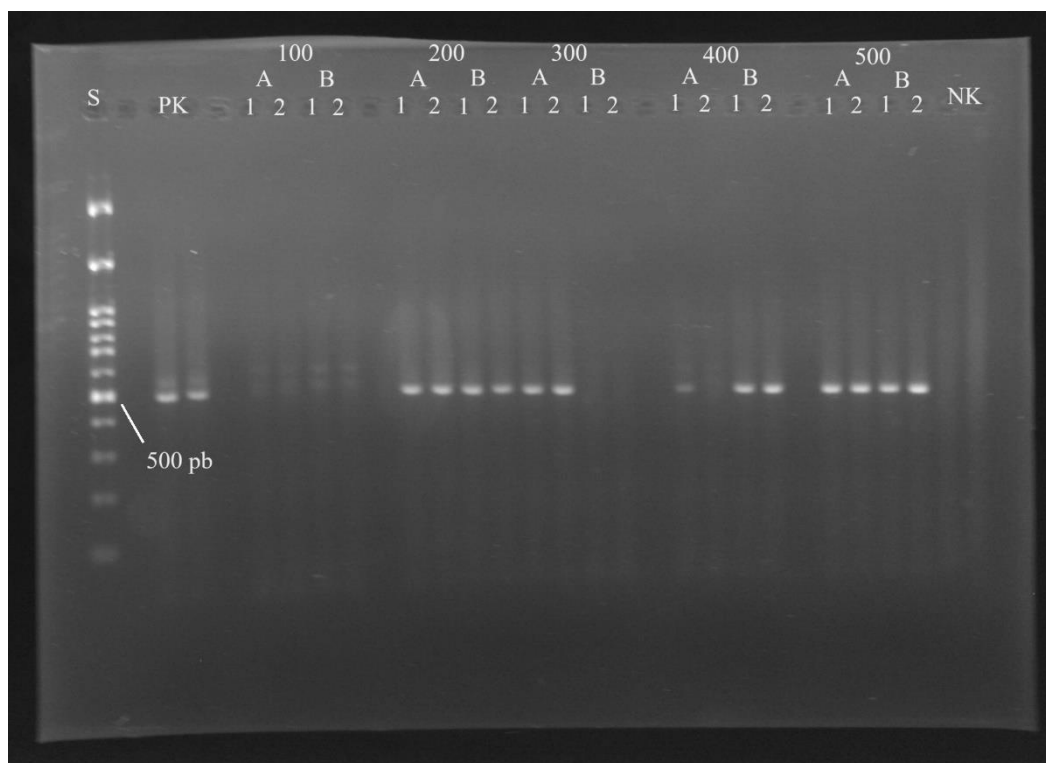
5.4.2 PCR analýza a agarózová gelová elektroforéza s využitím primerů specifických pro rostlinnou DNA

Pro ověření amplifikovatelnosti izolované DNA byla použita real-time PCR s následnou analýzou křivek tání. Všechny vzorky DNA byly naředěny na koncentraci 10 ng/ μ l. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA izolovaná z listu jabloně (její amplifikovatelnost byla předem dokázána). Při tomto měření byly použity primery specifické pro rostlinnou DNA. Teplotní profil byl popsán v Tabulka 2.



Obrázek 7. Křivky tání. 100/200/300/400/500 – koncentrace CaCl_2 v mmol/l, PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola

Černou šipkou jsou označeny píky specifických produktů. Na Obrázek 7 je vidět, že se podařilo amplifikovat DNA u většiny vzorků. U vzorků 100 1, 100 2, 300 2 a 400 1 je množství specifických produktů ve srovnání s ostatními vzorky velmi nízké a nelze s jistotou říct, že DNA byla amplifikována. Přestože vzorky 300 2 a 400 1 měly dobré parametry při spektrofotometrickém stanovení (Tabulka 9), dá se předpokládat, že v tomto případě mohlo dojít k chybě při izolaci DNA (např. k nedostatečnému vysušení vzorku po srážení ethanolem) či při přípravě PCR směsi. Všechny vzorky byly dále analyzovány agarózovou gelovou elektroforézou.

