



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

IZOLACE DNA Z VYBRANÝCH ZELENINOVÝCH VÝROBKŮ (PAPRIKA)

DNA ISOLATION FROM SELECTED VEGETABLE PRODUCTS (PAPRIKA)

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Sabína Gőghová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Aleš Kovařík, CSc.

BRNO 2018

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1224/2017
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Sabína Gőghová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **RNDr. Aleš Kovařík, CSc.**
Akademický rok: 2017/18

Název diplomové práce:

Izolace DNA z vybraných zeleninových výrobků (paprika)

Zadání diplomové práce:

1. Vyhledání a kritické zpracování dostupné literatury k dané problematice.
2. Izolace DNA z papriky a výrobků obsahující papriku.
3. Ověření kvality izolované DNA pomocí PCR
4. Zpracování získaných experimentálních výsledků.
5. Vyhodnocení experimentů formou diskuse.

Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

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

Bc. Sabína Gőghová
student(ka)

RNDr. Aleš Kovařík, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá mikroizolací rostlinné DNA z 10 různých technologicky zpracovaných potravinových výrobků obsahujících papriku (*Capsicum annum*). DNA v kvalitě vhodné pro PCR byla izolována z homogenátů připravených v lyzačním roztoku s CTAB pomocí magnetických částic PGMA funkcionalizovaných karboxylovými skupinami. Kvantita a kvalita DNA byla stanovena spektrofotometricky a ověřena metodami PCR s primery specifickými pro rostlinnou rDNA. Kvalita izolované DNA se lišila v závislosti na technologickém zpracování výrobků. DNA izolovaná z uzené mleté papriky a z tepelně ošetřených výrobků (s výjimkou jednoho výrobku) byla degradovaná a amplifikovala se jen s primery F_26S a R_26S (produkt PCR o velikosti 220 bp) na rozdíl od primerů F_18S a R_5.8S (produkt PCR 700 bp). DNA izolované z dalších potravinových výrobků se amplifikovaly s primery F_18S a R_5.8S (produkt PCR 700bp). PCR produkt z jedné mleté papriky (Žitavská paprika) byl klonován a sekvencován.

ABSTRACT

The diploma thesis deals with micromethod of DNA isolation from ten differently processing food products containing pepper (*Capsicum annum*). PCR ready DNA was isolated by magnetic particles PGMA functionalized by carboxyl groups from homogenates prepared in lysis buffer with CTAB. Quantity and quality of DNA was estimated using spectrophotometric measurements and verified using PCR methods with primers specific for plant rDNA. Quality of isolated DNA varied depending on processing technology. DNA isolated from smoked grinded peppers and from heat treated food products was degraded and amplified with primers F_26S and R_26S (PCR product 220 bp) in contrary to the primers F_18S and R_5.8S (PCR product 700 bp). DNA isolated from the other food products was amplified with primers F_18S and R_5.8S (PCR product 700 bp). PCR product from one grinded pepper (Žitavská paprika) was cloned and sequenced.

KLÍČOVÁ SLOVA

izolace DNA, magnetické částice, polymerasová řetězová reakce (PCR), paprika

KEYWORDS

Isolation of DNA, magnetic particles, polymerase chain reaction (PCR), paprika

GÓGHOVÁ, S. *Izolace DNA z vybraných zeleninových výrobků (paprika)*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 99 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Aleš Kovařík, CSc..

PROHLÁŠENÍ

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

.....

Sabína Góghová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce panu RNDr. Alešovi Kovaříkovi, CSc., paní doc. RNDr. Aleně Španové, CSc. a panu doc. Ing. Bohuslavu Rittichovi CSc. za odborné vedení, ochotu, cenné rady a čas, který mi věnovali při zpracování této diplomové práce. Zvláštní poděkování patří mé rodině za jejich podporu během mého studia.

1.	ÚVOD.....	9
2.	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Autenticita potravin.....	10
2.1.1	Metody detekce falšování potravin	10
2.2	Polymerasová řetězová reakce	11
2.2.1	Komponenty pro PCR	12
2.3	Metody izolace DNA	12
2.3.1	Lyze buněk	13
2.3.2	Izolace DNA.....	13
2.4	Pevné nosiče.....	14
2.4.1	Magnetické nosiče.....	14
2.5	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA	16
2.6	Gelová elektroforéza na agarose	17
2.7	Inhibitory PCR.....	17
2.8	Přenos genů	18
2.9	Vliv technologického zpracování potravin na degradaci DNA	18
3.	CÍL PRÁCE	20
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
4.1	Chemikálie a výrobky	21
4.1.1	Chemikálie	21
4.1.2	Komponenty pro PCR	21
4.1.3	Magnetické částice	22
4.1.4	Použité kontrolní DNA.....	22
4.1.5	Použité potravinové výrobky	22
4.2	Použité mikroorganismy	25
4.3	Použité kity	25
4.4	Roztoky a média.....	25
4.4.1	Kultivační půdy pro přípravu médií	25
4.4.2	Roztoky pro homogenizaci a lyzi rostlinných buněk	25
4.4.3	Roztoky pro izolaci DNA.....	26
4.4.4	Roztoky pro gelovou elektroforézu.....	26

4.5	Přístroje a pomůcky	27
4.6	Metody	27
4.6.1	Homogenizace rostlinných tkání a potravinových výrobků s použitím lyzačního roztoku s CTAB	27
4.6.1.1	Přečištění DNA pomocí směsi chloroform:oktanol	28
4.6.1.2	Přečištění DNA srážením isopropanolem	28
4.6.2	Izolace DNA z homogenátu rostlinných tkání a potravinových výrobků pomocí magnetických mikročásteček	28
4.6.3	Stanovení koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky	30
4.6.4	Příprava směsí pro PCR a provedení PCR	30
4.6.5	Gelová elektroforéza produktů PCR	33
4.6.6	Preparativní gelová elektroforéza produktů PCR	34
4.6.6.1	Izolace PCR produktů z gelu a jejich přečištění	34
4.6.6.2	Ligace amplikonu do vektoru	34
4.6.6.3	Transformace plasmidu do buněk E. coli	35
4.6.6.4	Selekce transformantů	35
4.6.6.5	PCR z jedné bakteriální kolonie	35
4.6.6.6	Přečištění amplikonů pro sekvencování	36
4.6.7	Restrikční analýza produktů PCR	36
4.6.8	Bioinformatická analýza	36
5.	VÝSLEDKY	37
5.1	Optimalizace množství navážky pro izolaci DNA z čerstvého lusku Žitavské papriky	37
5.1.1	Ověření amplifikovatelnosti DNA v PCR	40
5.2	Izolace a purifikace DNA z čerstvého lusku Žitavské papriky	44
5.3	Izolace DNA z mletých sušených výrobků	47
5.3.1	Izolace DNA z mleté Žitavské papriky	47
5.3.2	Izolace DNA z mleté Eko papriky sladké	50
5.3.3	Izolace DNA z mleté Eko papriky dimljena	53
5.3.4	Izolace DNA z mleté Kalocsa kőrnýéki őrölt papriky	57
5.3.5	Izolace DNA z koření Serious Blends	59
5.4	Izolace DNA z potravin obsahujících papriku	61

5.4.1	Izolace DNA z pomazánky Namaz	62
5.4.2	Izolace DNA z pomazánky Pindjur	64
5.4.3	Izolace DNA z pomazánky Ljutenica.....	65
5.4.4	Izolace DNA z pomazánky Ajvár	68
5.4.5	Izolace DNA z pomazánky Piros Arany.....	70
5.5	Příprava amplikonů 700 bp a 400 bp Žitavské papriky na sekvencování a vyhodnocení sekvencí	72
5.6	Kontrola intaktnosti izolované DNA	76
5.6.1	Ověření amplifikace v PCR.....	78
5.7	Ověření specifity produktů PCR (350 bp)	80
6.	DISKUSE.....	82
6.1	Optimalizace navážky pro izolaci DNA z čerstvé papriky	82
6.2	Izolace, purifikace a amplifikace DNA z čerstvého lusku Žitavské papriky	82
6.3	Izolace a amplifikace DNA z mletých sušených výrobků	83
6.3.1	Izolace DNA z mleté Žitavské papriky	83
6.3.2	Izolace a amplifikace DNA z mleté Eko papriky sladké.....	84
6.3.3	Izolace DNA z mleté Eko papriky dimljena (uzená).....	84
6.3.4	Izolace DNA z mleté Kalocsa környéki örölt papriky (uzená)	85
6.3.5	Izolace DNA ze Serious Blends	85
6.4	Izolace DNA z potravin obsahujících papriku	86
6.4.1	Izolace DNA z pomazánky Namaz	86
6.4.2	Izolace DNA z pomazánky Pindjur	86
6.4.3	Izolace DNA z pomazánky Ljutenica.....	86
6.4.4	Izolace DNA z pomazánky Ajvár	87
6.4.5	Izolace DNA z pomazánky Piros Arany.....	87
6.5	Sekvenování klonů PCR produktů z Žitavské papriky	87
6.6	Kontrola intaktnosti izolované DNA	88
6.7	Ověření specifity produktů PCR (350 bp a 400 bp).....	88
7.	ZÁVĚR	89
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	90
9.	SEZNAM ZKRATEK.....	98

10.	SEZNAM PŘÍLOH.....	99
-----	--------------------	----

1. ÚVOD

Rozšíření analytických technik pro detekci falšování potravin, pro ochranu spotřebitele je velmi důležité. Instrumentální metody umožňují detegovat různé sloučeniny rychle a s velkou citlivostí. Výrobci potravin produkující nesprávně označené potraviny mohou používat postupy které znesnadňují detegovat odlišnosti, a tak umožnit prodávat méně kvalitní produkty jako kvalitní. Od objevu polymerasové řetězové reakce (PCR) je kladen velký důraz na molekulárně biologické metody. Analýzou specifických bílkovin a nukleových kyselin lze získat velice cenné informace týkající se detekce alergenů a genově modifikovaných organismů (GMO). DNA je odolnější molekula při technologickém zpracování potravin než bílkoviny, proto má přednost používání metody PCR, i když imunochemické analýzy nejsou zanedbatelné. Z komplexních vzorků může být izolace DNA v kvalitě vhodné pro PCR náročná. S odstraněním inhibitorů izolovaných spolu s DNA se zabývá velký počet prací. Kromě přítomnosti inhibitorů může zabránit amplifikaci DNA i její degradace DNA v důsledku chemických, tepelných nebo enzymatických procesů při výrobě. Kromě detekce falšování potravin PCR možnost kontrolovat mikrobiologickou nezávadnost potravin bez potřeby kultivace.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Autenticita potravin

Kvalita potravin má důležitý význam pro spotřebitele i potravinářský průmysl. Analýza původu nutrientů a ingrediencí potravin je primární pro ochranu konzumentů proti podvodům. Mezi hlavní způsoby falšování patří nahrazení dražších ingrediencí za levnější, kvalitnější za méně kvalitní. Typickým případem je falšování olivového oleje, který je nahrazen palmovým, slunečnicovým nebo mandlovým olejem. Kromě klamání spotřebitele to může být nebezpečné pro zdraví konzumenta, pokud do potravin jsou přidány i alergeny, např. nahrazení olivového oleje lískovým [1].

2.1.1 Metody detekce falšování potravin

Běžné techniky založené na fyzikálně-chemických principech, jako jsou chromatografické (HPLC, GC) a spektroskopické metody jsou hojně v laboratořích využívány, ale záměny biochemicky obdobných materiálů jsou těžko detegovatelné. Chromatografické metody umožňují rychlou a spolehlivou separaci molekul z komplexních vzorků. Metoda kapalinové chromatografie je založena na separaci molekul na základě rozdílné polarit, náboje a velikosti molekul. Plynová chromatografie účinně separuje těkavé látky. Techniky založené na měření izotopického složení potraviny jsou hojně využívány pro detekci falšování vína, ovocných produktů, medu a dalších potravin. Dle poměru izotopů H nebo O pocházejících z vody, N nebo C pocházejících z půdy v zemědělských oblastech a poměru izotopů S typických pro různé geologické oblasti lze zjistit původ vzorků [2]. V posledních letech se stoupá zájem o analýzy na základě molekulárně biologického složení potravin. Mezi novější techniky patří proteomika, pomocí které lze získat informace o struktuře a funkci proteinů. Metoda je užitečná při získání informací o změně proteinů. Proteomické metody jsou nejčastěji kombinovány s hmotnostní spektrometrií. Detekce nesprávně označených potravin bohatých na bílkoviny jako je maso a mléční výrobky, jsou analyzované na základě obsahu myoglobinů, hemoglobinů a kaseinů. Další často falšované potraviny jako jsou med a víno mohou být také analyzovatelné proteomickými metodami; chemické metody jsou ale rozšířenější [3]. Imunologické techniky jsou založeny na specifických interakcích mezi protilátkou a antigenem – jsou rychlé, specifické a citlivé a cenově dostupné [2].

Metody založené na analýze DNA, jako je například polymerasová řetězová reakce (PCR), představují důležitý prostředek pro určení původu potravin [4, 5], identifikaci alergenů [6] a detekci genově modifikovaných organismů (GMO) [7, 8]. Analýza na základě nukleových kyselin vyžaduje vyhledání úseků DNA, které jsou specifické pro daný druh organismu. Metoda je velice citlivá, pozitivní signál je získán již z malého množství DNA ($1 \cdot 10^{-12}$ g). Moderní inovací konvenční PCR je PCR v reálném čase (qPCR). PCR v reálném čase oproti konvenční PCR má velkou výhodou v rychlosti provedení analýzy a získání dalších informací o vzorku, jako je stanovení koncentrace. Do reakční směsi se přidávají fluorescenční barviva, fluorescenčně značené sondy nebo fluorescenčně značených primery.

Fluorescence je měřena v každém cyklu PCR. Nárůst intenzity fluorescence je přímo úměrný množství ampliconů ve vzorku. Výsledky jsou kvantifikovány dle amplifikačních křivek [7].

PCR jako možnost analýzy potravin získala velkou pozornost po zjištění nesprávného označení potravin po detekci koňského masa v masných výrobcích z hovězího masa. Pomocí PCR byly zjištěny přídavky krevních bílkovin a dalších živočišných tkání do masných výrobků jako náhrada svaloviny [9]. Textura masných produktů je často upravována přídavkem mouky. Pro zvýšení výživové hodnoty a jako náhrada masa však není akceptovaná. Sójové izoláty, koncentráty a mouky jsou levným zdrojem proteinů. Z tohoto důvodu jsou nejpoužívanější – lze se setkat i s přídavkem hráškové a rýžové mouky. Kromě klamání spotřebitele velké množství rostlinného materiálu zvyšuje vlhkost a tím vytváří optimální prostředí pro množení mikroorganismů, nemluvě o tom, že sója je známým alergenem [10]. Nahrazení buvolího mléka kravským je účinně detegovatelné pomocí PCR. Modifikace jako RAPD a SCAR byly úspěšně použity pro detekci původu mléka v mléčných výrobcích, což se sleduje např. při potravin s chráněným označeným původu [9].

Izolace nukleových kyselin je proto důležitým krokem pro všechny metody založené na analýze DNA. V praxi se používá celá řada postupů pro izolaci nukleových kyselin. Vzhledem k zaměření práce bude hlavní pozornost zaměřena na izolaci DNA z rostlinných tkání s cílem získat DNA v kvalitě vhodné pro analýzu molekulárně biologickými metodami (PCR).

2.2 Polymerasová řetězová reakce

Metoda je rychlá a citlivá, na amplifikaci teoreticky stačí jedna molekula DNA, která slouží jako templát pro cyklicky se opakující syntézu nového vlákna. Pravidelně se střídají 3 kroky:

- Denaturace: na začátku reakce je molekula DNA se zahřívá na 95 °C na 5 minut, při kterém dochází k přerušení vazeb mezi dvoušroubovice a oddělení řetězců. Stabilita DNA při vyšších teplotách je závislá na obsahu G-C, mezi kterých jsou tři vodíkové můstky a tím jsou odolnější vůči vyšším teplotám.
- Annealing – připojení primérů k odděleným řetězcům: renaturace templátu ochlazením na 50–65 °C. Optimální teplota závisí na délce oligonukleotidových primérů a na poměru A-T/G-C, obecně o 5 °C nižší teplota než teplota tání (T_m). Syntéza probíhá ve směru 5' → 3'.
- Elongace – syntéza nových řetězců DNA za katalytického působení DNA polymerasy: DNA polymerasa se připojením na 3' konce primerů syntetizuje nové vlákno DNA dle templátu. Tento krok se nejčastěji probíhá při 72 °C [11-13].

Reakce se probíhá v termocykleru, kde teplota se mění podle vybraného programu v daných časových intervalech. Optimální počet cyklů se pohybuje v rozmezí 25–35. Při amplifikaci

neporušeného úseku DNA reakci lze získat 2^n amplikonů (kde n je počet cyklů). Chemická, mechanická, tepelná a enzymatická úprava potravin však může degradovat vysokomolekulární DNA na kratší fragmenty. V takých případech je lepší amplifikovat kratší úseky DNA s délkou 80 až 200 bp [11-14].

2.2.1 Komponenty pro PCR

Směs pro PCR obsahuje následující komponenty:

- Voda pro PCR: slouží pro doplnění směsi na požadovaný objem.
- Pufr pro PCR: vytváří optimální prostředí pro DNA polymerasu, složení je specifické pro každou polymerasu, obsahuje Tris-HCl, soli NaCl nebo KCl a Mg^{2+} ionty.
- Primery: deoxyoligonukleotidy skládající se z 18–25 nukleotidů komplementární k templátu. Primery *forward* (5') a *reverse* (3') by neměly být vzájemně komplementární, oba priméry by měly mít podobnou teplotu tání s optimálním obsahem G/C a A/T.
- dNTP: používají se 4 typy nukleotidů (2'- deoxyribonukleosid-5'-trifosfátů) – dNTP (N = guanosin, adenosin, thymidin nebo cytydin)
- DNA polymerasa: termostabilní polymerasa z různých termofilních mikroorganismů. *Taq* DNA polymerasa z *Thermus aquaticus* má pouze 5'→3' aktivitu a je neschopná opravovat chyby vzniklé při replikaci. Pro přesnější syntézu se používá *Pwo* a *Pfu* polymeráza z *Pyrococcus woesei* a *Pyrococcus furiosus*, které mají 3'→5' exonukleasovou aktivitu. *Tth* polymeráza z *Thermus thermophilus* je také hojně využívána, funguje i jako reversní transkriptáza a slouží pro RT-PCR [11, 12].

2.3 Metody izolace DNA

Složení rostlinné tkáně u různých rostlinných druhů se výrazně liší. Chemická různorodost mezi jednotlivými druhy rostlin může mít za následek nedostatečné výtěžky DNA při použití jednoho izolačního postupu [15]. Na rozdíl od izolace DNA z živočišné tkáně nebo mikroorganismů musí být izolační postupy speciálně upraveny pro každý rostlinný druh, a dokonce i pro každou rostlinou tkáň [16, 17]. Z důvodů přítomnosti látek, které mohou interferovat např. při amplifikaci DNA, je její izolace v požadované kvalitě často velice náročná [18]. Největší podíl na složitosti izolace DNA z rostlin mají polysacharidy, polyfenoly proteiny [19]. Proces extrakce DNA z rostlinné buňky zahrnuje odstranění polysacharidů a polyfenolických sloučenin s následnou deproteinizací DNA, její srážení a purifikaci. Častý problém extrakce DNA spočívá ve vytváření komplexů polysacharidů a polyfenolických sloučenin s nukleovými kyselinami.

2.3.1 Lyze buněk

Existuje řada postupů pro izolaci a purifikaci DNA; metoda se volí s ohledem na typ materiálu a na účel pro který bude nukleová kyselina použita. V případě rostlinných buněk, které mají buněčnou stěnu, je potřeba mechanická homogenizace, Počáteční fáze extrakce DNA spočívá v mechanickém rozrušení rostlinné tkáně (např. v třecí misce) v prostředí tekutého dusíku, kdy dochází k dehydrataci tkáně. Je důležité, aby rostlinná tkáň byla zmrazena po celou dobu dezitengrace z důvodu zamezení případné degradace DNA. Během lyze je buněčná stěna rozpuštěna přidavkem dodecylsulfátu sodného (SDS), cetyltrimethylamonium bromidu (CTAB) nebo pomocí jiných detergentů [19-21].