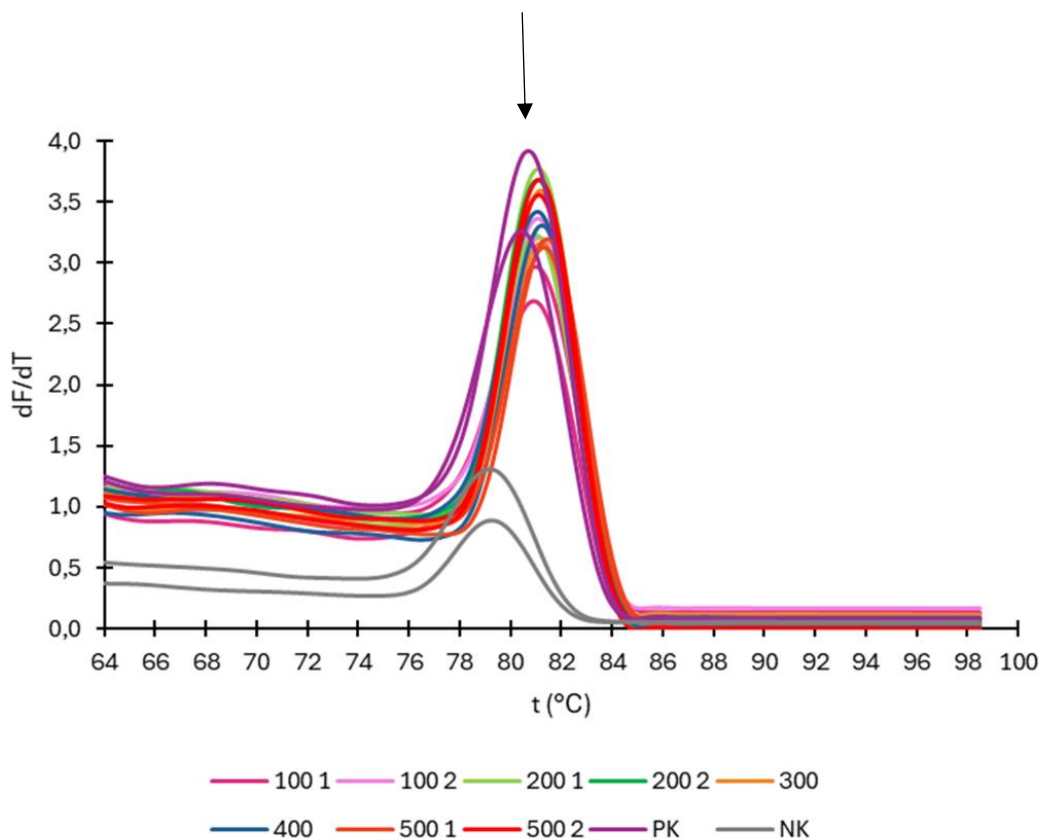


Obrázek 8. Agarózová gelová elektroforéza vzorků DNA, které byly analyzované v kapitole 5.4.2, S – standart, PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola, 100-500 – koncentrace CaCl_2 použitého během izolace DNA

Výsledky po gelové elektroforéze odpovídají výsledkům PCR analýzy. Na Obrázek 7 je vidět, že v případě DNA, která byla izolována s využitím 100 mM CaCl_2 (vzorky 100.A.1 – 100.B.2 na Obrázek 8), vzniklo výrazně nižší množství specifických produktů, než u ostatních vzorků. Mohlo to být způsobeno větším množstvím kontaminantů, které způsobily inhibici PCR analýzy. Dalo by se tedy předpokládat, že použité množství chloridu vápenatého nestačilo na dostatečné přečistění vzorků. Nepovedly se také vzorky 300.B a 400.A, které byly izolovány pomocí 300 mM a 400 mM roztoku CaCl_2 . To, že u vzorků paralelních ke vzorkům 300.B a 400.A pokus vyšel, ukazuje na to, že za tento výsledek nejspíše nebyla zodpovědná koncentrace CaCl_2 , ale pravděpodobně blíže neurčená chyba při přípravě PCR směsi. Délka amplikonů je přibližně 500 pb.

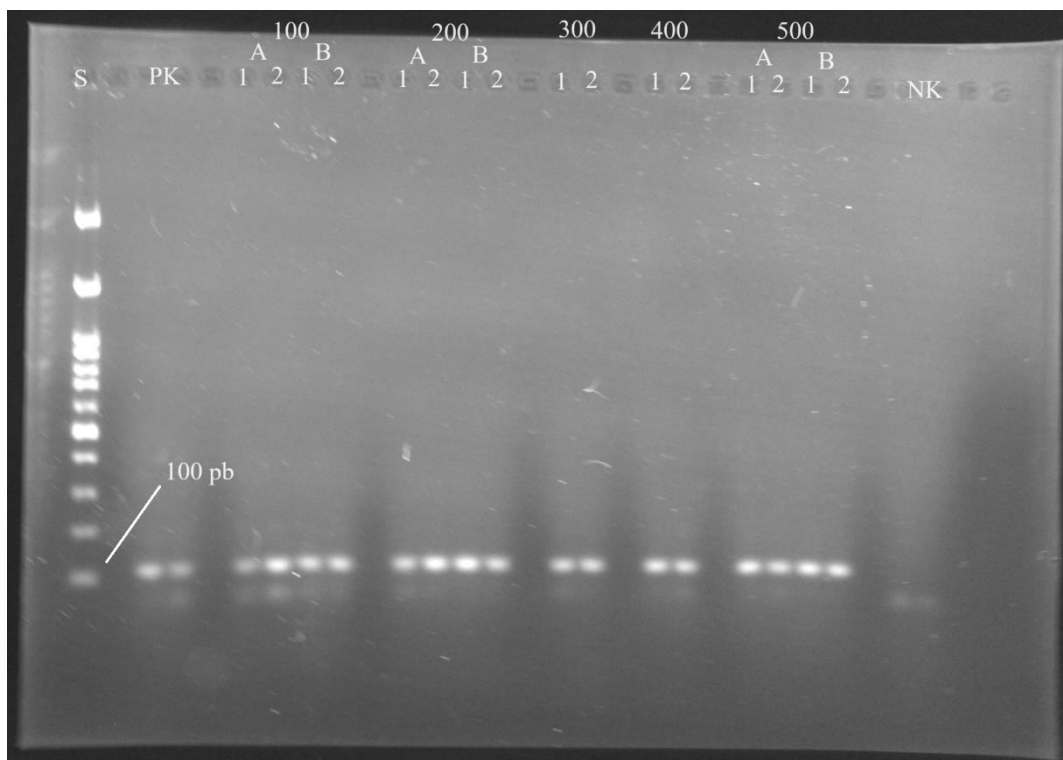
5.4.3 PCR analýza a agarózová gelová elektroforéza s využitím primerů specifických pro DNA jabloně

Při tomto měření byly použity primery specifické pro DNA jabloně. Teplotní profil byl popsán v Tabulka 5. Všechny vzorky DNA byly naředěny na koncentraci 10 ng/ μl . Jako pozitivní kontrola byla použita stejná DNA izolovaná z listu jabloně, jak v kapitole 5.4.2. V této analýze byly vynechány vzorky 300.B a 400.A, které při předchozí PCR analýze nebyly amplifikovány.