2.3.2 Izolace DNA

DNA se získá z lyzátu buněk extrakcí směsí fenol:chloroformem (1:1) nebo fenol:chloroform:isoamylalkoholem (25:24:1), kde fenol slouží pro denaturaci proteinu, chloroform zvyšuje hustotu organické vrstvy a isoamylalkohol zabráňuje vzniku pěny. Dojde k rozdělení směsi do dvou fází: horní fázi tvoří vodný roztok obsahující DNA; spodní organická fáze je tvořená fenolem (fenolem a chloroformem). Mezi vodnou a organickou fází se nachází mezifáze tvořená denaturovanými proteiny a zbytky buněčných stěn. Další extrakcí směsí chloroform:isoamylalkoholem (24:1) nebo chloroform:oktanolem (24:1) se odstraní zbytky fenolu, [19-21]. Poté se DNA vysráží z vodného roztoku. Nejprve se přidá vysoká koncentrace vhodné soli (2 M NaCl, 2 M LiCl, 3 M octan sodný nebo 10 M octan amonný). Ionty si vytvářejí hydratační obal čímž odejmou DNA vodu (tzv. vysolování). Pak se ke směsi přidá málo polární látka (např. ethanol nebo isopropanol) - snížením polaritý rozpouštědla vede ke srážení DNA. Srážení nukleových kyselin napomáhá ochlazení směsi. Po centrifugaci se sediment promyje 70 % ethanolem za účelem odstranění soli. Po vysušení sedimentu se DNA rozpustí ve vhodném pufru [11]. Během procesu extrakce je DNA chráněna před působením endogenních nukleas přítomností disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) v extrakčním pufru. EDTA chelatuje ionty, které jsou nezbytným kofaktorem většiny endonukleas.

Rostlinné pletivo však často obsahuje velké množství polysacharidů, proteinů, polyfenolů a sekundárních metabolitů, které snižují kvalitu a kvantitu izolované DNA, interferují během měření absorpčního spektra nebo inhibují v PCR. Jelikož složení rostlinných pletiv je velmi různorodé existuje řada modifikací extrakčních postupů upravených pro jednotlivé druhy rostlin. Obvykle je zapotřebí optimalizovat metodu pro daný vzorek (pletivo). Během lyze buněk jsou polyfenoly uvolněny a oxidovány buněčnými oxidasami. Oxidované polyfenoly podléhají ireversibilní interakci s DNA. Izolace DNA z rostlin bohaté na polyfenoly vyžaduje přidavek antioxidantů. Do homogenátu lze přidat N-fenacylthiazolium bromid (PTB), β -merkptoethanol nebo polyvinylpirrolidon (PVP) pro odstranění polyfenolů.

2.4 Pevné nosiče

K izolaci DNA lze vedle fenolové extrakce používat alternativní metody založené na adsorpci DNA na povrch pevných částic jako jsou magnetické nosiče, nebo purifikace nukleových kyselin na chromatografických kolonkách [20]. Gelové chromatografické kolonky umožňují separaci molekul podle velikosti, menší molekuly prostupují do porézní matrice a tím procházejí pomaleji než velké molekuly nukleových kyselin. Afinitní chromatografické kolonky nejčastěji obsahují kladně nabitě nosiče (částice) a fungují jako iontoměničová chromatografie. Magnetické nosiče nebo chromatografické kolonky s DNA se přečistí odmytím nežádoucích molekul, navázaná DNA se eluuje do pufru [11]. Adsorpční techniky jsou rychlé, pomocí kterých lze získat DNA vysoké čistoty bez nutnosti použití toxických organických rozpouštědel (fenolová extrakce).

2.4.1 Magnetické nosiče

Pomocí magnetických mikro a nanočástic lze efektivně a rychle separovat molekuly. V posledních letech se stalo rutinní purifikační metodou, kterou lze dobře automatizovat [22-24].

Magnetické nosiče mají většinou charakter kompozitních materiálů (Obrázek 1). Jsou složeny z vlastní fero – nebo ferimagnetické složky, která tvoří jádro nosiče a je zodpovědná za interakci s vnějším magnetickým polem (tedy za magnetické vlastnosti nosiče) a složky diamagnetické (nemagnetické), která zajišťuje požadovanou interakci s biologickými systémy. Nejpoužívanějšími materiály pro přípravu magnetických jader jsou biokompatibilní magnetické oxidy železa a různé typy feritů ve formě prášků nebo magnetických kapalin [25]. Nejčastěji se používá magnetitové (Fe_3O_4) nebo maghemitové ($\gamma-Fe_2O_3$) jádro. Pro přípravu jádra existuje několik metod, z kterých nejčastěji se lze setkat koprecipitací. Produkce probíhá v bazické prostředí – v přítomnosti amoniaku, kdy molární poměr mezi Fe^{3+} a divalentních solí (Fe^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+}) je roven 2. Chemická reakce pak probíhá dle rovnice:

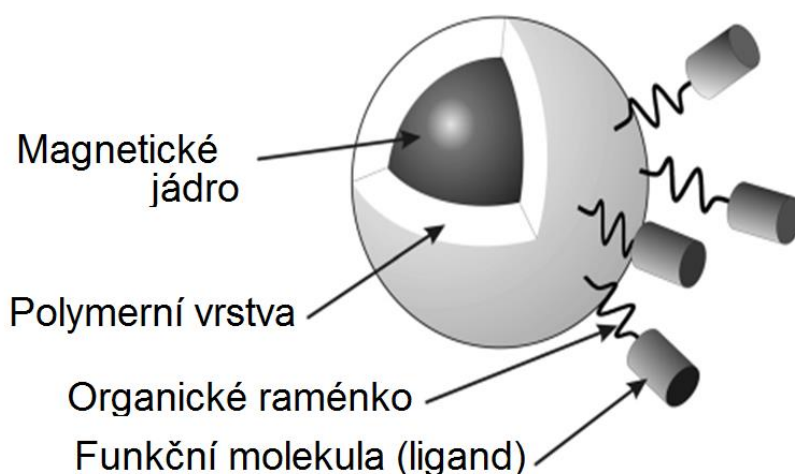


Přídavek oxidačních a chelatačních činidel ovlivňují charakter částic.

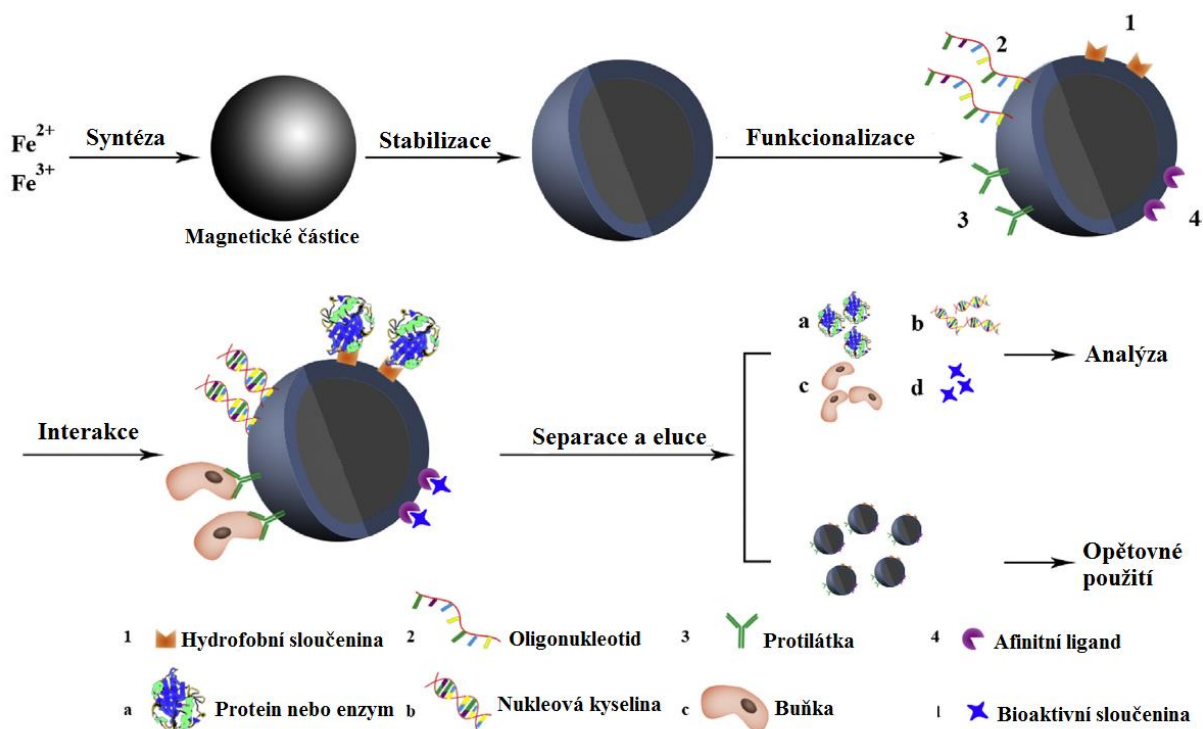
Byly vyvinuty i další méně běžné metody přípravy magnetického jádra jako jsou mikroemulze a termolýza organokovových sloučenin ($Fe(CO)_5$, $Ni(CO)_4$, $Co_2(CO)_8$) [22]. Jádro magnetického nosiče by mělo vykazovat superparamagnetické vlastnosti. Superparamagnetické materiály vykazují magnetické vlastnosti pouze v přítomnosti vnějšího magnetického pole. Výsledkem jsou částice s lepší disperzitou v roztoku bez tvorby agregátů. Citlivost k vnější magnetické poli je mnohem větší než u paramagnetických materiálů. Po vložení vnějšího magnetického pole částice jsou rychle magnetizovatelné, tím umožňují rychlejší a efektivnější separaci i pomocí slabších magnetů. Magnetické jádro jsou stabilní pouze v roztocích s nízkou iontovou silou [22]. K zvýšení stability a k zabránění shlukování nebo sedimentaci nosičů jsou často potaženy

(enkapsulovány) chemicky inertní ochrannou vrstvou. Vnější vrstva slouží jak pro ochranu jádra, tak i pro ochranu biologického materiálu. Úprava povrchu inertním materiálem usnadňuje separaci molekul dle fyzikálních (coulombické a van der Waals interakce) a chemických (vazba např. $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$ a $-\text{PO}_4$ skupin) interakcí [22]. Ochrannou vrstvu může tvořit přírodní (dextran, pullulan, chitosan, alginát, celulóza) nebo syntetický polymer (různé homo- a kopolymery) či anorganický materiál (oxid křemičitý) [22, 26]. Speciálně připravené liposomy jsou také vhodné pro enkapsulaci magnetického jádra. Magnetoliposomy byly použity pro separaci antifosfolipidových proteinů, IgG protilátek a jiných proteinů [23]. Výhodou magnetických materiálů je možnost cílené manipulace působením vnějšího magnetického pole. Přehled typů magnetických nano- a mikročástic pokrytých různými funkčními skupinami a jejich interakcí s DNA je uveden v souhrnné práci [27, 28].

Purifikace nukleových kyselin je základním požadavkem pro práce s DNA a RNA. Časově náročné a pracné metody jako extrakce, srážení a centrifugace pomocí toxických roztoků nejsou žádoucí, protože může docházet k degradaci DNA nebo ke změně její struktury. Pro separaci interakce nukleových kyselin s povrchem částic lze zvýšit v přítomnosti solí, PEG-u nebo SDS [22]. Pro interakci biologických makromolekul a povrchem magnetických částic kromě funkčních skupin jako $-\text{COOH}$ a $-\text{NH}_2$ byly použity další ligandy, které umožňují specifickou separaci. Takými ligandy jsou protilátky, které umožňují separaci dle imunitních reakcí. Jinými ligandy jsou oligonukleotidy, které slouží pro specifické separaci komplementárního jednořetězcové DNA nebo RNA. Vazba oligonukleotidu na povrch částic vyžaduje další úpravu povrchu např. funkcionalizaci $-\text{COOH}$ skupin, přes které se oligonukleotid naváže na magnetické částice (Obrázek 2) [23, 24].



Obrázek 1: Schematická stavba magnetické nosiče. Upraveno dle [29].



Obrázek 2: Obecné možnosti separace biologických molekul pomocí magnetických částic. Upraveno dle [24].

2.5 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Úspěšnost purifikace DNA lze kontrolovat změřením absorbance v UV části spektra v rozsahu vlnových délek 220-320 nm [30]. Delokalizované elektrony mají maximum absorbance při 260 nm. Při této absorbanci lze rovněž stanovit koncentraci DNA; přítomnost RNA však obsah DNA nadhodnocuje. Při denaturaci DNA dochází k růstu absorbance (hyperchromický efekt). Hodnota absorbance je ovlivněna poměrem bází v nukleových kyselinách. Při izolaci DNA se používá řada rozpouštědel, která při nedostatečném odstranění by mohla ovlivnit čistotu izolované DNA. Vzorek může dále obsahovat zbytky bílkovin a další kontaminanty. Fenol, který se používá při extrakci DNA má maximum absorbance při 230 nm. Rovněž některé kontaminující látky (např. huminové kyseliny, rostlinné fenolické látky) koextrahované při izolaci DNA absorbují v oblasti 230 nm. Poměr $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ by měl být větší než 1,8. Přítomnost polyfenolů se zjišťuje z poměru $A_{260\text{nm}}/A_{270\text{nm}}$, který má být v rozmezí 1,2 – 1,3. Bílkoviny obsahující aminokyseliny s aromatickým jádrem mají maximum absorbance při 280 nm a z poměru $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ lze zjistit, zda vzorek je dostatečně čistý [31].

RNA má maximum absorbance při 260 nm a její přítomnost zvyšuje hodnotu koncentrace DNA. Proto je doporučováno odstranění RNA srážením LiCl. Úspěšnost srážení RNA je vhodné kontrolovat pomocí gelové elektroforézy [32]. Při použití enzymu RNasa A dochází sice ke štěpení RNA na kratší fragmenty (které nejsou detegovatelné na gelu), ale

hodnota absorbance se prakticky nemění. Při velmi nízkých koncentracích DNA se používá citlivější metoda s použitím vhodných fluorescenčních barviv, které se vážou na nukleové kyseliny [21, 31].

2.6 Gelová elektroforéza na agarose

Gelová elektroforéza je hojně využívanou separační metodou v oblasti molekulární biologie. Vzhledem k tomu, že fosfátové skupiny v nukleových kyselinách jsou negativně nabitě, molekuly DNA a RNA se pohybují v elektrickém poli k anodě. Molekuly, které mají velký náboj se pohybují rychleji. Při separaci molekul se rovněž uplatňuje síťová struktura gelu [12]. Koncentrace agarosu ovlivňuje velikost pórů a tím i rychlost migrace molekul v elektrickém poli. Agarosovou gelovou elektroforézou se obvykle účinně separují fragmenty DNA s délkou od 100 bp do 25 kbp. Modifikací agarosu hydroxyethylací lze získat agarosu s nízkou teplotou tání, která se používá kdy pro další práci je potřeba izolovat fragment DNA z gelu. Gel z této agarosu obsahuje menší póry, proto fragmenty migrují pomaleji [33]. Pro vizualizaci separovaných molekul se používají interkalační činidla, např. ethidiumbromid, akridinová oranž, nebo profalvin, která se vážou na DNA (mezi oba antiparalelní řetězce) a působením UV-světla fluoreskují [12]. Ethidiumbromid je nejběžněji používaným fluorescenčním činidlem pro vizualizaci DNA po gelové elektroforéze. Nevýhodou je, že mírně snižuje rychlost separace vzhledem ke změně molekulové hmotnosti. Navíc je potencialním mutagenem, proto se vyžaduje při práci s ním zvýšené opatrnosti a dodržení bezpečnostních podmínek. Stejnou citlivost mají i další barviva jako jsou SYBR gold a SYBR green, které jsou méně nebezpečné pro zdraví [33].

2.7 Inhibitory PCR

Neúspěšná amplifikace PCR je často způsobena přítomností inhibitorů ve vzorku a vede k získání falešně negativních výsledků. Z komplexních vzorků jako jsou i rostlinné pletiva, jsou inhibitory často spolusráženy s DNA. Nejčastěji interagují s DNA, degradují nukleové kyseliny nebo se mohou ireversibilně vázat na enzymy, jako je např. na polymerasu. Mohou rovněž tvořit cheláty s kationty Mg^{2+} , které jsou důležitým kofaktorem pro DNA polymerasu [21, 34]. Byl studován vliv některých inhibitorů na různé polymerasy. Byl porovnán denaturační vliv fenolů na *Taq* DNA polymerasu z *Thermus aquaticus* YM-1, *Tth* polymerasu z *Thermus thermophilus* HB8, *Tne* polymerasu z *Thermotoga neapolitana*. Amplifikace byla ověřována při různých koncentracích fenolu v rozmezí 0 – 30 %. Nejnižší odolnost vůči fenolu měla *Taq* polymerasa, která byla funkční jenom do koncentrace 0,1 %, *Tth* a *Tne* polymerasy byly funkční i při koncentraci 1 % fenolu. *Taq* DNA polymerasa byla méně účinná než *Tth* polymerasa v přítomnosti inhibitorů jako jsou krev, různé koncentrace soli NaCl, KCl, $MgCl_2$. *Tne* polymerasa byla nejméně účinná při vyšších koncentracích chloridu sodného [35].

Rostlinné buňky obsahují velké množství polysacharidů, kterých lze obtížně odstranit. Často sráží spolu s DNA a zvyšují viskozitu homogenátu. Ve viskózním prostředí enzymy

jako polymerasy a restriktasy nejsou dostatečně funkční. V některých případech lze polysacharidy odstranit enzymaticky např. celulasou nebo α -amylasou. Mnohem častěji stačí používat detergent s vyšším obsahem soli jako je CTAB v kombinaci s NaCl [20, 21, 35].

Nejenom rostlinná buňka obsahuje inhibitory, ale i zbytky chemikálie použité při extrakci a purifikaci mohou snižovat účinnost reakce. Iontové detergenty SDS a CTAB mají vyšší inhibiční účinnost než neiontové, ale většinou jsou odstraněny během promývání. Fenol již při koncentraci 0,2 % inhibuje funkci polymerasu. Inhibitory ethanol a isopropanol použité při srážení DNA lze odstranit dokonalým vysušením sedimentu [20].

2.8 Přenos genů

Upravené plasmidy jsou vhodnými klonovacími vektory na kterých jsou klonovací místa (buď jedinečná nebo mnohočetná restrikní místa – polylinker). Do restrikních míst se vkládá část cizorodé DNA a vzniká rekombinantní DNA. Plasmidové vektory lze přenášet různými metodami, např. chemickou transformací nebo elektroporací. Chemická transformace je metoda, při které se za použití chloridu vápenatého a tepelného šoku získají kompetentní buňky, do kterých se transformuje cizorodá DNA. Elektroporace je obousměrná metoda, kterou lze přenést do buněk nebo z buněk kromě DNA i jiné molekuly, (např. RNA, proteiny, barviva). K transportu molekul do buněk dochází po aplikaci krátkého elektrického pulzu o vysokém napětí. [30]. Účinnost transformace lze kontrolovat kultivací buněk na půdě obsahující selekční markery [13, 30].

Jiným typem transformace je postup, při kterém je využíván tzv. Yoshida efekt. Principem metody je přenos DNA do nekompetentních buněk pomocí nanojehel v koloidním roztoku. Jemný roztěr směsi buněk a nanojehel způsobuje průnik nanojehel s obsahem DNA do buněk. K tomuto účelu byl používán asbest, který byl nahrazen minerálem sepiol [36]. Klasickými klonovacími vektory jsou plasmidy pUC18, pUC19 a pBR322. Velmi častým hostitelem plasmidových vektorů jsou buňky *Escherichia coli* [32].