Obrázek 9. Křivky tání. 100/200/300/400/500 – koncentrace $CaCl_2$ v $mmol/l$, PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola

Černou šipkou jsou označeny píky specifických produktů. Na Obrázek 9 je vidět, že se podařilo úspěšně amplifikovat DNA u všech vzorků. Na rozdíl od předchozí PCR analýzy, tento krát se amplifikovaly vzorky, které byly izolovány pomocí 100 mM roztoku $CaCl_2$. Také můžeme vidět, že specifické produkty mají nižší teplotu tání, než v kapitole 5.4.2. Kvůli odlišné specifitě primerů, křivky tání v obou případech mají různý tvar. Všechny vzorky byly dále analyzovány agarózovou gelovou elektroforézou.



Obrázek 10. Agarózová gelová elektroforéza vzorků DNA. S – standart, PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola, 100-500 – koncentrace CaCl₂ použitého během izolace DNA

Výsledky po gelové elektroforéze odpovídají výsledkům PCR analýzy. Všechny vzorky byly úspěšně amplifikovány. Délka amplifikonů je přibližně 100 pb. V případě vzorků izolovaných s použitím 100 mM CaCl₂ byl na rozdíl od ostatních vzorků amplifikován pouze kratší amplikon. Mohlo to být spojené s různou citlivostí PCR analýz vůči inhibitorům [41]. Pravděpodobně, 100 mM roztok chloridu vápenatého nestačí na odstranění všech kontaminantů a PCR v předchozí kapitole byla více ovlivněná.

6 ZÁVĚR

Existuje velké množství faktorů, které komplikují nebo brání v izolaci rostlinné DNA. Důvody neúspěšné izolace mohou být nesprávná manipulace, způsoby uchovávání vzorků nebo chyba v postupu. Jedním z nejčastějších problémů je přítomnost kontaminujících látek ve vzorku, jako například proteiny, sacharidy, fenolické látky nebo RNA.

Při izolaci DNA z jablka způsobují největší potíže polysacharidy, které jsou ve velkém množství obsaženy v jablku (pektin, celulóza, fruktóza a podobně). Odstranění těchto látek ze vzorku je dost náročné, ale hlavně nezbytné, protože polysacharidy mohou působit jako inhibitory při izolaci DNA a následné PCR analýze. Proto hlavním cílem této práce byla optimalizace izolačního procesu testováním různých koncentrací roztoků chloridu vápenatého, který polysacharidy sráží [40].

Jako bylo zmíněno výše, jako vzorek bylo použito jablko (čerstvé a lyofilizované), jakožto ovoce, které je bohaté na pektin a zároveň se v různých potravinách rostlinného původu vyskytuje často a ve velkých množstvích [1, 3]. DNA byla izolována podle CTAB protokolu s přídavkem roztoku CaCl_2 .

Jak bylo zjištěno, úprava vzorku lyofilizací byla nutná, protože metoda izolace DNA podle CTAB protokolu z čerstvého (nelyofilizovaného) plodu poskytovala pouze velmi nízké či nulové výtěžky. Pravděpodobně to bylo způsobeno velkým obsahem tekuté složky (vody), která tvoří cca 85 % jablka [3]. Navážka 0,05 g čerstvého jablka tedy obsahovala pouze cca 7,5 mg pevné složky. V případě 0,05 g lyofilizovaného vzorku tvořila pevná složka celé toto množství.

Jak bylo vidět z křivek tání a z výsledků elektroforézy ze všech vzorků, byla získána amplifikovatelná DNA, kromě těch vzorků, které byly izolovány s přidáním 100 mM roztoku CaCl_2 . Tím pádem je možné říct, že pro izolaci amplifikovatelné DNA z jablka stačí koncentrace chloridu vápenatého 200 mmol/l. Větší koncentrace nezpůsobují komplikace, ale jsou zbytečné. Vzorky s 100 mM CaCl_2 se chovaly různě při použití různých primerů. Při použití primerů specifických pro rostlinnou DNA, které amplifikovaly cca 500 bp produkt, se tento produkt na rozdíl od zbytku vzorků nepodařilo detekovat. Až při použití primerů specifických výhradně pro DNA jablka, a amplifikujících kratší produkt, byly vzorky DNA izolované s použitím 100 mM CaCl_2 úspěšně amplifikovány. Pravděpodobně, vzorky izolované pomocí 100 mM roztoku CaCl_2 měli větší množství inhibitorů, které neovlivňují všechny PCR reakce stejně, což také může ukazovat na malou účinnost tohoto množství CaCl_2 [41].

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:

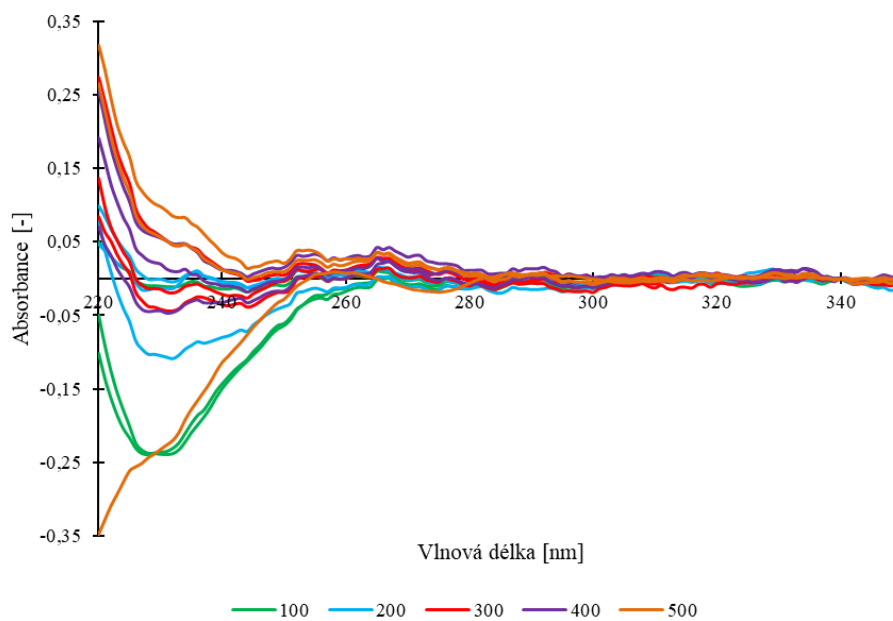
- [1] DOSTÁLOVÁ, Jana a Pavel KADLEC, 2014. *Potravinářské zbožíznalství: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-208-2.
- [2] SCHULZ, Bernd a Gerd GROSSMANN, 2004. *Ovocné dřeviny: řez a tvarování*. V Praze: Knižní klub. ISBN 80-242-1132-7
- [3] HRIČOVSKÝ, Ivan, Vojtěch ŘEZNÍČEK a Josef SUS, 2003. *Jabloně a hrušně*. Bratislava: Příroda. ISBN 80-70-11223-5.
- [4] GESUNDHEIT.GV.AT. *Jablka* [online]. [cit. 2023-03-18]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/clanek/1006-jablka>
- [5] PRIOR R. L.: Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2003, vol. 78, 570-578 p. ISSN 0002-9165.
- [6] DE VRIES, Ronald P., Jaap VISSER, Jeremy A GARSON, Clare GREEN, Stephen D MORRIS-JONES, Robert F MILLER a Alimuddin ZUMLA, 2001. Aspergillus Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides: an important and unrecognised phenomenon. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 65(4), 497-522 [cit. 2024-05-19]. ISSN 1092-2172. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR.65.4.497-522.2001
- [7] VINTER, Vladimír, 2006. *Stavba buněčné stěny* [online]. In: . [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: <http://www.botanika.upol.cz/atlas/anatomie/anatomieCR10.pdf>
- [8] HENDRIKS, A.T.W.M., G. ZEEMAN, Jeremy A GARSON, Clare GREEN, Stephen D MORRIS-JONES, Robert F MILLER a Alimuddin ZUMLA, 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass: an important and unrecognised phenomenon. *Bioresource Technology* [online]. 100(1), 10-18 [cit. 2024-05-19]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2008.05.027
- [9] *Struktura lignocelulózy*. In: [online]. [cit. 2024-05-10]. Dostupné z: http://www.mpg.de/6699705/Schueth_Abb_I_neu_jpg.jpg
- [10] [online]. In: . [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/sci/jaro2013/C7860/um/rostlinna_biochnova.pdf
- [11] PORNSAK, Sriamornsak. *Chemistry of Pectin and Its Pharmaceutical Uses : A Review*. Silpakorn University International Journal [online]. 2003, 206-228 [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: <https://web.archive.org/web/20120603005249/http://www.journal.su.ac.th/index.php/suij/article/viewFile/48/48>
- [12] MELLINAS, Cristina, Marina RAMOS, Alfonso JIMÉNEZ a María Carmen GARRIGÓS, 2020. Recent Trends in the Use of Pectin from Agro-Waste Residues as a Natural-Based Biopolymer for Food Packaging Applications. *Materials* [online]. 13(3) [cit. 2024-05-20]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma13030673
- [13] KOPLÍK, Richard. *Polysacharidy: Studijní materiály k předmětu Chemie potravin* [online]. [cit. 2024-05-10]. Dostupné z: https://web.vscht.cz/~koplikr/CHP_sacharidy_2.pdf