2.9 Vliv technologického zpracování potravin na degradaci DNA

Výroba potravin zahrnuje řadu kroků, jako jsou mechanické namáhání, vysoká teplota, vliv pH, použití chemických činidel, které mohou ovlivňovat primární strukturu DNA a způsobovat např.: hydrolýzu, oxidaci a deaminaci DNA. Klasické izolační postupy degradované DNA z technologicky zpracovaných potravin mohou být neefektivní, protože malé fragmenty DNA se obtížně srážejí. V takých případech může být dobrá volba izolace DNA adsorpcí na pevné nosiče. Pomocí adsorpce DNA na kolonky byly izolovány a amplifikovány fragmenty s délkou 84 bp z brambor [37]. Amplifikace DNA izolované z potravinářských výrobků je komplikována její degradací a přítomností inhibitorů PCR [7, 38]. Z důvodu degradace se doporučuje amplifikace kratších úseku DNA, aby se zabránilo získání falešně negativních výsledků. Krátké fragmenty stejně mohou rovněž použity pro zjištění autenticity potravin [39]. Řada studií se zabývala izolací degradované

DNA z genově modifikovaných rostlin jako jsou sójové boby, kukuřice a další. Po mletí sójových bobů endogenní gen dlouhý 1883 bp byl degradován na 836 bp, exogenní gen z 1512 bp na 408 bp [40]. Problematice vlivu teplotního ošetření při sterilizaci zeleniny na amplifikovatelnost rostlinné DNA byla studována v práci [41]. Vlivem teplotního zpracování na fragmentaci DNA se zabývala řada autorů - vysoká teplota způsobuje fyzikální změny a dochází k denaturaci, depurinaci a deaminaci. Kratší fragmenty vznikají během Maillardovy reakce [42, 43]. Vliv teploty na degradaci DNA závisí na vlhkosti vzorku. DNA izolovaná ze sušených sojových bobů po inkubaci při 100 °C po dobu 1 hodiny na rozdíl od vlhkých bobů, nebyla značně degradována [7]. Vaření sójových bobů při 100 °C po dobu 15 min neovlivnilo významně degradaci DNA; naopak sterilace při 121 °C degradoval endogenní geny z 836 bp na 162 bp [40]. Byla rovněž sledována degradace DNA izolované z masa v závislosti teplotě na čase. Vzorky byly vařeny při 99 °C v rozmezí od 10 min do 240 min; pečení masa proběhlo při 200 °C v rozmezí od 10 do 50 min. Delším působením teploty značně narůstal počet krátkých fragmentů DNA [44].

Konzervované Rostlinné výrobky mají často snížené pH. V kyselém prostředí dochází k degradaci DNA depurinací. Štěpením N-glykosidové vazby mezi deoxyribosou a bázemi po hydrolyze 3',5'fosfodiesterové vazby vznikají zlomy na DNA [42]. V literatuře [45] byla popsána degradace DNA při pH 4,0 po inkubaci při 65 °C

Fermentace taky napomáhá degradaci DNA pravděpodobně zvýšenou přítomností DNAs, která je produkována mikroorganismy. Při nízkém pH jsou endonukleasy degradovány rychleji než DNA. Enzymatická degradace je typická pro čerstvé potraviny. Během skladování nebo porušení pletiva jsou endonukleasy uvolňovány z buněk. Nukleasy nejlépe štěpí RNA a ssDNA, dsDNA je stabilnější [7, 46].

3. CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce byla izolace DNA ze sušené mleté papriky, a potravinových výrobků obsahujících papriku v kvalitě vhodné pro PCR.

V práci byly řešeny jednotlivé dílčí úkoly:

1. homogenizace za využití plastového kopistu a příprava lyzátu buněk pro izolaci DNA
2. izolace DNA za využití magnetických částic
3. spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA a zjištění čistoty
4. ověření amplifikovatelnosti DNA pomocí PCR
5. ověření specifity amplikonů

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie a výrobky

4.1.1 Chemikálie

Agarosa pro gelovou elektroforézu (Top – Bio, ČR)

Ampicilin (MP Biochemicals LTD, USA)

β -merkptoetanol (Sigma, St. Louis, USA)

Cetyltrimetylamonium bromid (Sigma, St. Louis, USA)

Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)

DNA standard 100 bp žebříček (Malamité, Moravské Prusy, ČR)

Ethanol a 96 % (Lachema, Neratovice, ČR)

Ethidium bromid (Sigma, St. Louis, USA)

Chlorid sodný (Sigma, St. Louis, USA)

EDTA (kyselina ethylendiaminotetraoctová) (Serva, Heidelberg, SRN)

IPTG (isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid) (Serva, Heidelberg, SRN)

Kyselina boritá (Lachema, Neratovice, ČR)

Lambda DNA (New England BioLabs, USA)

Midori Green (Elisabeth Pharmacon, Brno, ČR)

Nanášecí pufr 10x Yellow Load (Top Bio, Praha, ČR)

Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)

Poly(ethylen glykol) 6 000 (PEG 6 000) (Sigma, St. Louis, USA)

Tris-báze (Tris-hydroxymethyl-aminomethan) (Amresco, Solon, USA)

X-gal (5-bromo-4-chloro-indoyl- β -D galaktopyranosid) (Serva, Heidelberg, SRN)

Všechny chemikálie použité v práci byly v čistotě p. a.

4.1.2 Komponenty pro PCR

Voda pro PCR

10x koncentrovaný reakční pufr (Top-Bio, Praha, ČR)

PCR dNTP mix 10mM (Top-Bio, Praha, ČR)

Oligonukleotidové priméry F_18S, R_5,8S, F_26S, R_26S, Zdf_18S, Zdr_5.8S; SP6 a T7

(vektorové primery)

Taq DNA polymerasa 1.1 - 1U μL^{-1} , 5U μL^{-1} (Top-Bio, Praha, ČR)

LA DNA polymeráza 5 U μL^{-1} (Top-Bio, Praha, ČR)

4.1.3 Magnetické částice

Magnetické mikročástice částice PGMAox - poly(glycidyl methakrylát) funkcionalizované karboxylovými skupinami byly syntetizované na Ústavě makromolekulární chemie AV ČR v.v.i. v Praze Ing. Horákem, CSc.

Vlastnosti magnetických částic: Fe (obsah železav jádre) [%]	5,36
Dn (průměr částic) [μm]	0,7
Dw (průměrná hmotnost) [μg]	0,81
PDI (index polydisperzity)	1,16
Funkční skupiny	-COOH (0,67 mM g^{-1})

4.1.4 Použité kontrolní DNA

Během PCR byly použity jako pozitivní kontrola DNA izolované z rostlin *Nicotiana tabacum* (10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) a *Brassica oleracea* (10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), které byly získané od RNDr. Kovaříka, CSc. (Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i., Brno). Při kontrole intaktnosti izolované DNA byla použita kontrolní *lambda* DNA (50 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), která byla získána od doc. RNDr. Španové, CSc. (FCH VUT, Brno).

4.1.5 Použité potravinové výrobky

V experimentech pro izolaci DNA byl použit lusk čerstvé Žitavské papriky od Doc. Ing. Diviše (FCH VUT, Brno). Další výrobky byly zakoupené v obchodní síti pěti zemí. Použité výrobky jsou popsány v Tabulce 1.

Tabulka 1: Použitý rostlinný materiál a potraviny

Produkt – rostlinný materiál	Typ obalu	Zpracování	Složení	Původ
Žitavská paprika lusk, semínka	-	Čerstvá, mražená	neudáno	Slovensko
Žitavská paprika, sladká mletá	Kovový	Mletí, sušení	neudáno	Slovensko
Kalocsa környéki órölt paprika	-	Mletí, sušení, uzení	neudáno	Maďarsko
Eko paprika, sladka	Papírový	Mletí, sušení	neudáno	Slovinsko

Produkt – rostlinný materiál	Typ obalu	Zpracování	Složení	Původ
Eko paprika dimljena	Papírový	Mletí, sušení, uzení	neudáno	Slovinsko
Koření Serious Blends sladko/pekoče	Skleněný	Mletí, sušení	Červená paprika, čili paprika, černý pepř, česnek, cibule, mořská sůl (94 % směs koření, 6 % soli)	Slovinsko
Pomazánka Ajvár	Skleněný s kovovým uzávěrem	Pečení, mletí, tepelná konzervace	Paprika 73 %, lilek 12 %, ocet, olej, rajčatový koncentrát 3 %, jedlá sůl, cukr, pálivá paprika, koření	Chorvatsko
Pomazánka Namaz	Skleněný s kovovým uzávěrem	Pasterace	Paprika 70 %, hořčice, ocet, jedlá sůl, vinný ocet, cukr, koření, přírodní aróma, barvivo (riboflaviny), rostlinný olej, cibule	Slovinsko
Pomazánka Ljutenica	Skleněný s kovovým uzávěrem	Pasterace	Pečená červená paprika 48 %, rajčata 40 %, slunečnicový olej, česnek, vinný ocet, cukr, jedlá sůl, petržel, čili v prášku 0,17 %	Srbsko
Pomazánka Pindjur	Skleněný s kovovým uzávěrem	Pasterace	Pečená paprika 61 %, lilek 12 %, cibule 12 %, rajčatový koncentrát, slunečnicový olej, jedlá sůl, koření, regulátor kyselosti (ocet), přírodní aroma	Slovinsko
Pomazánka Piros Arany	Kovový	Mletí, chemická konzervace	Paprika a kapie 87 %, jedlá sůl, modifikovaný škrob, zahušťovadlo (xantanová guma), kys. citronová, konzervant (sorbát draselný)	Maďarsko



Obrázek 3: Sušené výrobky pro izolaci DNA papriky: 1 – Žitavská paprika sladká mletá, 2 – Kalocsa környéki örölt paprika, 3 – Eko paprika sladka, 4 - Eko paprika dimljena, 5 - Serious Blensd sladko/pekoče



Obrázek 4: Potraviny s obsahem papriky pro izolaci DNA: 1 – Pomazánka Namaz s paprikou, 2 – Pomazánka Ajvár, 3 – Pomazánka Piros Arany, 4 – Pomazánka Ljutenica, 5 – Pomazánka Pindjur

4.2 Použité mikroorganismy

V experimentech byly použity bakterie *Escherichia coli*, které byly získány od RNDr. Kovaříka, CSc.

4.3 Použité kity

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, SRN)

PCR Cloning Kit (Qiagen, Hilden, SRN)

4.4 Roztoky a média

4.4.1 Kultivační půdy pro přípravu médií

Tekuté LB medium:

10 g trypton, 5 g kvasnicový extrakt a 10 g NaCl se doplní do 1 L destilovanou vodou, pH se upraví 1 M NaOH na hodnotu 7,0. Médium se sterilizuje 20 min. při 121 °C.

Tuhé LB médium AXI (LB agar AXI):

K 1 l LB média se přidá 12 g agaru a sterilizuje se 20 min. při 121 °C. Médium se ochladí na 60 °C a do 150 mL média se přidá 150 µL ampicilinu (100 mg/ml), 225 µL X-GAL (20 mg mL⁻¹) a 17,7 µL IPTG (0,85 M).

SOC médium:

Médium je součástí kitu PCR Cloning Kit (Qiagen)

4.4.2 Roztoky pro homogenizaci a lyzi rostlinných buněk

Lyzační pufr s CTAB:

1 g cetyl triethylammonium bromidu se rozpustí v 10 mL 0,5 M Tris-HCl (pH = 8,0), přidá se 16 mL 5 M NaCl, 2 mL 0,5 M EDTA (pH = 8,0) a 42 mL destilované vody.

0,5 M Tris-HCl (pH = 8,0):

6,05 g Tris-báze se rozpustí v 70 mL destilované vody, pH roztoku se upraví pomocí 1 M HCl na hodnotu 8,0. Roztok se doplní destilovanou vodou na objem 100 mL.

5 M NaCl:

58,4 g NaCl se rozpustí v 150 mL destilované vody, roztok se doplní na objem 200 mL destilovanou vodou.

0,5 M EDTA (pH 8,0):

186,1 g EDTA se rozpustí v 800 mL destilované vody, pH se upraví přidáním asi 20 g NaOH, za stálé kontroly pH roztoku. EDTA se rozpustí při hodnotě pH 8,0. Roztok se doplní destilovanou vodou na 1 litr.

Směs chloroform:oktanol (24:1)

4.4.3 Roztoky pro izolaci DNA

Komponenty pro separaci DNA pomocí magnetických částic:

5 M NaCl:

58,4 g NaCl se rozpustí v 150 mL destilované vody, roztok se doplní na objem 200 mL destilovanou vodou.

40 % PEG 6000:

40 g PEG 6000 se rozpustí v 60 mL destilované vody, roztok se doplní destilovanou vodou na objem 100 mL.

70% ethanol (96% ethanol byl zředěn destilovanou vodou)

Tris-EDTA pufr (TE pufr) pH 7,8:

1 mL 1 M Tris-HCl (pH 8,0) se smíchá 0,2 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0), doplní se destilovanou vodou na objem 100 mL.

1 M Tris-HCl:

121,1 g Tris-báze se rozpustí v 800 mL destilované vody, pH roztoku se upraví pomocí 1 M HCl na hodnotu 8,0. Roztok se doplní destilovanou vodou na objem 1 litr.

K izolaci DNA byly použity magnetické částice PGMAox s koncentrací 2 mg·mL⁻¹ vody.

4.4.4 Roztoky pro gelovou elektroforézu

Agarosový gel 1,2 % (1,2 g agarosy se rozvaří ve 100 mL TBE pufru 0,5× koncentrovaného) – viz 4.6.5.

Agarosový gel 1 % (1 g agarosy se rozvaří ve 100 mL TAE pufru 1× koncentrovaného) – viz 4.6.6.

TBE pufr 5× koncentrovaný:

54 g Tris-báze, 27,5 g kyseliny borité a 20 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0) se rozpustí v 600 mL destilované vody. Roztok se doplní destilovanou vodou na objem menší než 1 litr, pH se upraví pomocí 1 M NaOH na hodnotu 8,0 a konečný objem se doplní na 1 litr.

TAE pufr 50× koncentrovaný:

242 g Tris-báze se rozpustí v 800 mL destilované vody za stálého míchání. Do roztoku se přidá 57,1 mL ledové kyseliny octové a 100 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0). Roztok se doplní destilovanou vodou na objem 1 litr.

Roztok ethidiumbromidu:

100 µL roztoku ethidiumbromidu (5 mg·mL⁻¹) se smíchá s 500 mL destilované vody.

4.5 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy pioneer TM PA 114 (Ohaus, New Jersey, USA)

Centrifuga Mini spin (Eppendorf, Hamburg, SRN)

Laboratorní váhy CS 200 (Ohaus, New Jersey, USA)

Mikropipety Discovery HTL o objemu 10, 20, 200 a 1000 μL (PZ HTL, Polsko)

Mikrovlnná trouba SMW 5020 (SENCOR, ČR)

NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA)

Transluminátor TVR 312A (Spectroline, Albany, USA)

Termostat – Mini Incubator 230V (Labnet, New Jersey, USA)

Zařízení pro elektroforézu Easy-Cast, model B1 (Owl Scientific, Rochester, USA)

Zařízení pro elektroforézu Mini gel unit 7x10 cm (Hofer, Holliston, USA)

Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Endurion (Labnet, Korea)

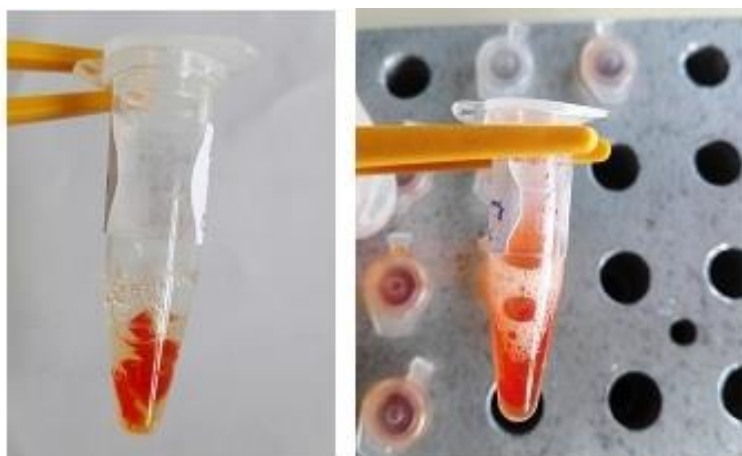
Vortex (BioSan, Lotyšsko)

Běžné laboratorní sklo a umělohmotné laboratorní pomůcky.

4.6 Metody

4.6.1 Homogenizace rostlinných tkání a potravinových výrobků s použitím lyzačního roztoku s CTAB

Tkáně byly nakrájeny na malé kousky a byly naváženy do 1,5 mL Eppendorfových zkumavek, do kterých bylo přidáno 500 μL (pro výrobky 700 μL) roztoku s CTAB. Pro vysrážení polyfenolů byl přidán 1 μL β -merkaptoethanolu. Vzorke byly homogenizovány pomocí kopistu. Teplota homogenizace byla udržována vymraženým kovovým termoblokem. Homogenizace lusk papriky je uvedena na Obrázku 5.



Obrázek 5: Vlevo 150 mg lusk papriky v 500 μL roztoku s CTAB; vpravo lusk papriky homogenizován za chladu

Homogenáty byly inkubovány po dobu 30 min při 60 °C v termostatu.

Po inkubaci byly vzorky centrifugovány po dobu 10 min při 14 500 ot·min⁻¹, a získaný homogenát v CTAB pufru byl odebrán do čisté Eppendorfovy zkumavky.

4.6.1.1 Přečištění DNA pomocí směsi chloroform:oktanol

Homogenáty s DNA byly přečištěny přidáním 500 µL chloroform:oktanolu (24:1). Vzorky byly extrahovány opatrným pohybem 5 minut, a dalších 5 minut byly centrifugovány při 14 500 ot·min⁻¹. Získaný supernatant (homogenát) byl odebrán do čisté Eppendorfovy zkumavky (Obrázek 6). Ze supernatantu byla DNA izolována pomocí magnetických částic podle kapitoly 4.6.2. v případě potřeby byla DNA přečišťována srážením isopropanolem dle 4.6.1.2.



Obrázek 6: Supernatanty z lusku Žitavské papriky, vlevo po extrakci směsí chloroform:oktanol (24:1) , vpravo po inkubaci a centrifugaci

4.6.1.2 Přečištění DNA srážením isopropanolem

DNA v supernatantech byly přečišťovány srážením isopropanolem. Supernatant byl odebrán a byl přidán 0,6×objemu isopropanolu. Po promíchání směsi a centrifugaci (10 min) při 14 500 ot/min supernatant se odstranil a sediment byl opláchnut 70% ethanolem. Směs se centrifugovala 5 minut, supernatant se odstranil, sediment se vysušil a byl rozpuštěn v 150µL TE pufru. Tato přečištěná DNA byla použita pro separaci pomocí magnetických částic.

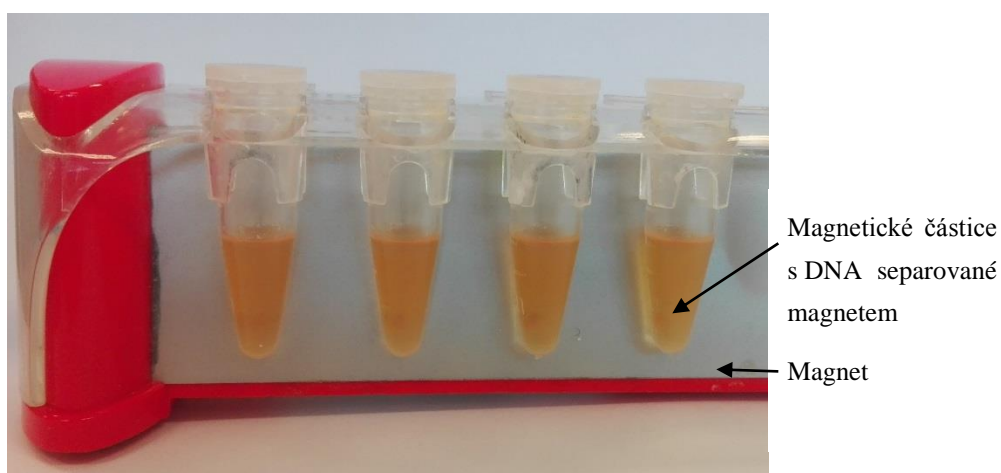
4.6.2 Izolace DNA z homogenátu rostlinných tkání a potravinových výrobků pomocí magnetických mikročástic

Do sterilních Eppendorfových zkumavek byla namíchána separační směs pro izolaci DNA z níže uvedených složek v následujícím pořadí:

Komponenta	Množství [µL]
------------	---------------

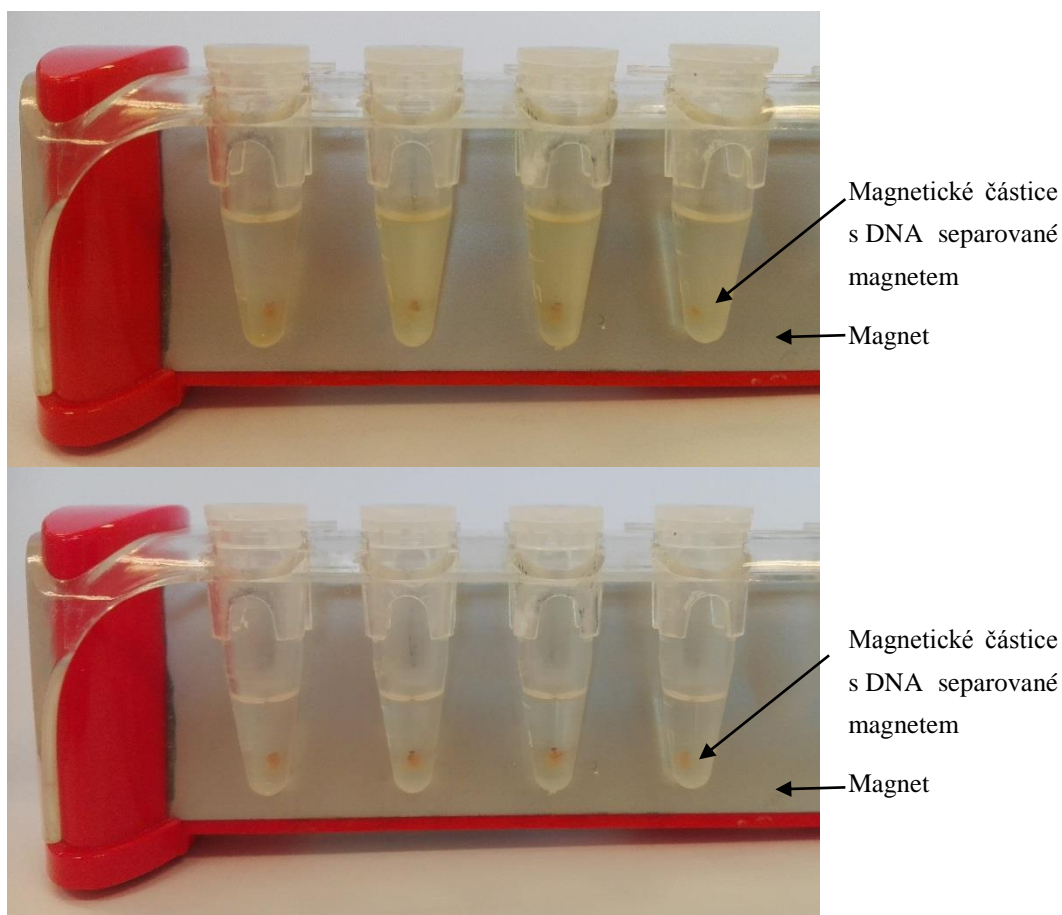
5M NaCl	100
Homogenát (DNA)	150
40% PEG 6 000	200
Magnetické částice	50
Celkem	500

Po přidání jednotlivých komponent směs byla promíchána, a inkubována 15 minut při laboratorní teplotě. Následně docházelo k separaci magnetických částic (Obrázek 7) s navázanou DNA 5 minut při laboratorní teplotě v magnetickém separátoru.



Obrázek 7: Separační směs s homogenátem z potravinových výrobků a magnetickými částicemi přichycenými k magnetu

Supernatant se odpipetoval a po odstranění magnetu byly magnetické částice promývány 500 μL 70 % ethanolu (Obrázek 8). Částice se separovaly 1 minut po přidání magnetu, poté se ethanol odpipetoval. Některé potravinové výrobky s komplexní maticí byly promývány dalším přídatkem 300 μL nebo 500 μL 70 % ethanolu (Obrázek 8).



Obrázek 8: Separační směs, nahoře 1. promývání magnetických částic s navázanou DNA 500 µL 70 % ethanolu, dole 2. promývání 300 µL 70 % ethanolu

Eppendorfovy zkumavky se vysušily při 55 °C v termostatu, a DNA navázaná na magnetické částice se eluovala do 50 µL TE pufru po dobu 20 minut při laboratorní teplotě.

Magnetické částice byly po eluci separovány pomocí separátoru po dobu 1 minuty při laboratorní teplotě, poté se eluát odpipetoval do čisté Eppendorfovy zkumavky. Izolovaná DNA byla ředěna 10x a 100x: 5µL DNA byla přidána do 45 µL TE pufru; po řádném promíchání bylo přidáno 5 µL směsi do 45 µL TE pufru. Takto připravená DNA byla použita pro spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA a pro PCR.

4.6.3 Stanovení koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky

Roztok DNA v TE pufru byl napipetován na čočku přístroje Nanodrop a byla změřena absorbance v rozmezí vlnových délek 220-340 nm proti TE pufru. Byly odečteny hodnoty absorbance při 230, 260, 280 a 320 nm a koncentrace DNA.

4.6.4 Příprava směsí pro PCR a provedení PCR

Komponenty pro PCR byly promíchány a centrifugovány, pro PCR byla namíchána směs v následujícím pořadí:

Komponenta	Objem [μL]
Voda pro PCR	16,5
10 \times koncentrovaný reakční pufr kompletní	2,5
Primér F_18S, F_26S, Zdf_18S nebo SP6 (10 $\mu\text{mol } \mu\text{L}^{-1}$)	1,0
Primér R_5,8S, R_26S, Zdr_5.8S nebo T7 (10 $\mu\text{mol } \mu\text{L}^{-1}$)	1,0
PCR dNTP mix 10mM	1,0
Taq DNA polymeráza 1.1 IU μL^{-1} *	1,0
Templátová DNA	2,0
Celkem	25,0

*V některých případech byla použita LA polymeráza v 0,5 μL , objem byl upraven vodou na 25 μL .

Jako templátové DNA byly použity DNA izolované z lusku papriky *Capsicum annuum* a z analyzovaných výrobků. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA z *Nicotiana tabacum* (10 ng μL^{-1}) nebo *Brassica oleracea* (10 ng μL^{-1}).

Jako negativní kontrola byla použita PCR směs s různými primery bez templátové DNA, která byla nahrazena přidáním 2 μL vody pro PCR. Průběh amplifikace je uveden v Tabulkách 2 – 5.

Kombinace primerů pro rostlinnou DNA	Primer	Velkost produktu PCR	Sekvence 5'-3'	Zdroj		
1	F_18S	700 bp	GCGCTACACTGATGTATTCAACGA G	[47]		
	R_5.8S		CGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGA			
2	F_26S	220 bp	GAATTCACCCAAGTGTGGGAT	[48]		
	R_26S		AGAGGCGTTCAGTCATAATC			
3	Zdf_18S	350 bp	Byly získány od RNDr. A. Kovařika, CSc.			
	Zdr_5.8S					
4	Zdf_18S	400 bp			CGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGA	
	R_5.8S					
5	SP6		CATTTAGGTGACACTATAG	[49]		
	T7		GTAATACGACTCACTATAG	[49]		

Tabulka 2: Program pro amplifikaci 700bp ampliconu (primery F_18S a R_5.8S)

Krok	Teplota [°C]	Čas
1. Zahřívání	95	5 min
2. Denaturace DNA	95	40 s
3. Hybridizace primerů	57	40 s
4. Syntéza řetězce DNA	72	1 min 20 s
5. Opakování kroků 2. – 4. 35×		
6. Dosyntetizování řetězce DNA	72	10 min
7. Ochlazení	10	

Tabulka 3: Program pro amplifikaci 220bp ampliconu (primery F_26S a R_26S)

Krok	Teplota [°C]	Čas
1. Zahřívání	95	5 min
2. Denaturace DNA	95	40 s
3. Hybridizace primerů	57	40 s
4. Syntéza řetězce DNA	72	1 min 20 s
5. Opakování kroků 2. – 4. 35×		
6. Dosyntetizování řetězce DNA	72	10 min
7. Ochlazení	10	

Tabulka 4: Program pro amplifikaci 350bp ampliconu (primery Zdf_18S a Zdr_5.8S) a modifikovaný program pro 700bp (primery F_18S a R_5.8S)

Krok	Teplota [°C]	Čas
1. Zahřívání	95	10 min
2. Denaturace DNA	95	30 s
3. Hybridizace primerů	52	30 s
4. Syntéza řetězce DNA	72	40 s
5. Opakování kroků 2. – 4.		

34×		
6. Dosyntetizování řetězce DNA	72	10 min
7. Ochlazení	10	

Tabulka 5: Program pro amplifikaci ampliconu z jedné bakteriální kolonie (vektorové primery SP6 a T7)

Krok	Teplota [°C]	Čas
1. Zahřívání	92	3 min
2. Denaturace DNA	92	20 s
3. Hybridizace primerů	50	30 s
4. Syntéza řetězce DNA	72	30 s
5. Opakování kroků 2. – 4. 39×		
6. Dosyntetizování řetězce DNA	72	5 min
7. Ochlazení	16	

4.6.5 Gelová elektroforéza produktů PCR

Po ukončení PCR byla provedena agarosová gelová elektroforéza. Byl připraven 1,2 % agarosový gel smícháním 1,2 g agarosu a 100 mL 0,5× TBE pufru. Suspenze byla rozvařena v mikrovlnné troubě do rozpuštění agarosu. Po mírném ochlazení agarosu byl přidán 1 µL barviva Midori Green. Směs byla promíchána a nalita do elektroforetické vaničky s hřebínkem. Po 30 minutách tuhnutí byl hřebínek odstraněn. V Eppendorfově zkumavce bylo po amplifikaci smícháno 25 µL směsi a 5 µL nanášecího pufru. Směs s DNA, pozitivní a negativní kontrola byly naneseny do komůrek gelu. Do jedné komůrky bylo naneseno 5 µL standardu DNA (100 bp žebříček). Gel byl zalit TBE puftrem (0,5× koncentrovaný). Byla provedena elektroforéza při 60 V/3 hodiny. Po skončení elektroforézy byl gel v případě potřeby dobarven ethidium bromidem (0,5 µg mL⁻¹) po dobu 1 hodiny. Gel byl opláchnut destilovanou vodou vyhodnocen pod UV světlem při vlnové délce $\lambda = 305$ nm. Dokumentace gelu byla provedena fotograficky fotoaparátem zabudovaným do mobilního telefonu.

4.6.6 Preparativní gelová elektroforéza produktů PCR

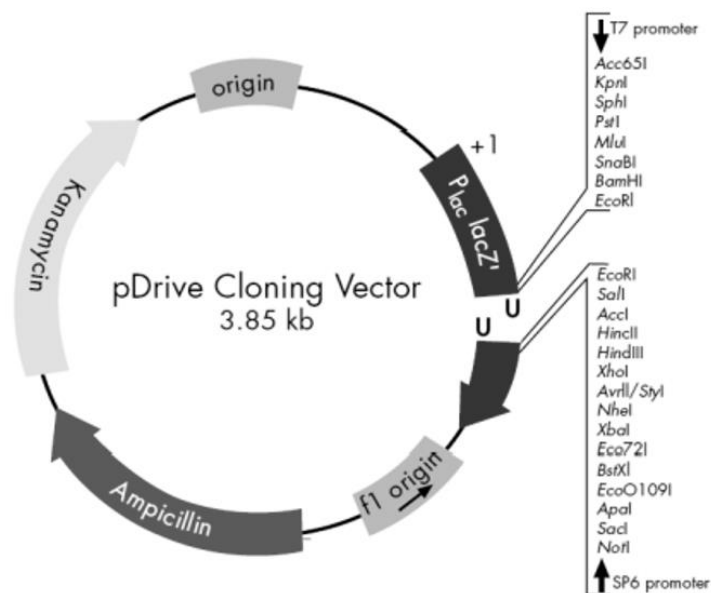
Pro preparativní gelovou elektroforézu produktů PCR byl použit 1× koncentrovaný TAE pufr. Byl rozvařen agarosový 1 % gel, do kterého bylo přidáno 50 μL ethidium bromidu ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). V Eppendorfově zkumavce bylo smícháno 25 μL PCR produktů a 5 μL nanášecího pufru. Na gel byl nanesen nejprve 5 μL produktů PCR a byla provedena elektroforéza při 50 V/1hodinu. Gel byl opláchnut destilovanou vodou a vyhodnocen pod UV světlem při vlnové délce $\lambda = 305 \text{ nm}$. Po ověření detekce amplikonů byly zbývající amplikony spojeny a na gel do velké komůrky bylo nanášeno 60 μL produktů PCR. Byla provedena preparativní gelová elektroforéza při 50 V/1hodinu.

4.6.6.1 Izolace PCR produktů z gelu a jejich přečištění

Byl použit kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey Nagel) pro pro extrakci DNA z agarosového gelu. Agarosa s amplikonem byla navážena do Eppendorfovy zkumavky (130 mg) a bylo přidáno dvojnásobné množství pufru NTI (260 μL) pro rozpuštění agarosy. Směs byla inkubována při 52 °C po dobu 10 min při pravidelném míchání. Po úplném rozpuštění agarosy, směs byla napipetována do zkumavky s kolonkou. Produkty PCR se adsorbovaly na materiál kolonky a centrifugací 14 000 ot/1 min se oddělily od ostatních složek směsi. Adsorbovaná DNA se přečistila pomocí 700 μL promývacího pufru NT3 a znovu se centrifugovala při 14 000 ot/min (úplné odstranění NT3 pufru). Kolonka se vysušila další centrifugací 14 000 ot/3 min. Na kolonku bylo přidáno 25 μL elučního pufru NE, po inkubaci (1 min) při laboratorní teplotě se produkty PCR eluovaly do čisté Eppendorfovy zkumavky centrifugací při 14 000 ot/min.

4.6.6.2 Ligace amplikonu do vektoru

Postup byl proveden podle návodu výrobce kitu Qiagen (PCR cloning kit). Do Eppendorfovy zkumavky bylo přidáno 0,5 μL vektoru pDRIVE (Obrázek 9), 2,0 μL přečištěného amplikonu a 2,5 μL enzymu T4 ligázy s ATP (2×koncentrovaný). Ligace proběhla při 4 °C po dobu 18 hodin. Tak byl připraven rekombinantní plasmid (konstrukt) obsahující plasmid a ligovaný úsek PCR produktu papriky.



Obrázek 9: Mapa vektoru pDrive s vyznačeným místem pro počátek replikace, selekčními markery (gen pro rezistenci k ampicilinu a kanamycinu) a klonovacím místem pro vložení fragmentu cizorodé DNA

[49]

4.6.6.3 Transformace plasmidu do buněk *E. coli*

Předem připravené kompetentní buňky *E. coli* byly skladovány při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ v Eppendorfově zkumavce. Po rozmražení se k $25\text{ }\mu\text{L}$ buněk přidal $1\text{ }\mu\text{L}$ ligační směsi a po 10 min inkubace v ledové lázni následoval tepelný šok, zahřátí na $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 45 s. Do směsi se poté přidalo $300\text{ }\mu\text{L}$ SOC média, které je vhodné pro regeneraci buněk. Buňky se inkubovaly 45 minut při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ před výsevem na tuhé LB médium s ampicilinem, X-gal a IPTG (AXI).

4.6.6.4 Selekcce transformantů

Bylo připraveno tuhé LB médium AXI dle kapitoly 4.4.1. Na tři misky s LB agarem s ampicilinem, X-gal a IPTG (AXI) byly vysety buňky kultivované v SOC médiu po $100\text{ }\mu\text{L}$. Buňky byly kultivovány při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ do druhého dne (přes noc). Druhý den byl kontrolován růst ampicilin rezistentních kolonií a jejich modré nebo bílé zabarvení. Bílé kolonie tvořily transformanty s rekombinantní plasmidovou DNA. Modrou kolonie tvořily transformanty s nerekombinantní plasmidovou DNA.

4.6.6.5 PCR z jedné bakteriální kolonie

Bylo připraveno sedm směsí pro PCR s vektrovými primery SP6 a T7; do každé směsi byla přidána jedna bílá kolonie, kontrolní PCR směs obsahovala jednu modrou kolonii. Pro amplifikaci byl použit teplotní program dle Tabulky 5. Po amplifikaci byla provedena gelová elektroforéza produktů PCR ($3\text{ }\mu\text{L}$ produktů PCR a $3\text{ }\mu\text{L}$ nanášecího pufru). Byla prováděna gelová elektroforéza při 50 V po dobu/1hodiny.

4.6.6 Přečištění amplikonů pro sekvencování

Byl použit kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Podle výsledku gelové elektroforézy bylo vybráno 5 klonů, které byly přečištěny pro sekvencování. Produkty PCR (22 μ L) byly smíchány s 30 μ L sterilní vody a 100 μ L pufru NTI, směs byla nanášena na kolonku, která se centrifugovala 1 minutu při 14 000ot/min. Kolona byla poté promyta 700 μ L promývacího pufru NT3 a opět byla centrifugována 1 minutu při 14 000ot/min. Kolona byla vysušena centrifugací po dobu 3 minut při 14 000ot/min; poté bylo přidáno 25 μ L elučního pufru NE. Po 1 min inkubaci při laboratorní teplotě byla DNA eluována z kolonky centrifugací při 14 000 ot/min. Poté byla provedena kontrola gelovou elektroforézou, na gel byla nanášena směs 3 μ L přečištěných produktů PCR a 3 μ L nanášecího pufru.

Do sterilní Eppendorfovy zkumavky bylo odebráno 5 μ L přečištěného PCR produktu, který byl ředěn přidáním 20 μ L elučního pufru NE. Vzorokly byly poslány na sekvencování do specializované laboratoře (Microsynth GmbH, Rakousko).

4.6.7 Restrikční analýza produktů PCR

Produkty PCR 350 bp byly podrobeny restrikčnímu štěpení. Pufry s restriktasami *RsaI* a *HaeIII* byly přidány po 0,5 μ L do 5 μ L produktu PCR. Pro štěpení amplikonu pomocí *Sau3AI* bylo smícháno 11 μ L vody, 2 μ L pufru, 2 μ L restrikasy *Sau3AI* a 5 μ L produktu PCR. Štěpení proběhlo při 37 °C do druhého dne.

Štěpení produktů PCR 350 bp a 400 bp dále bylo provedeno smícháním 15,5 μ L vody, 2 μ L pufru, 0,5 μ L pufru *Sau3AI* a 2 μ L produktu PCR. Štěpení proběhlo při 37 °C po dobu 2 hodiny.

4.6.8 Bioinformatická analýza

Byla vyhledána sekvence oblasti ITS1 papriky *Capsicum annum*. Sekvence byla přenesena do programu BioEdit, kde byly přiřazeny sekvence primerů Zdf_18S a Zdr_5.8S a Zdr, a primerů Zdf a R_5.8S. Takto označený úsek byl zadán do online programu NEBcutter V2.0, pomocí kterého byly vyhledány cílové místa pro restriktasy. Byly znázorněny teoretické výsledky štěpení, které byly porovnány s fragmenty získanými po štěpení přes noc nebo 2 hodiny.