- [14] LUTZ, Kerry A, Wenqin WANG, Anna ZDEPSKI, Todd P MICHAEL, Stephen D MORRIS-JONES, Robert F MILLER a Alimuddin ZUMLA, 2011. Isolation and analysis of high quality nuclear DNA with reduced organellar DNA for plant genome sequencing and resequencing: an important and unrecognised phenomenon. *BMC Biotechnology* [online]. 11(1), 10-18 [cit. 2024-05-19]. ISSN 1472-6750. Dostupné z: doi:10.1186/1472-6750-11-54
- [15] VINOD, K. K. *Total genomic DNA extraction, quality check and quantitation*. Centre for Advanced Studies on Genetics and Plant Breeding, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore. Nov 1-21, 2004.
- [16] SYED, A.M., G.M. MASOOD, Q.H PERVAIZ, V. VIJESHVER, B.F. SEEMI a Q.N. GHULUM, 2004. Rapid DNA isolation protocol for angiospermic plants. *Bulgarian journal of plant physiology* [online]. 30(2), 25-33 [cit. 2024-05-19]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/294690541_Rapid_DNA_isolation_protocol_for_angiospermic_plants
- [17] ZHANG, Lingling, Bo WANG, Lei PAN, Junhua PENG, B.F. SEEMI a Q.N. GHULUM, 2013. Recycling Isolation of Plant DNA, A Novel Method. *Journal of Genetics and Genomics* [online]. 40(1), 45-54 [cit. 2024-05-19]. ISSN 16738527. Dostupné z: doi:10.1016/j.jgg.2012.10.001
- [18] HORÁK, Daniel, Bohuslav RITTICH, Alena ŠPANOVA, Junhua PENG, B.F. SEEMI a Q.N. GHULUM, 2007. Carboxyl-functionalized magnetic microparticle carrier for isolation and identification of DNA in dairy products. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* [online]. 311(1), 249-254 [cit. 2024-05-19]. ISSN 03048853. Doi: 10.1016/j.jmmm.2006.10.1157 Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304885306025418>
- [19] MELZAK, K. A., C. S. SHERWOOD, R. F. B. TURNER a Ch. A. HAYNES. Driving Forces for DNA Adsorption to Silica in Perchlorate Solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1996, roč. 181, č. 2, s. 635-644. ISSN 00219797. DOI: 10.1006/jcis.1996.0421. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002197979690421X>
- [20] BERENSMEIER, S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Appl Microbiol Biotechnol* 73, 495–504 (2006). Doi: 10.1007/s00253-006-0675-0 Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-006-0675-0#citeas>
- [21] RAHMAN, M. M. a A. ELAISSARI. *Temperature and magnetic dual responsive microparticles for DNA separation*. *Separation and Purification Technology*. 2011, roč. 81, č. 3, s. 286-294. ISSN 13835866. DOI: 10.1016/j.seppur.2011.07.030. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383586611004369>
- [22] TEIF, V. B. a K. BOHINC. *Condensed DNA: Condensing the concepts*. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2011, roč. 105, č. 3, s. 208-222. ISSN 00796107. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2010.07.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079610710000659>
- [23] BERÁNEK, Martin, 2016. *Molekulární genetika pro bioanalytiky*. Univerzita Karlova v Praze: Karolinum. ISBN 8024632241.