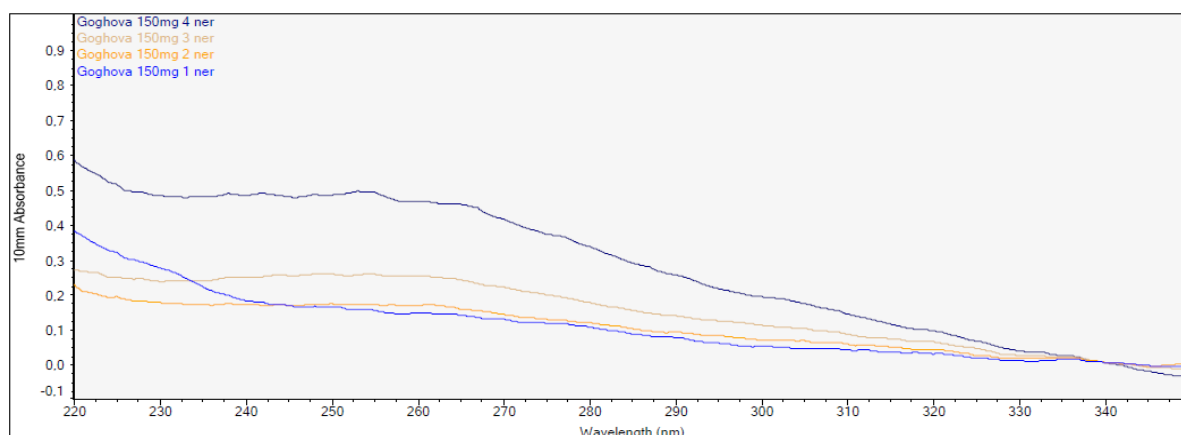
5. VÝSLEDKY

5.1 Optimalizace množství navážky pro izolaci DNA z čerstvého lusku Žitavské papriky

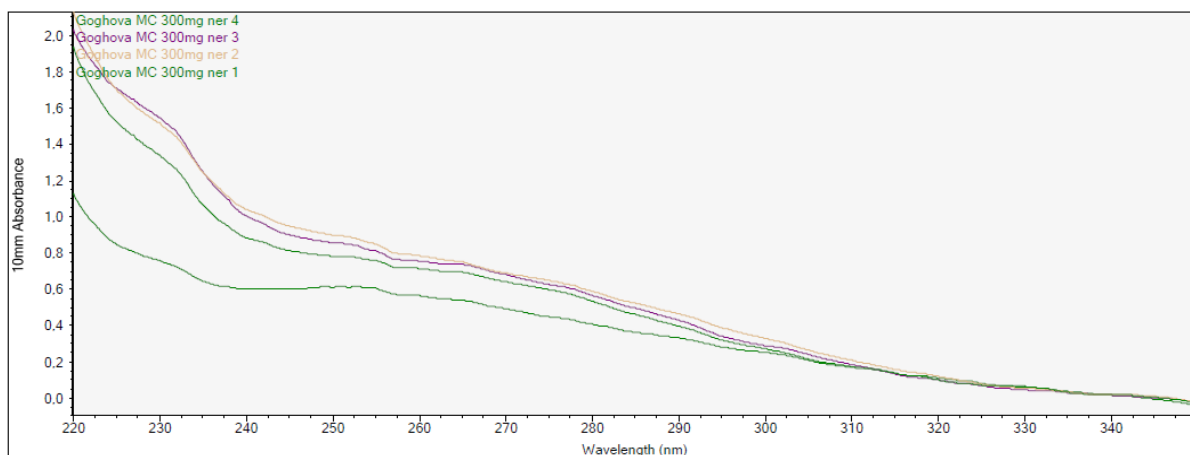
Pro homogenizaci lusku Žitavské papriky byly naváženy různá množství vzorku: přibližně 150, 300, 500 a 700 mg. Navážky byly homogenizovány kopistem v 500 μ L lyzačního roztoku s CTAB dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.1. za chladu (při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$); poté byl přidán β -merkapt ethanol. Každá navážka byla připravena ve čtyřech opakováních. Byla měřena přibližná doba homogenizace podle množství navážky: 150 mg – cca 5 min; 300 mg – cca 6 min; 500 mg – cca 8 min; 700 mg – cca 10 – 12 min. Byla rovněž změřena hodnota pH homogenátu: 150 mg – pH 7; 300 mg – pH 6,5 – 6; 500 mg – pH 6 – 5,5; 700 mg – pH 5 – 4,5. Po inkubaci a centrifugaci byl supernatant odpipetován a DNA byla separována pomocí magnetických částic dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.2. Takto izolovaná DNA byla eluována do TE pufru a byla $10\times$ a $100\times$ zředěna. Byla změřeno absorpční spektrum dle 4.6.3. DNA byla amplifikována dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.4 pomocí primerů F_18S a R_5.8S teplotním programem dle Tabulky 2. Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA izolované z různých navážek je uvedeno v Tabulce 6. Závislosti absorbance na vlnové délce DNA při různých navážkách jsou uvedeny v Grafech 1 – 4.

Tabulka 6: Koncentrace a hodnoty absorbancí DNA izolované z různých navážek Žitavské papriky (lusk) magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β -merkapt ethanolu ve 4 opakováních

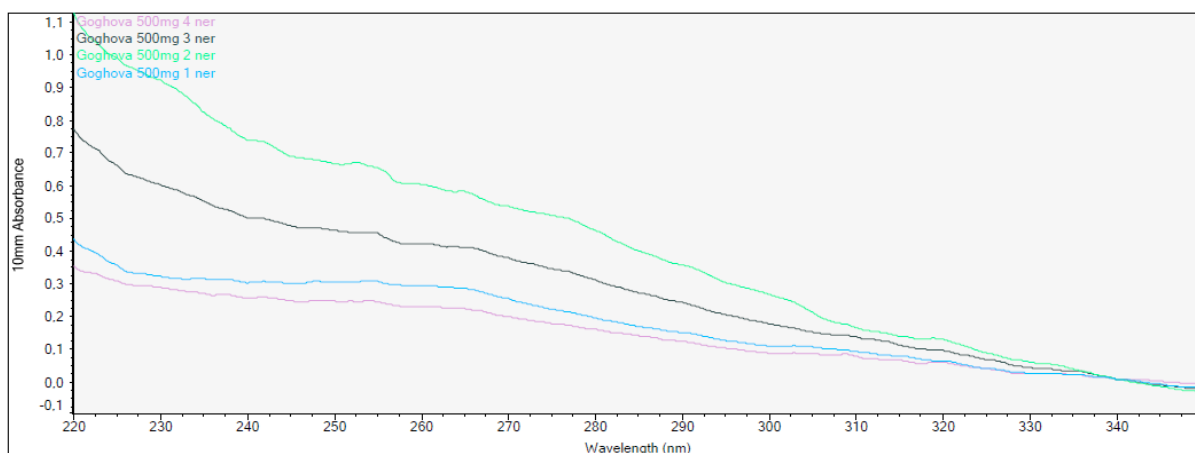
Lusk Žitavské papriky/ opakování	Navážka [mg]	Koncentrace DNA [$\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$]	$A_{260\text{nm}}$	$A_{280\text{nm}}$	$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$	$A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$	Množství DNA [ng]
1	150	7,1	0,142	0,102	1,39	0,52	355
2		8,1	0,163	0,114	1,42	0,95	405
3		12,4	0,248	0,171	1,45	1,07	620
4		23,2	0,463	0,332	1,40	0,97	1160
1	300	27,5	0,550	0,391	1,40	0,74	1375
2		38,5	0,771	0,575	1,34	0,51	1925
3		37,0	0,741	0,552	1,34	0,48	1850
4		35,0	0,699	0,520	1,35	0,53	1750
1	500	14,3	0,287	0,188	1,53	0,91	715
2		29,9	0,598	0,457	1,31	0,65	1495
3		20,8	0,416	0,305	1,37	0,70	1040
4		11,9	0,238	0,157	1,51	0,73	595
1	700	23,1	0,463	0,340	1,36	0,68	1155
2		10,7	0,215	0,145	1,48	0,97	535
3		6,3	0,125	0,076	1,65	1,90	315
4		16,0	0,319	0,220	1,45	1,40	800



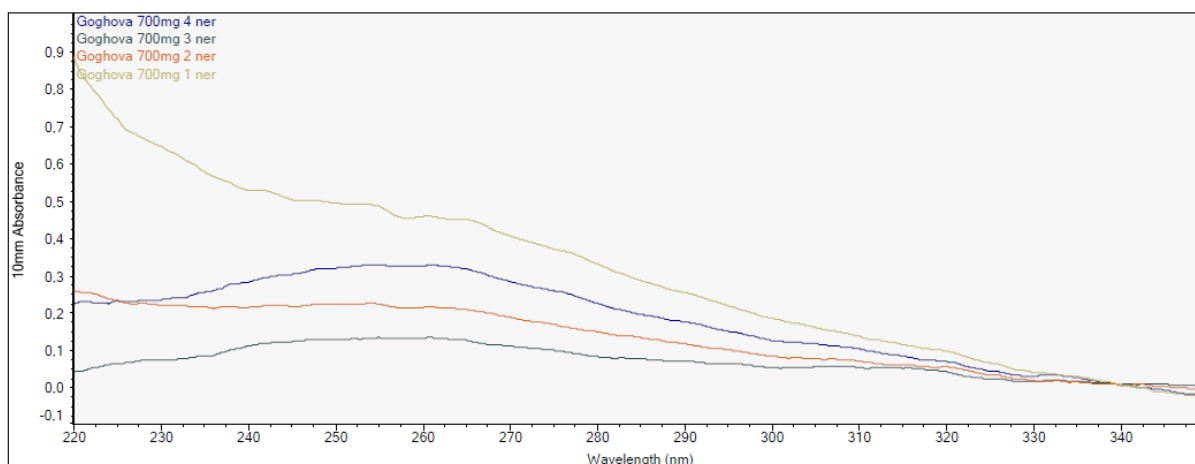
Graf 1: Absorpční spektrum DNA izolované z 150mg Žitavské papriky (lusk) magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β -merkapt ethanolu ve 4 opakováních



Graf 2: Absorpční spektrum DNA izolované z 300mg Žitavské papriky (lusk) magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β -merkapt ethanolem ve 4 opakováních



Graf 3: Spektrum DNA izolované z 500 mg Žitavské papriky (lusk) magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β -merkapt ethanolem ve 4 opakováních



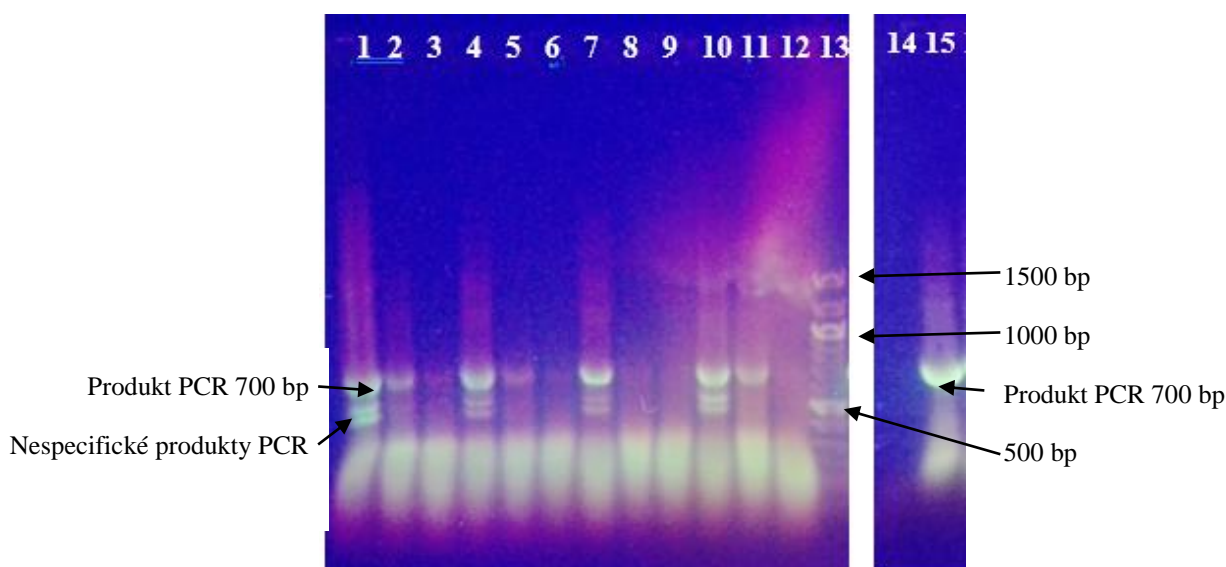
Graf 4: Absorpční spektrum DNA izolované z 700 mg Žitavské papriky (lusk) magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β -merkapt ethanolem ve 4 opakováních

DNA byla izolována v různých koncentracích. Největší množství DNA ($27,5 - 38,5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) bylo izolováno z navážky 300 mg. DNA byla znečištěna, poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 1,34 - 1,40$; poměr $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}} = 0,48 - 0,74$.

5.1.1 Ověření amplifikovatelnosti DNA v PCR

DNA izolovaná z jednotlivých navážek byla amplifikovaná dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.4 - Tabulka 2. Byly použity primery F_18S, R_5.8S a Taq 1.1 DNA polymeráza. Amplikony byly separovány pomocí gelové elektroforézy spolu se standardem 100 bp žebříček dle postupu uvedeného v kapitole 4.6.5. Detekce produktů PCR gelovou elektroforézou na agaróze je uvedena na Obrázcích 10 – 13.

Obrázek 10: Gelová elektroforéza produktů PCR 700 bp – amplifikována byla DNA izolovaná z 150 mg lusků Žitavské papriky magnetickými částicemi PGMAox z homogenátu s CTAB s β -merkaptoethanolem ve 4 opakováních



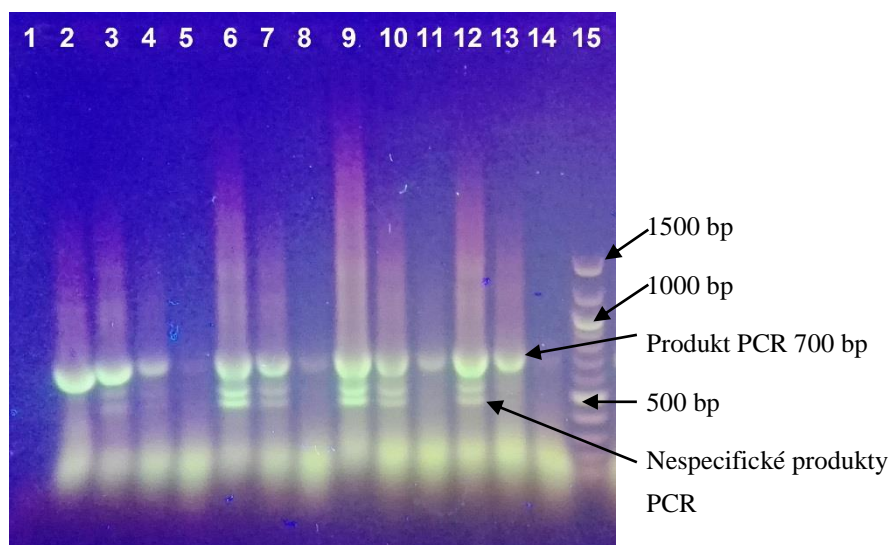
Běh	Opakování	DNA	Ředění DNA	Množství DNA ve směsi pro PCR [ng]	Detekce produktu PCR
1	1	Žitavská paprika (150 mg)	0	14,2	+++
2			10x		++
3			100x		+
4	2		0	16,2	+++
5			10x		++
6			100x		+
7	3		0	24,8	+++
8			10x		+

Běh	Opakování	DNA	Ředění DNA	Množství DNA ve směsi pro PCR [ng]	Detekce produktu PCR
9	3	Žitavská paprika (150 mg)	100x		-
10	4		0	46,4	+++
11			10x		++
12			100x		-
13		Standard DNA 100 bp žebříček	0		
14		Negativní kontrola	0		-
15		Pozitivní kontrola <i>N. tabacum</i>	0	2	+++

+, ++, +++ detekce produktů PCR o různé intenzitě

- produkt PCR nebyl detegován

Obrázek 11: Gelová elektroforéza produktů PCR (700 bp) –Amplifikována byla DNA izolovaná z 300 mg lusků Žitavské papriky magnetickými částicemi PGMAox z homogenátu s CTAB a β-merkaptoethanolem ve 4 opakováních



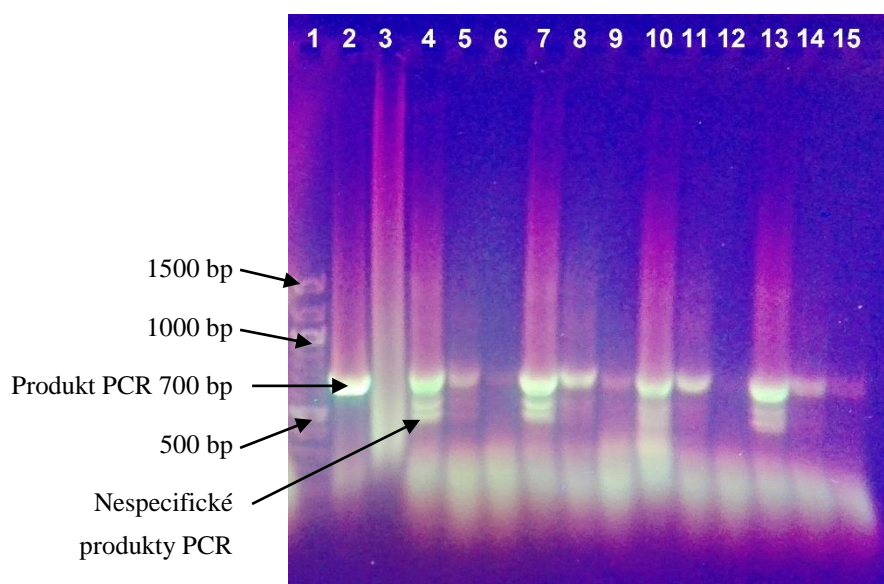
Běh	Opakování	DNA	Ředění DNA	Množství DNA ve směsi npro PCR [ng]	Detekce produktu PCR
1		Negativní kontrola	0		-
2		Pozitivní kontrola <i>N. tabacum</i>	0	2	+++
3	1	Žitavská paprika (300 mg)	0	55	+++
4			10x		++
5			100x		+
6	2		0	77	+++

7		Žitavská paprika (300 mg)	10x		++
8			100x		+
9	3		0	74	+++
10			10x		++
11	100x			+	
12	4		0	70	+++
13			10x		++
14			100x		+
15		Standard DNA 100 bp žebříček	0		

+, ++, +++ detekce produktů PCR o různé intenzitě

- produkty PCR nebyly detegovány

Obrázek 12: Gelová elektroforéza produktů PCR (700 bp) – Amplifikována byla DNA izolovaná z 500 mg lusků Žitavské papriky magnetickými částicemi PGMAox z homogenátus CTAB a β -merkaptoethanolem ve 4 opakováních



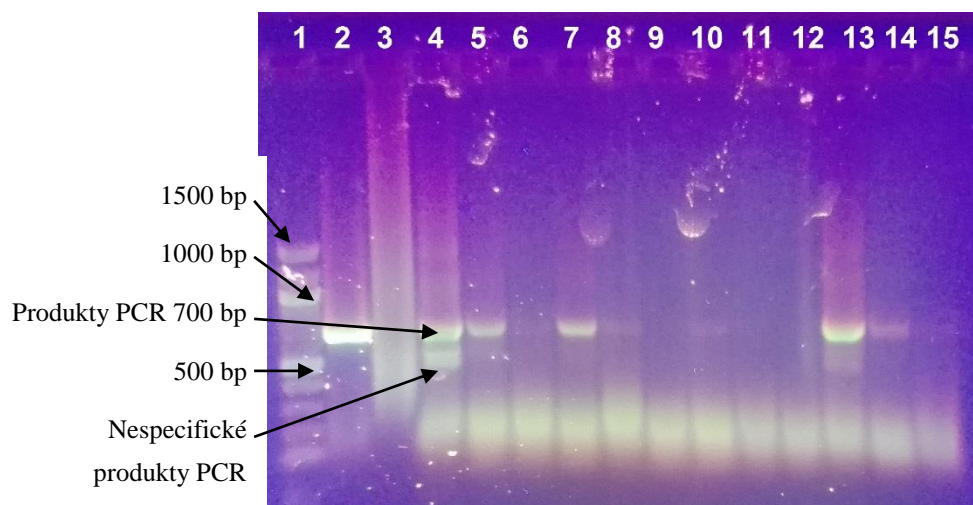
Běh	Opakování	DNA	Ředění DNA	Množství DNA ve směsi pro PCR [ng]	Detekce produktu PCR
1		Standard DNA 100 bp žebříček	0		
2		Pozitivní kontrola <i>N. tabacum</i>	0	2	+++
3		Negativní kontrola	0		-
4	1	Žitavská paprika (500 mg)	0	28,6	+++
5			10x		++

6		Žitavská paprika (500 mg)	100x		+
7	2		0	59,8	+++
8			10x		++
9			100x		+
10	3		0	41,6	+++
11			10x		++
12			100x		-
13	4		0	23,8	+++
14			10x		++
15			100x		+

+, ++, +++ detekce produktů PCR o různé intenzitě

- produkty PCR nebyly detegovány

Obrázek 13: Gelová elektroforéza produktů PCR (700 bp) – Amplifikována byla DNA izolovaná z 700 mg lusků Žitavské papriky magnetickými částicemi PGMAox z roztoku s CTAB a β -merkapt ethanolom ve 4 opakováních



Běh	Opakování	DNA	Ředění DNA	Množství DNA ve směsi pro PCR [ng]	Detekce produktu PCR
1		Standard DNA 100 bp žebříček	0		
2		Pozitivní kontrola <i>N. tabacum</i>	0	2,0	+++
3		Negativní kontrola	0		-
4	1	Žitavská paprika (700 mg)	0	45,4	+++
5			10x		+
6			100x		-
7	2		0	21,4	++
8			10x		+
9			100x		-
10	3		0	12,6	+
11			10x		-
12			100x		-
13	4		0	32,0	+++
14			10x		+
15			100x		-

+, ++, +++ detekce produktů PCR o různé intenzitě

- : produkty PCR nebyly detegovány

Produkty PCR byly detegovány v různé intenzitě v závislosti na množství DNA ve směsi pro PCR. Vedle specifických produktů PCR byly detegovány i nespecifické produkty PCR.