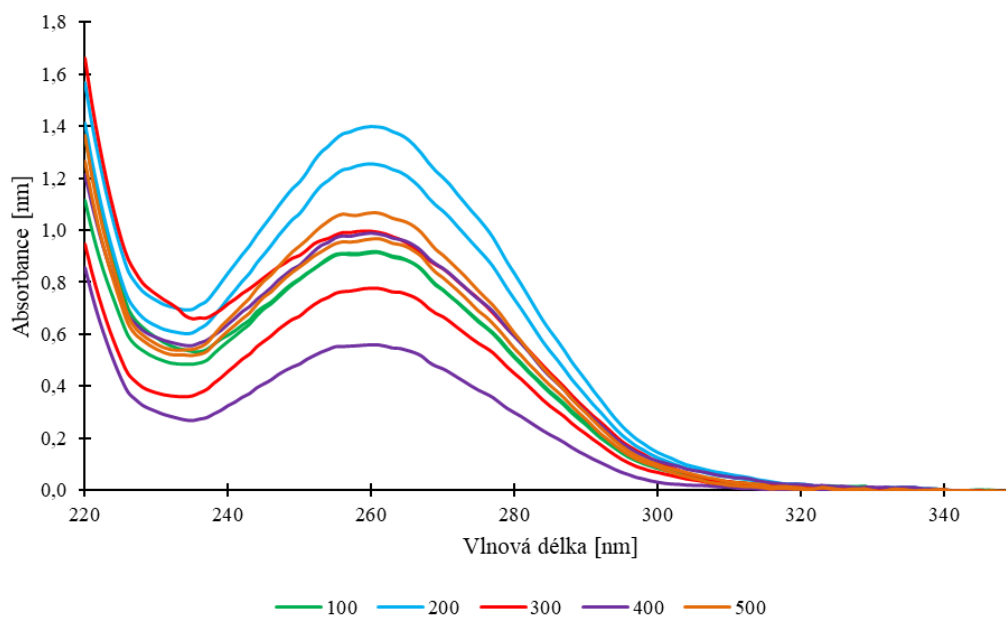
- [24] SAHU, Sunil Kumar, Muthusamy THANGARAJ a Kandasamy KATHIRESAN, 2012. DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol: An art or a science. *ISRN Molecular Biology* [online]. 2012(3), 1-6 [cit. 2024-05-18]. ISSN 2090-7907. Dostupné z: doi:10.5402/2012/205049
- [25] SHEPHERD, Lara D., Todd G. B. MCLAY a Kandasamy KATHIRESAN, 2011. Two micro-scale protocols for the isolation of DNA from polysaccharide-rich plant tissue: An art or a science. *Journal of Plant Research* [online]. 124(2), 311-314 [cit. 2024-05-18]. ISSN 0918-9440. Dostupné z: doi:10.1007/s10265-010-0379-5
- [26] WEIGHARDT F, BARBATI C, PAOLETTI C, QUERCI M, KAY S, DE BEUCKELEER M, VAN DEN EEDE G. *Real-time polymerase chain reaction-based approach for quantification of the pat gene in the T25 Zea mays event*. J AOAC Int. 2004 Nov-Dec;87(6):1342-55. PMID: 15675446. [cit. 2024-05-18] Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15675446/>
- [27] KÁŠ, J., M. KODÍČEK a O. VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2005, 258 s. ISBN 80-708-0586-2.
- [28] ŠMARDA, J.. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2010, 188 s. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [29] KUBISTA, Mikael, José Manuel ANDRADE, Martin BENGTSSON, et al., 2006. The real-time polymerase chain reaction: An art or a science. *Molecular Aspects of Medicine* [online]. 27(2-3), 95-125 [cit. 2024-05-18]. ISSN 00982997. Dostupné z: doi:10.1016/j.mam.2005.12.007
- [30] MA, H., S., K. J., CHEN, G., X. T. QIAO a M. Y. CHUANG. *Application of Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*. J. Am. Sci. 2006, roč. 2, č. 3.
- [31] KRÁLOVÁ, B., L. FUKAL, P. RAUCH a T. RUMML. *Bioanalytické metody*. 3. přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2001. 254 s. ISBN 80-708-0449-1
- [32] ŠPANOVÁ, A. a B. RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 86 s. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [33] RUMML, T., M. RUMLOVÁ a V. PAČES. *Genové inženýrství*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2002. 270 s. ISBN 80-7080-499-8.
- [34] PAGE, Robert B. a Arnold J. STROMBERG. *Linear Methods for Analysis and Quality Control of Relative Expression Ratios from Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Experiments*. [online]. 2011. [cit. 2023-06-11]. DOI: 10.1100/tsw.2011.124. ISSN 1537-744x. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2011/485391/>
- [35] SIBLEY, Christopher D., Gisele PEIRANO, Deirdre L. CHURCH, et al., 2012. Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: Current and potential application in diagnostic microbiology. *Infection, Genetics and Evolution* [online]. 12(3), 505-521 [cit. 2024-05-18]. ISSN 15671348. Dostupné z: doi:10.1016/j.meegid.2012.01.011