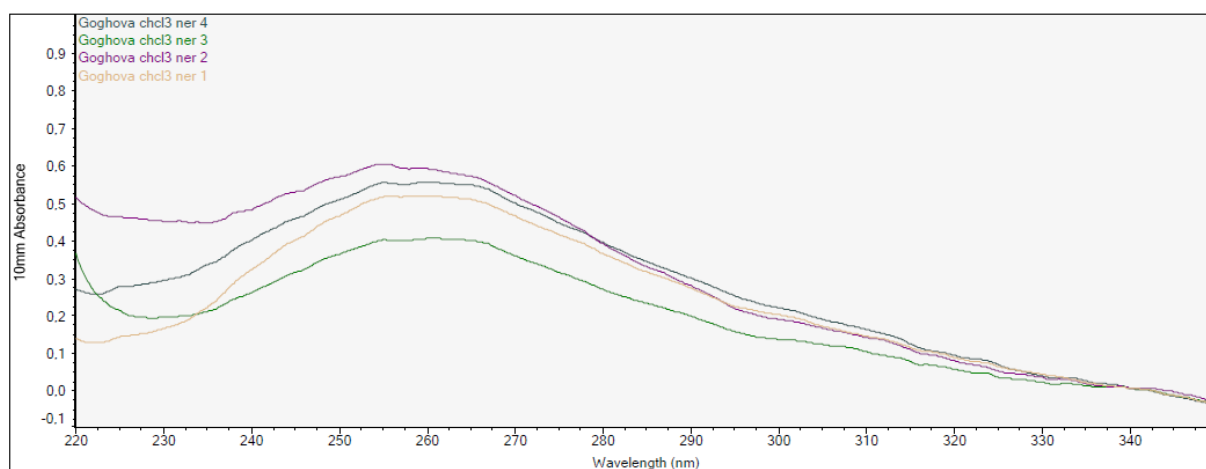
5.2 Izolace a purifikace DNA z čerstvého lusku Žitavské papriky

DNA izolovaná z homogenátu sCTAB, s β -merkapt ethanol, magnetickými částicemi dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.1 nebyla dostatečně čistá. Proto byl postup modifikován: lusk papriky (300 mg) byl homogenizován nejprve v 500 μ L CTAB pufru s 1 μ L β -merkapt ethanolu. Přibližná doba homogenizace byla cca 6 min, hodnota pH homogenátu byla pH=6,5 – 6,0. Homogenát byl inkubován 30 min při 60 °C. Po inkubaci bylo přidáno 500 μ L extrakční směsi chloroform:oktanol (24:1) dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.1.1 a byl odebrán supernatant pro izolaci DNA magnetickými částicemi. Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA měřeno dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.3 (Tabulka 7). Závislost absorbance DNA na vlnové délce je uvedena v Grafu 5. Poté byly namíchány

směsi pro PCR dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.4. Byly použity priméry F_18S, R_5.8S a Taq 1.1 DNA polymerasa. Amplikony byly separovány pomocí gelové elektroforézy a byly porovnány standardem DNA (100 bp žebříček) dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.5. Detekce produktů PCR gelovou elektroforézou na agarose je uvedeno na Obrázku 14.

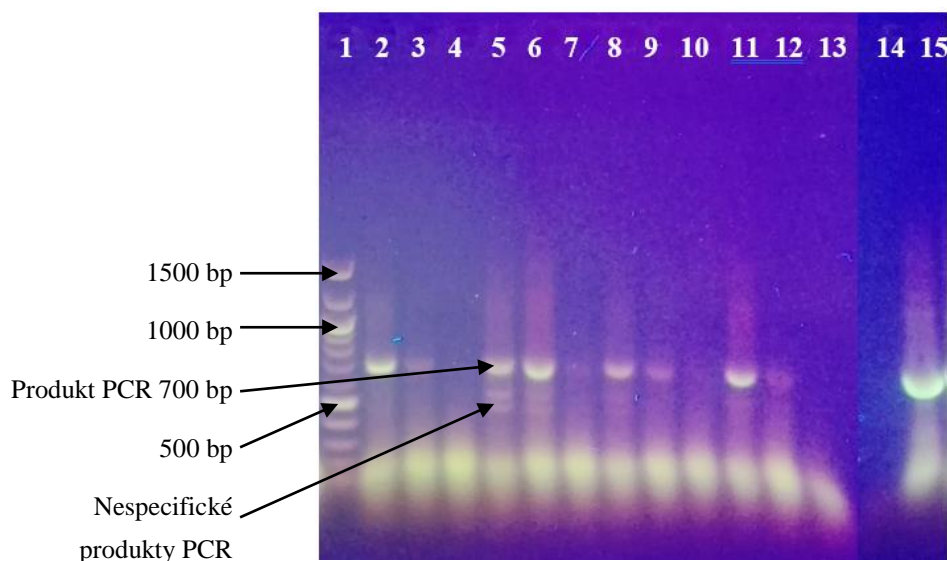
Tabulka 7: Koncentrace a hodnoty absorbancí DNA izolované z 300 mg lusků Žitavské papriky magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β -merkapt ethanolu a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) ve 4 opakováních

Lusk Žitavské papriky/ opakování	Navážka [mg]	Koncentrace DNA [ng μL^{-1}]	$A_{260\text{nm}}$	$A_{280\text{nm}}$	$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$	$A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$	Množství DNA [ng]
1	300	25,7	0,514	0,359	1,43	3,26	1285
2		29,3	0,586	0,386	1,52	1,31	1465
3		19,9	0,399	0,264	1,51	2,11	995
4		27,5	0,550	0,389	1,41	1,92	1375



Graf 5: Absorpční spektrum DNA izolované z 300 mg lusků Žitavské papriky (lusk) magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β -merkapt ethanolu a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) ve 4 opakováních

Obrázek 14: Gelová elektroforéza produktů PCR (700 bp) – Amplifikována byla DNA izolovaná z lusků Žitavské papriky (300 mg) magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β-metkaptoethanolem a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) ve 4 opakováních



Běh	Opakování	DNA	Ředění DNA	Množství DNA ve směsi pro PCR [ng]	Detekce produktu PCR
1		Standard DNA 100 bp žebříček	0		
2	1	Žitavská paprika (300 mg)	0	51,4	++
3			10x		+
4			100x		-
5	2		0	58,6	++
6			10x		++
7			100x		-
8	3		0	39,8	++
9			10x		+
10			100x		-
11	4		0	55	++
12			10x		+
13			100x		-
14			Negativní kontrola	0	
15		Pozitivní kontrola <i>N. tabacum</i>	0	2	+++

+, ++, +++ detekce produktů PCR o různé intenzitě

- produkty PCR nebyly detegovány

DNA byla izolována v koncentracích 19,9 až 29,3 ng μL^{-1} . DNA byla znečištěna, poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 1,41 - 1,52$; poměr $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}} = 1,31 - 3,26$.

Produkty PCR byly detegovány v různé intenzitě v závislosti na množství DNA ve směsi pro PCR. Vedle specifických produktů PCR byly detegovány i nespecifické produkty PCR.

5.3 Izolace DNA z mletých sušených výrobků

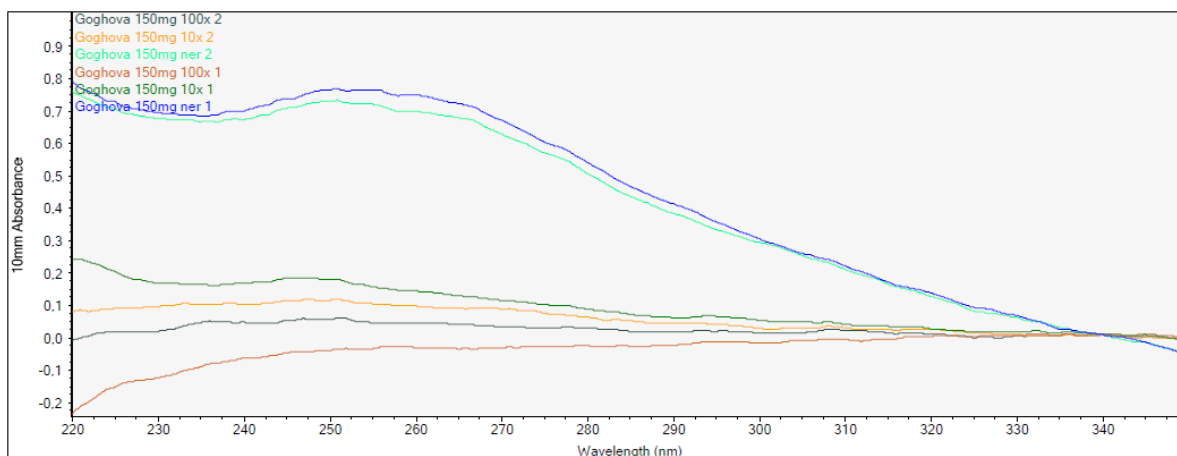
Vzhledem k většímu objemu vzorků 150 mg mletých výrobků (Obrázek 1) byly sušené mleté výrobky homogenizovány v 2 mL Eppendorfových zkumavkách pomocí 700 μL roztoku s CTAB s 1 μL β -merkptoethanolem. Po inkubaci bylo k homogenátu přidáno 700 μL směsi chloroform:oktanol (24:1) a po centrifugaci byl odebrán supernatant pro izolaci DNA pomocí magnetických částic dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.4. Přečištěná DNA byla rozpuštěna v 50 μL TE pufru, a byla ředěna 10x a 100x. Spektrofotometrické stanovení koncentrací a čistoty DNA bylo provedeno dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.3 a PCR dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.4. Amplikony byly separovány pomocí gelové elektroforézy a porovnány standardem DNA (100 bp žebříček) dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.5.

5.3.1 Izolace DNA z mleté Žitavské papriky

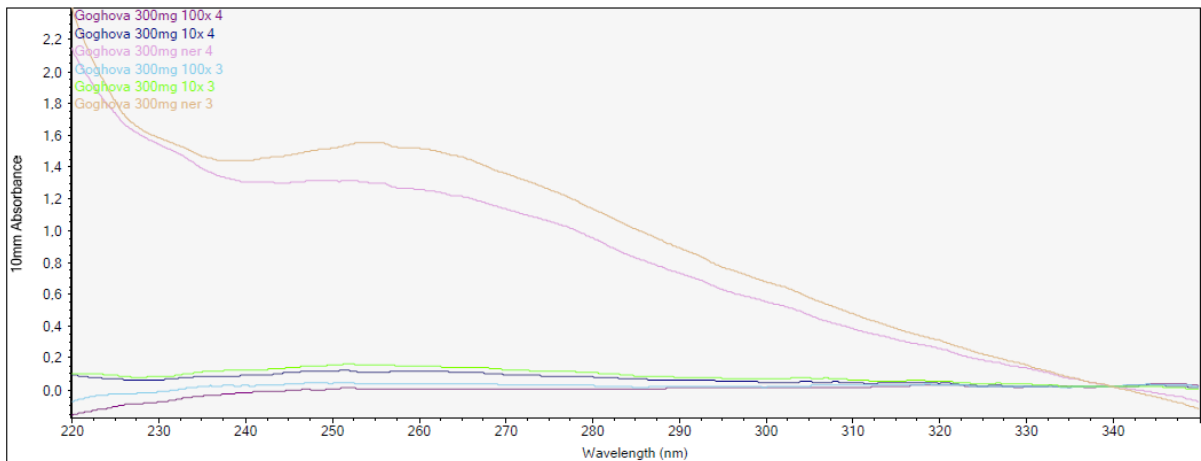
Vzorky mleté papriky byly homogenizovány nejprve pomocí roztoku s CTAB; k 150 mg výrobku bylo přidáno 700 μL a k 300 mg 1000 μL roztoku. Protože vzorky byly příliš husté bylo přidáno více roztoku s CTAB: k 150 mg výrobku 300 μL a k 300 mg 600 μL . Homogenát byl inkubován 30 min při 60 °C. Po inkubaci bylo k 150 mg homogenátupapriky přidáno 1000 μL a k 300 mg 400 μL extrakční směsi chloroform:oktanol (24:1). Homogenáty byly opatrně extrahovány 5 min při laboratorní teplotě. Další postupy izolace a detekce DNA byly provedeny dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.3. Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA je uvedeno v Tabulce 8. Graf závislosti absorpance DNA na vlnové délce je uveden v Grafu 6, 7. Byly namíchaný směsi pro PCR dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.4. a k amplifikaci DNA byly použity primery F_18S a R_5.8S. Detekce produktů PCR pomocí gelové elektroforézy na agarose dle 4.6.5 je uvedena na Obrázku 15.

Tabulka 8: Koncentrace a hodnoty absorbancí DNA izolované z 150 a 300 mg mleté Žitavské papriky magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB (1000 a 1600 μL) a β -merkptoethanolu (1 μL) a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) (1000 a 400 μL) ve 2 opakováních

Mletá Žitavská paprika / opakování	Navážka [mg]	Koncentrace DNA [$\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$]	$A_{260\text{nm}}$	$A_{280\text{nm}}$	$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$	$A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$	Množství DNA [ng]
1	150	37,1	0,741	0,535	1,38	1,08	1855
2		34,6	0,692	0,500	1,38	1,03	1730
1	300	75,1	1,502	1,124	1,34	0,95	3755
2		62,2	1,245	0,939	1,33	0,81	3110

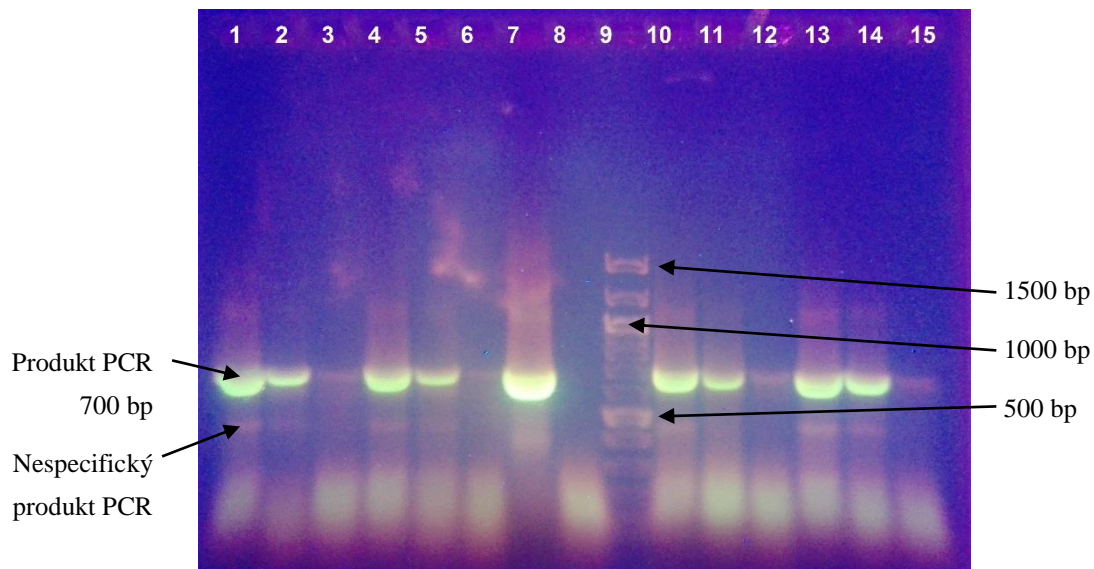


Graf 6: Absorpční spektrum DNA izolované z 150 mg mleté Žitavské papriky magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB s β -merkptoethanolem a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) ve 2 opakováních



Graf 7: Absorpční spektrum DNA izolované z 300 mg mleté Žitavské papriky magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB s β -merkapt ethanolem a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) ve 2 opakováních

Obrázek 15: Gelová elektroforéza produktů PCR (700 bp)– Amplifikována byla DNA izolovaná z mleté Žitavské papriky (150 a 300 mg) magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β -merkapt ethanolem as přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) ve 2 opakováních



Běh	Opakování	DNA	Ředění DNA	Množství DNA ve směsi pro PCR [ng]	Detekce produktu PCR
1	1	Žitavská paprika (150 mg)	0	74,2	+++
2			10x		++
3			100x		+
4	2		0	69,2	+++
5			10x		++

Běh	Opakování	DNA	Ředění DNA	Množství DNA ve směsi pro PCR [ng]	Detekce produktu PCR
6	2	Žitavská paprika (150 mg)	100x		+
7		Pozitivní kontrola <i>N. tabacum</i>	0	2	+++
8		Negativní kontrola	0	-	-
9		Standard DNA 100bp žebříček	0		
10	1	Žitavská paprika (300 mg)	0	150,2	+++
11			10x		++
12			100x		+
13	2		0	124,4	+++
14			10x		++
15			100x		+

+, ++, +++ detekce produktů PCR o různé intenzitě

- produkty PCR nebyly detegovány

DNA byla izolována v koncentracích 34,6 až 75,1 ng μL^{-1} . DNA byla znečištěna, poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 1,33 - 1,38$; poměr $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}} = 0,81 - 1,08$.

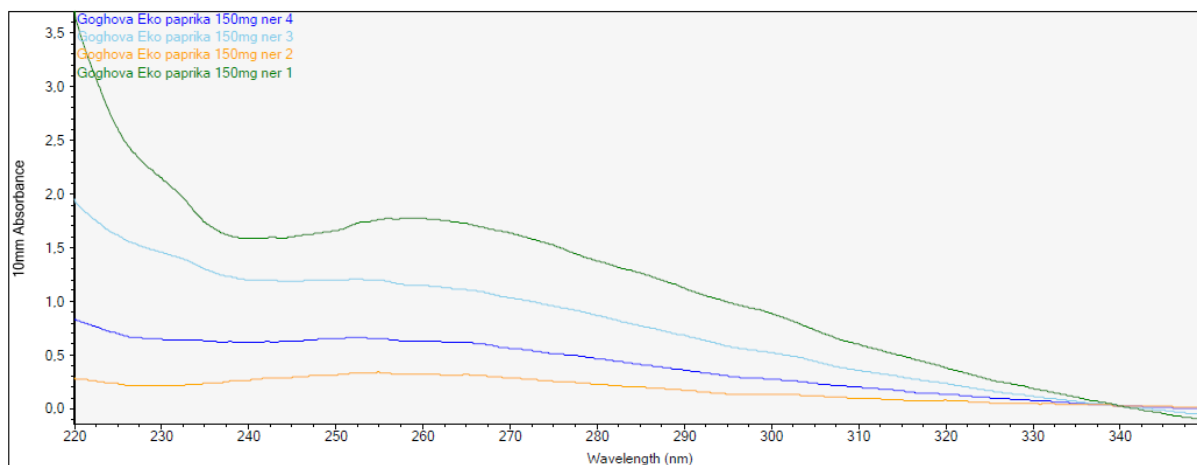
Produkty PCR byly detegovány v různé intenzitě v závislosti na množství DNA ve směsi pro PCR. Vedle specifických produktů PCR byly detegovány i nespecifické produkty PCR.

5.3.2 Izolace DNA z mleté Eko papriky sladké

Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA je uvedeno v Tabulce 9. Graf závislosti absorbance DNA na vlnové délce je uveden v Grafu 8. Byly namíchaný směsi pro PCR dle postupu uveden v kapitole 4.6.4. K amplifikaci DNA byly použity primery F_18S a R_5.8S. Detekce produktů PCR gelovou elektroforézou na agarose je uvedena na Obrázku 16.

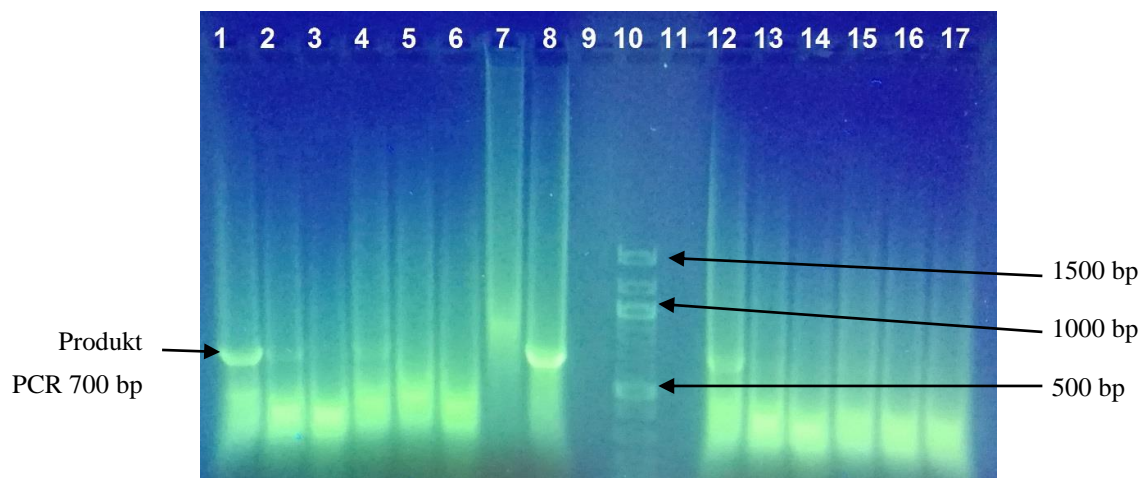
Tabulka 9: Koncentrace a hodnoty absorbancí DNA izolované z 150 mg vzorku Eko papriky sladké domácí magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β -merkptoethanolem a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) ve 4 opakováních

Eko paprika sladká/ opakování	Navážka [mg]	Koncentrace DNA [$\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$]	$A_{260\text{nm}}$	$A_{280\text{nm}}$	$A_{260\text{nm}}/$ $A_{280\text{nm}}$	$A_{260\text{nm}}/$ $A_{230\text{nm}}$	Množství DNA [ng]
1	150	87,4	1,749	1,355	1,29	0,82	4370
2		14,6	0,292	0,200	1,46	1,59	730
3		56,1	1,122	0,845	1,33	0,78	2805
4		30,0	0,601	0,439	1,37	0,97	1500



Graf 8: Absorpční spektrum DNA izolované z 150 mg mleté Eko papriky sladké magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB s merkptoethanolem a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) ve 4 opakováních

Obrázek 16: Gelová elektroforéza produktů PCR (700 bp) – amplifikována byla DNA izolovaná z 150 mg mleté Eko papriky sladké magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β -merkaptoethanolem a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) ve 4 opakováních



Běh	Opakování	DNA	Ředění DNA	Množství DNA ve směsi pro PCR [ng]	Detekce produktu PCR
1	1	Eko paprika sladká (150 mg)	0	174,8	+++
2			10x		+
3			100x		-
4	2	Eko paprika sladká (150 mg)	0	29,2	+
5			10x		-
6			100x		-
7		Negativní kontrola	0		-
8		Pozitivní kontrola <i>N. tabacum</i>	0	2	+++
9		Prázdný běh			
10		Standard DNA 100 bp žebříček			
11		Prázdný běh			
12	3	Eko paprika sladká (150 mg)	0	112,2	++
13			10x		+
14			100x		-
15	4	Eko paprika sladká (150 mg)	0	13	-
16			10x		-
17			100x		-

+, ++, +++ detekce produktů PCR o různé intenzitě

- produkty PCR nebyly detegovány

DNA byla izolována v koncentracích 14,6 - 87,4 ng μL^{-1} . DNA byla znečištěna, poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 1,29 - 1,46$; poměr $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}} = 0,78 - 1,59$.

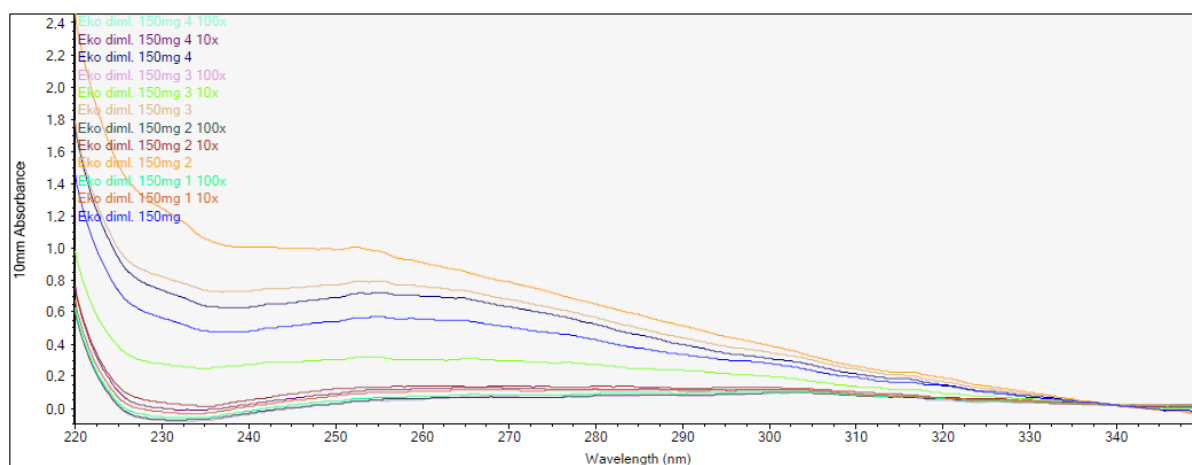
Produkty PCR byly detegovány v různé intenzitě v závislosti na množství DNA ve směsi pro PCR.

5.3.3 Izolace DNA z mleté Eko papriky dimljena

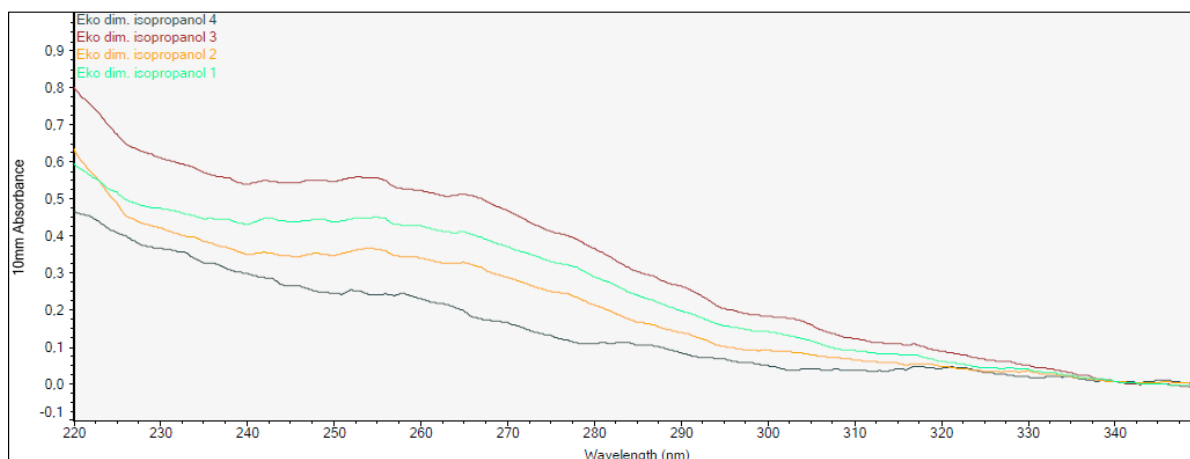
Vzorky 150 mg mletých výrobků byly homogenizovány pomocí 700 μL CTAB. K homogenátu byl přidán 1 μL β -merkapt ethanolu. dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.1 a 4.6.1.1 s přídatkem 700 μL směsi chloroform:oktanol (24:1). Poté byl odebrán 150 μL supernatantu ze čtyř vzorků a přidán 0,6 \times objemu isopropanolu (90 μL) a přesrážen dle postupu uveden v kapitole 4.6.1.2. Po rozpuštění sedimentu v 150 μL TE pufru byla DNA separována pomocí magnetických částic dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.2. Z dalších čtyř vzorků byla izolována DNA dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.1, 4.6.1.1 a 4.6.2. Přečištěná DNA byla rozpuštěna v 50 μL TE pufru a byla 10x zředěna. Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA bylo provedeno dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.3. Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA je uvedeno v Tabulce 10. Závislost absorbance DNA na vlnové délce je uvedena v Grafu 9a, 9b. DNA byla amplifikována dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.4 s použitím primerů F_26S a R_26S a teplotním programem dle Tabulky 3. Amplikony byly separovány pomocí gelové elektroforézy a jejich velikost porovnána se standardem DNA (100 bp žebříček) dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.5. Detekce produktů PCR gelovou elektroforézou na agarose je uvedeno na Obrázku 17.

Tabulka 10: Koncentrace a hodnoty absorbancí DNA izolované z 150 mg Eko papriky dimljeny magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β -merkapt ethanolom a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) případně přidavkem isopropanolu ve 4 opakováních

Eko paprika dimljena/ opakování	Navážka [mg]	Množství DNA [ng μL^{-1}]	$A_{260\text{nm}}$	$A_{280\text{nm}}$	$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$	$A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$	Množství DNA [ng]
1	150	27,0	0,539	0,410	1,31	0,98	1350
2		44,6	0,892	0,635	1,40	0,72	2230
3		37,2	0,744	0,551	1,35	0,92	1860
4		34,2	0,683	0,508	1,34	0,95	1710
5	isopropanol	21,0	0,420	0,283	1,48	0,90	1050
6		16,7	0,334	0,206	1,63	0,81	835
7		25,8	0,516	0,358	1,44	0,85	1290
8		11,1	0,223	0,102	2,19	0,62	555

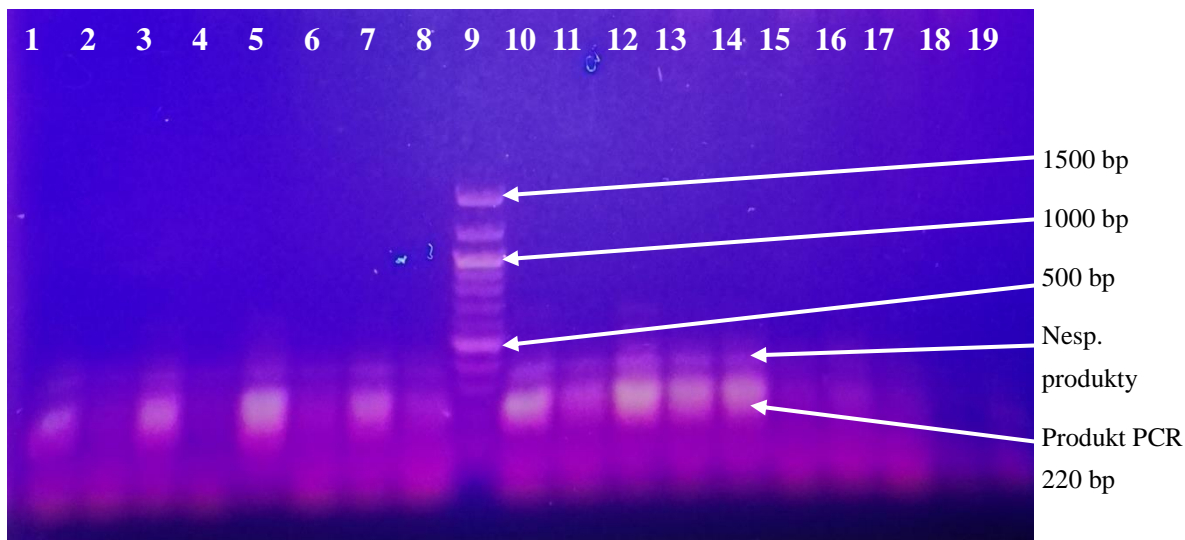


Graf 9a: Absorpční spektrum DNA izolované z 150 mg mleté Eko papriky dimljeny magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β -merkapt ethanolom a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) ve 4 opakováních



Graf 9b: Absorpční spektrum DNA izolované z 150 mg mleté Eko papriky dimlženy magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β -merkapt ethanolom a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) a isopropanolu ve 4 opakováních

Obrázek 17: Gelová elektroforéza produktů PCR (220 bp) – Amplifikována byla DNA izolovaná z 150 mg mleté Eko papriky dimlženy magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β -merkapt ethanolom a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) bez nebo srážením isopropanolem ve 4 opakováních



Běh	Opakování	DNA	Způsob izolace	Ředění DNA	Množství DNA ve směsi pro PCR [ng]	Detekce produktu PCR
1	1	Eko paprika dimlžena (150 mg)	CH-O + magnetické částice	0	54,0	++
2				10x		+
3	2			0	89,2	+++
4				10x		+

Běh	Opakování	DNA	Způsob izolace	Ředění DNA	Množství DNA ve směsi pro PCR [ng]	Detekce produktu PCR		
5	3			0	74,4	+++		
6				10x		+		
7	4			0	68,4	+++		
8				10x		+		
9				Standard DNA 100 bp žebříček				
10	1			Eko paprika dimljena (150 mg)	CH-O + isopropanol + magnetické částice	0	42,0	+++
11						10x		++
12	2					0	33,4	+++
13		10x				++		
14	3	0	51,6			+++		
15		10x				+		
16	4	0	22,2			+		
17		10x				+		
18		Negativní kontrola.		0		-		
19		Pozitivní kontrola <i>Brassica oleracea</i>		0	2	+		

+, ++, +++ detekce produktů PCR o různé intenzitě

- produkty PCR nebyly detegovány

DNA izolována bez přesrážení isopropanolem byla izolována v koncentracích 27,0 – 44,6 ng μL^{-1} . DNA byla znečištěna, poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 1,31 - 1,40$; poměr $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}} = 0,72 - 0,98$. DNA izolována přesrážením isopropanolem byla izolována v koncentracích 11,1 – 25,8 ng μL^{-1} . DNA byla znečištěna, poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 1,44 - 2,19$; poměr $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}} = 0,62 - 0,90$.

Izolovaná DNA byla částečně degradována, protože se neamplifikovala pomocí primerů F_18S a R_5.8S - proto byla amplifikována pomocí primerů F_26S a R_26S.

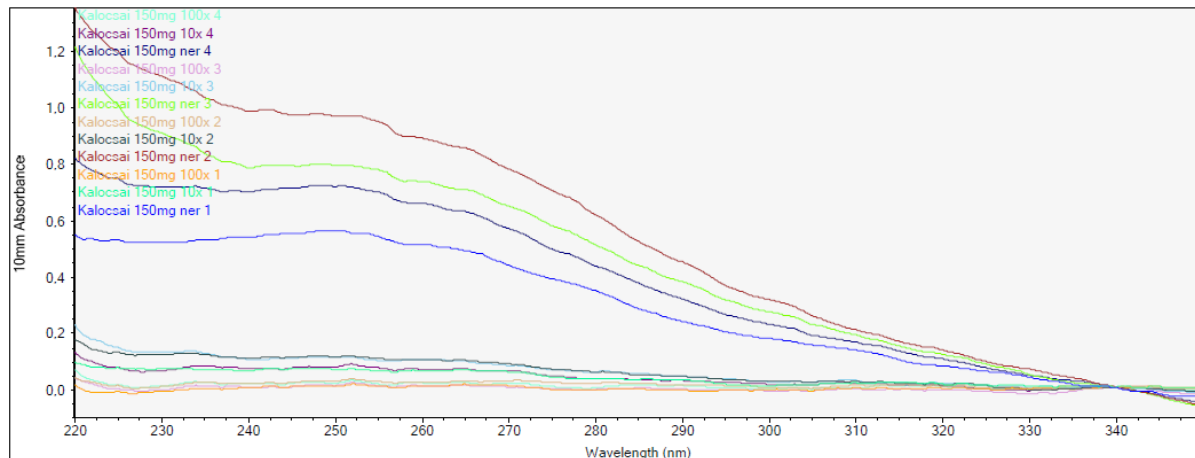
Produkty PCR (220 bp) byly detegovány v různé intenzitě v závislosti na množství DNA ve směsi pro PCR.

5.3.4 Izolace DNA z mleté Kalocsa környéki őrólt papriky

Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA je uvedeno v Tabulce 11. Závislost absorbance DNA na vlnové délce je uvedena v Grafu 9. Směsi pro PCR byly připraveny dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.4. K amplifikaci DNA byly použity primery F_18S a F_5.8S. Detekce produktů PCR gelovou elektroforézou na agarose je uvedena na Obrázku 18.

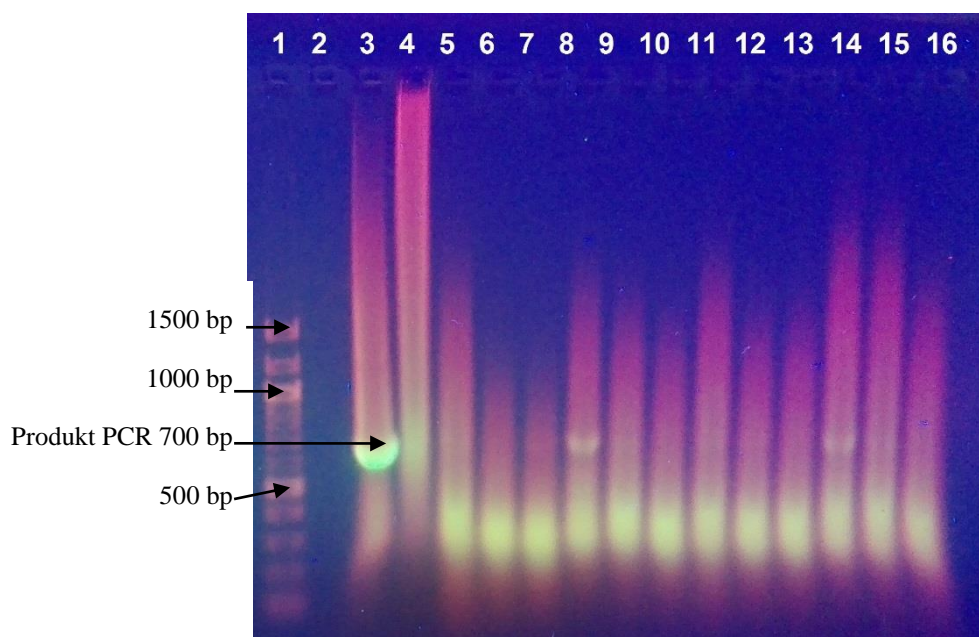
Tabulka 11: Koncentrace a hodnoty absorbancí DNA izolované z 150 mg vzorku Kalocsa környéki őrólt papriky magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β -merkapt ethanolom a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) ve 4 opakováních

Kalocsa környéki őrólt paprika/ opakování	Navážka [mg]	Koncentrace DNA [ng μL^{-1}]	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{260nm} / A _{280nm}	A _{260nm} / A _{230nm}	Množství DNA [ng]
1	150	25,3	0,505	0,342	1,48	0,98	1265
2		44,2	0,885	0,613	1,44	0,80	2210
3		36,5	0,730	0,505	1,44	0,81	1825
4		32,7	0,653	0,430	1,52	0,92	1635



Graf 10: Spektrum DNA izolované z 150 mg mleté Kalocsa környéki őrólt papriky magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β -merkapt ethanolom a přidavkem směsi chloroform:oktanol ve 4 opakováních

Obrázek 18: Gelová elektroforéza produktů PCR (700 bp) – Amplifikována byla DNA izolovaná z 150 mg mleté Kalocsa környéki örölt papriky magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β -metkптоethanolem a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) ve 4 opakováních



Běh	Opakování	DNA	Ředění DNA	Množství DNA ve směsi pro PCR [ng]	Detekce produktu PCR
1		Standard DNA 100 bp žebříček	0		
2		Prázdný běh	-	-	
3		Pozitivní kontrola <i>N. tabacum</i>	0	2	+++
4		Negativní kontrola	0	0	-
5	1	Kalocsa környéki örölt paprika (150mg)	0	50,6	-
6			10x		-
7			100x		+
8	2		0	88,4	++
9			10x		+
10			100x		-
11	3		0	73	+
12			10x		-
13			100x		-
14	4		0	65,4	++

Běh	Opakování	DNA	Ředění DNA	Množství DNA ve směsi pro PCR [ng]	Detekce produktu PCR
15	4	Kalocsa környéki örölt paprika (150mg)	10x		-
16			100x		-

+, ++, +++ detekce produktů PCR o různé intenzitě

- produkty PCR nebyly detegovány

DNA byla izolována v koncentracích 25,3 - 44,2 ng μL^{-1} . DNA byla znečištěna, poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 1,44 - 1,52$; poměr $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}} = 0,80 - 0,98$.