- [36] GRAYSON, Nicolas. *Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. Analytical and bioanalytical chemistry* [online]. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2010, 396(6), 2003-2022 [cit. 2024-05-11]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-009-3343-2
- [37] CHEN, Shilin, Hui YAO, Jianping HAN, et al., 2010. Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. *PLoS ONE* [online]. 2010-1-7, 5(1) [cit. 2024-05-12]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0008613
- [38] DONG, Qinglong, Ke MAO, Dingyue DUAN, et al., 2018. Genome-wide analyses of genes encoding FK506-binding proteins reveal their involvement in abiotic stress responses in apple. *BMC Genomics* [online]. 19(1) [cit. 2024-05-12]. ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/s12864-018-5097-8
- [39] MA, Yao, Jingmiao LI, Mingjing TIAN, et al., 2020. Authentication of Chinese prickly ash by ITS2 sequencing and the influence of environmental factors on pericarp quality traits. *Industrial Crops and Products* [online]. 155(1) [cit. 2024-05-12]. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2020.112770
- [40] ŽYLKOVÁ, Kateřina. *Vliv polysacharidové kontaminace na molekulárně-biologickou analýzu* [online]. Brno, 2023 [cit. 2024-05-19]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zavprace/detail/149078>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Lenka Fialová.
- [41] HUGGETT, Jim F, Tanya NOVAK, Jeremy A GARSON, Clare GREEN, Stephen D MORRIS-JONES, Robert F MILLER a Alimuddin ZUMLA, 2008. Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon. *BMC Research Notes* [online]. 1(1) [cit. 2024-05-19]. ISSN 1756-0500. Dostupné z: doi:10.1186/1756-0500-1-70

8 PŘÍLOHY



Příloha 1. Absorpční spektra izolované DNA. Homogenizace vzorku pomocí písku. 100/200/300/400/500 – koncentrace CaCl_2 v mmol/l



Příloha 2. Izolační křivky izolované DNA. Lyofilizace vzorku. 100/200/300/400/500 – koncentrace CaCl_2 v mmol/l