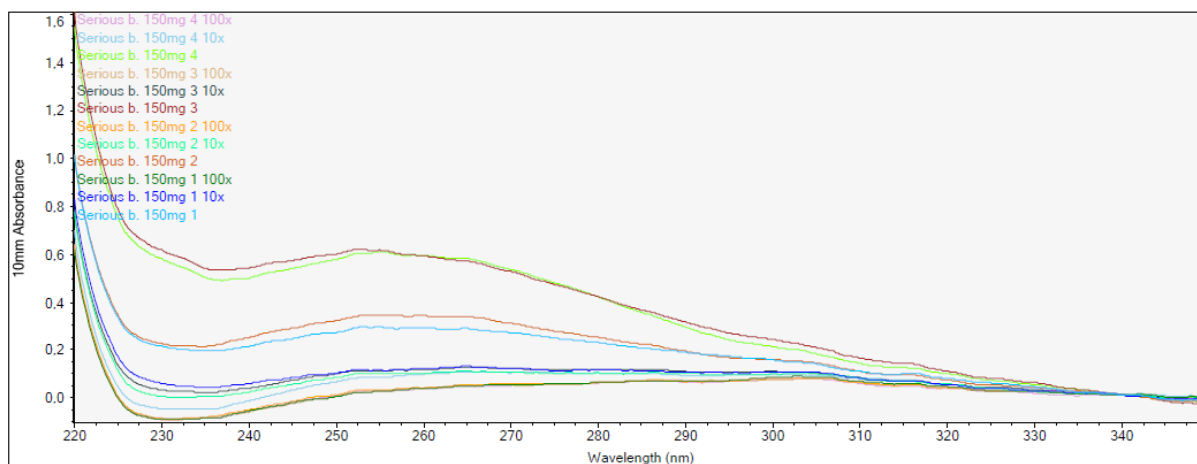
DNA se amplifikovala v PCR. Produkty PCR byly detegovány v různé intenzitě v závislosti na množství DNA v PCR směsi.

5.3.5 Izolace DNA z koření Serious Blends

Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA je uvedeno v Tabulce 12. Závislost absorbance DNA na vlnové délce je uvedena v Grafu 10. Byly připraveny směsi pro PCR dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.4. K amplifikaci DNA byly použity priméry F_18S a R_5.8S. Detekce produktů PCR gelovou elektroforézou na agarose je uvedena na Obrázku 19.

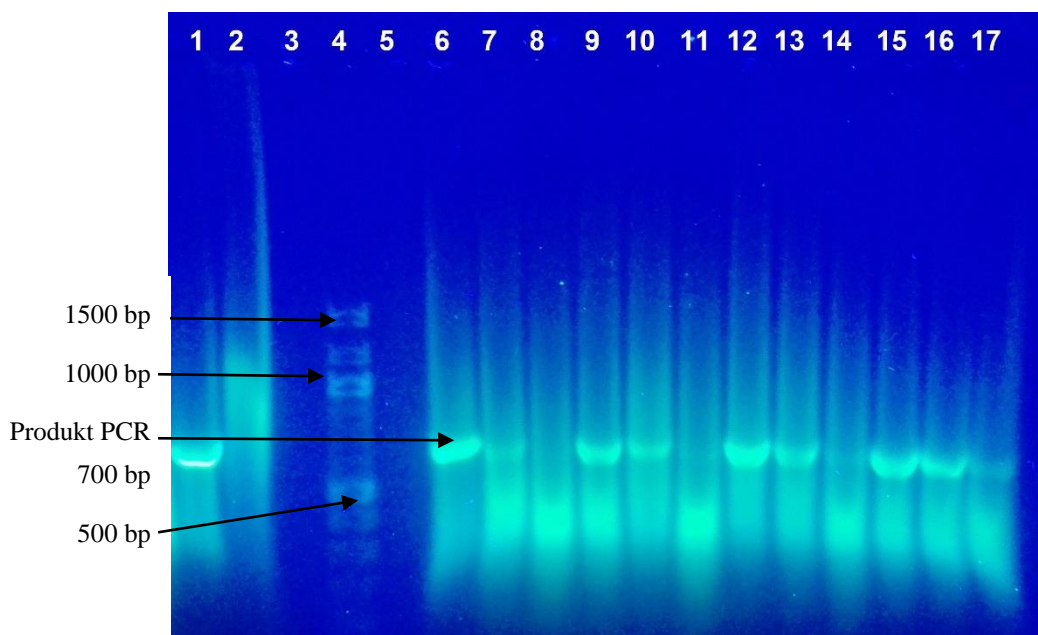
Tabulka 12: Koncentrace a hodnoty absorbancí DNA izolované z 150 mg vzorku Serious Blends magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β -merkptoethanolem a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) ve 4 opakováních

Serious Blends/ opakování	Navážka [mg]	Koncentrace DNA [ng/ μl]	$A_{260\text{nm}}$	$A_{280\text{nm}}$	$A_{260\text{nm}}/$ $A_{280\text{nm}}$	$A_{260\text{nm}}/$ $A_{230\text{nm}}$	Množství DNA [ng]
1	150	14,0	0,280	0,220	1,27	1,38	700
2		16,6	0,331	0,242	1,37	1,54	830
3		29,1	0,582	0,413	1,41	0,96	1455
4		29,1	0,582	0,412	1,41	1,02	1455



Graf 11: Absorpční spektrum DNA izolované z 150 mg Serious Blends magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku CTAB s β -merkapt ethanolem a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1)

Obrázek 19: Gelová elektroforéza produktů PCR (700 bp) – Amplifikována byla DNA izolovaná z 150 mg Serious Blends magnetickými částicemi PGMAox., Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β -merkapt ethanolem a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) ve 4 opakováních



Běh	Opakování	DNA	Ředění DNA	Množství DNA ve směsi pro PCR [ng]	Detekce produktu PCR
1		Pozitivní kontrola <i>N. tabacum</i>	0	2	+++
2		Negativní kontrola	0	0	-
3		Prázdný běh			
4		Standard DNA 100 bp žebříček	0		

Běh	Opakování	DNA	Ředění DNA	Množství DNA ve směsi pro PCR [ng]	Detekce produktu PCR
5		Prázdný běh			
6	1	Serious Blends (150 mg)	0	28,0	+++
7			10x		++
8			100x		+
9	2		0	33,2	+++
10			10x		++
11			100x		+
12	3		0	58,2	+++
13			10x		++
14			100x		+
15	4		0	58,2	+++
16			10x		++
17			100x		+

+, ++, +++: detekce produktů PCR o různé intenzitě

- produkty PCR nebyly detegovány

DNA byla izolována v koncentracích 14,0 - 29,1 ng μL^{-1} . DNA byla znečištěna, poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 1,27 - 1,41$; poměr $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}} = 0,96 - 1,54$.

Produkty PCR byly detegovány v různé intenzitě v závislosti na množství DNA ve směsi pro PCR.

5.4 Izolace DNA z potravin obsahujících papriku

Vzorky 150 nebo 300 mg byly homogenizovány dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.1 a pomocí 600 μL roztoku CTAB a 1 μL β -merkptoethanolu. Homogenát byl inkubován 30 min při 60 °C. Po inkubaci homogenátu bylo přidáno 600 μL směsi chloroform:oktanol (24:1) dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.1.1 a bylo odebráno 400 μL supernantu. Byl přidán 0,6×objemu (240 μL isopropanolu) dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.1.2. DNA byla rozpuštěna v 150 μL TE pufru a byla izolována magnetickými částicemi dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.2. Poté byla přečištěná DNA rozpuštěna v 50 μL TE pufru a byla 10x zředěna. Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA bylo provedeno dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.3. DNA byla amplifikována dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.4 pomocí primerů F_26S a R_26S teplotním programem dle Tabulky 3.

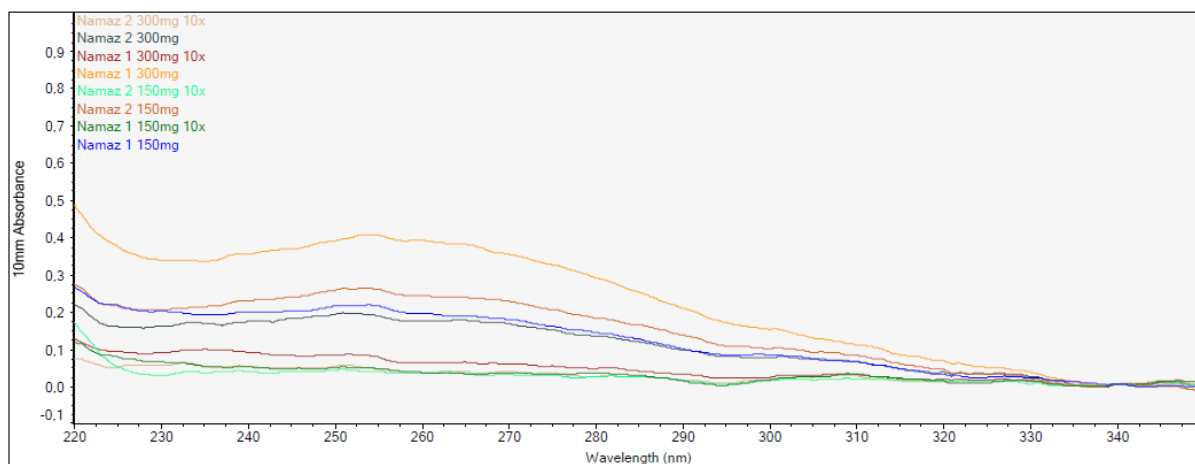
Amplikony byly separovány pomocí gelové elektroforézy a porovnány standardem DNA (100 bp žebříček) dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.5.

5.4.1 Izolace DNA z pomazánky Namaz

Pro izolaci DNA z pomazánky Namaz bylo odebráno 2× 150 a 2× 300 mg výrobku. Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA je uvedeno v Tabulce 13. Závislost absorbance DNA na vlnové délce je uvedena v Grafu 11. Detekce PCR produktů gelovou elektroforézou na agarose je uvedena na Obrázku 20.

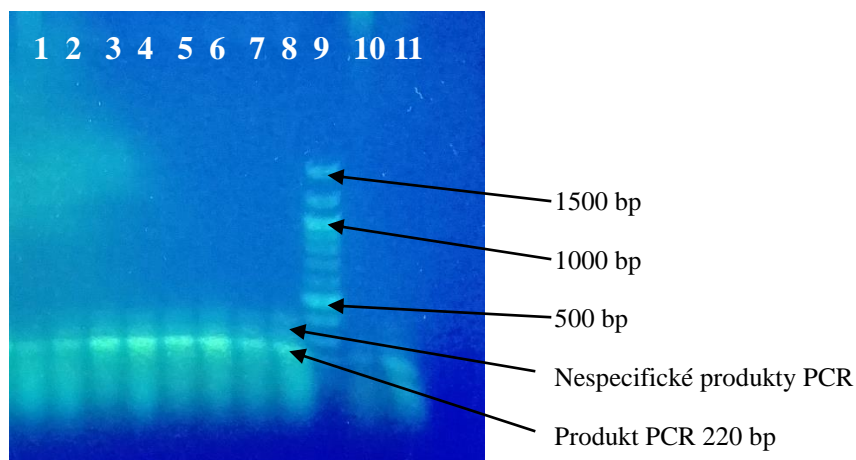
Tabulka 13: Koncentrace a hodnoty absorbancí DNA izolované z 150 a 300 mg pomazánky Namaz magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku CTAB s β-merkapt ethanolom a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) a isopropanolu ve 2 opakováních

Namaz/ opakování	Navážka [mg]	Koncentrace DNA [ng μL ⁻¹]	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{260nm} / A _{280nm}	A _{260nm} / A _{230nm}	Množství DNA [ng]
1	150	9,5	0,190	0,138	1,38	0,97	475
2		11,9	0,238	0,177	1,35	1,19	595
3	300	19,4	0,388	0,286	1,36	1,16	970
4		8,5	0,169	0,128	1,32	1,09	425



Graf 12: Absorpční spektrum DNA izolované z 150 a 300mg pomazánky Namaz magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β-merkapt ethanolom a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) a isopropanolu ve 2 opakováních

Obrázek 20: Gelová elektroforéza produktů PCR (220 bp) – amplifikována byla DNA izolovaná z 150 a 300mg pomazánky Namaz magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β-merkapt ethanol a přidavkem směsí chloroform:oktanol (24:1) a isopropanolu ve 2 opakováních



Běh	Opakování	DNA	Ředění DNA	Množství DNA ve směsi pro PCR [ng]	Detekce produktu PCR
1	1	Namaz (150mg)	0	19	+
2			10x		+
3	2		0	23,8	++
4			10x		++
5	1	Namaz (300mg)	0	38,8	++
6			10x		++
7	2		0	17	++
8			10x		++
9		Standard DNA 100bp žebříček	0		
10		Negativní kontrola	0		+
11		Pozitivní kontrola <i>Brassica oleracea</i>	0	2	++

+, ++, +++ detekce produktů PCR o různé intenzitě

- produkty PCR nebyly detegovány

DNA byla izolována v koncentracích 8,5 – 19,4 ng μL^{-1} . DNA byla znečištěna, poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 1,32 - 1,38$; poměr $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}} = 0,97 - 1,19$.

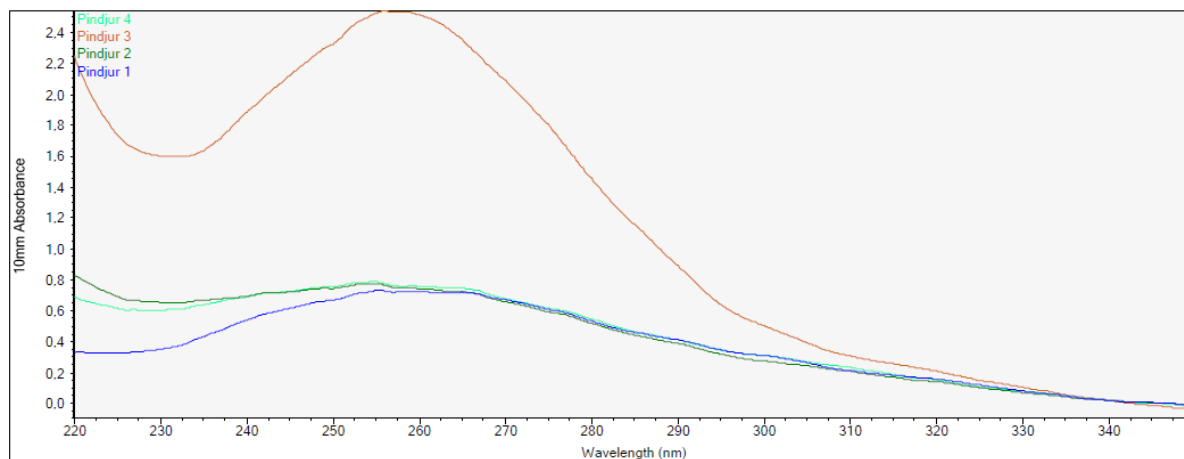
Produkty PCR byly detegovány v různé intenzitě v závislosti na množství DNA ve směsi pro PCR.

5.4.2 Izolace DNA z pomazánky Pindjur

Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA je uvedeno v Tabulce 14. Závislost absorbance DNA na vlnové délce je uvedena v Grafu 12. Vzorek č.3 byl ředěn 10x a 100x a byl amplifikován dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.4 pomocí primerů F_26S a R_26S teplotním programem dle Tabulky 3. Detekce produktů PCR gelovou elektroforézou na agarose je uvedena na Obrázku 21.

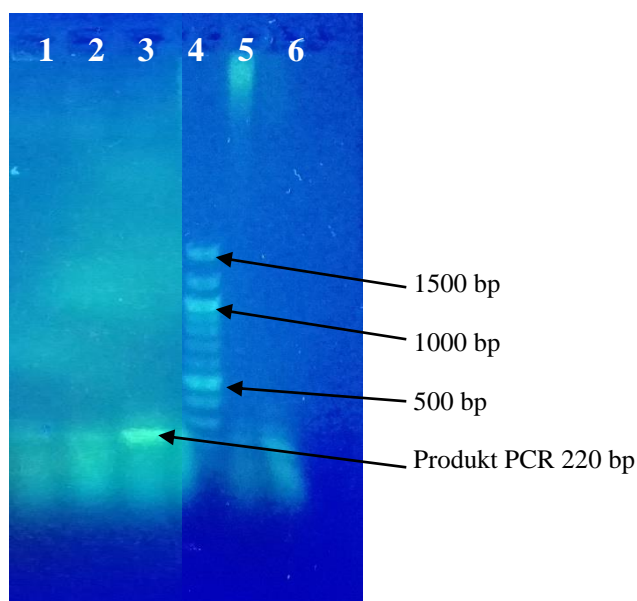
Tabulka 14: Koncentrace a hodnoty absorbancí DNA izolované z 150mg vzorku pomazánky Pindjur magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β -merkptoethanolem a s přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) a isopropanolu ve 4 opakováních

Pindjur/ opakování	Navážka [mg]	Koncentrace DNA [$\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$]	$A_{260\text{nm}}$	$A_{280\text{nm}}$	$A_{260\text{nm}}/$ $A_{280\text{nm}}$	$A_{260\text{nm}}/$ $A_{230\text{nm}}$	Množství DNA [ng]
1	150	35,3	0,706	0,515	1,37	2,14	1765
2		36,3	0,725	0,501	1,45	1,14	1815
3		125,2	2,503	1,444	1,73	1,58	6260
4		37,1	0,742	0,528	1,41	1,27	1855



Graf 13: Absorpční spektrum DNA izolované z 150 mg pomazánky Pindjur magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β -merkptoethanolem a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) a isopropanolu ve 4 opakováních

Obrázek 21: Gelová elektroforéza produktů PCR (220 bp) – amplifikována byla DNA izolovaná z 150 mg pomazánky Pindjur magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β -metkaptoethanolem a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) a isopropanolu v 1 opakování



Běh	DNA	Ředění DNA	Množství DNA ve směsi pro PCR [ng]	Detekce produktu PCR
1	Pindjur	0	250,4	+
2		10x		++
4		100x		+++
4	Standard DNA 100 bp žebříček	0		
5	Negativní kontrola	0	2	
6	Pozitivní kontrola <i>Brassica oleracea</i>	0		++

+, ++, +++ detekce produktů PCR o různé intenzitě

- produkty PCR nebyly detegovány

DNA byla izolována v koncentracích 35,3 – 125,2 ng μL^{-1} . DNA byla znečištěna, poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 1,37 - 1,73$; poměr $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}} = 1,14 - 2,14$.

Produkty PCR byly detegovány v různé intenzitě v závislosti na množství DNA ve směsi pro PCR.

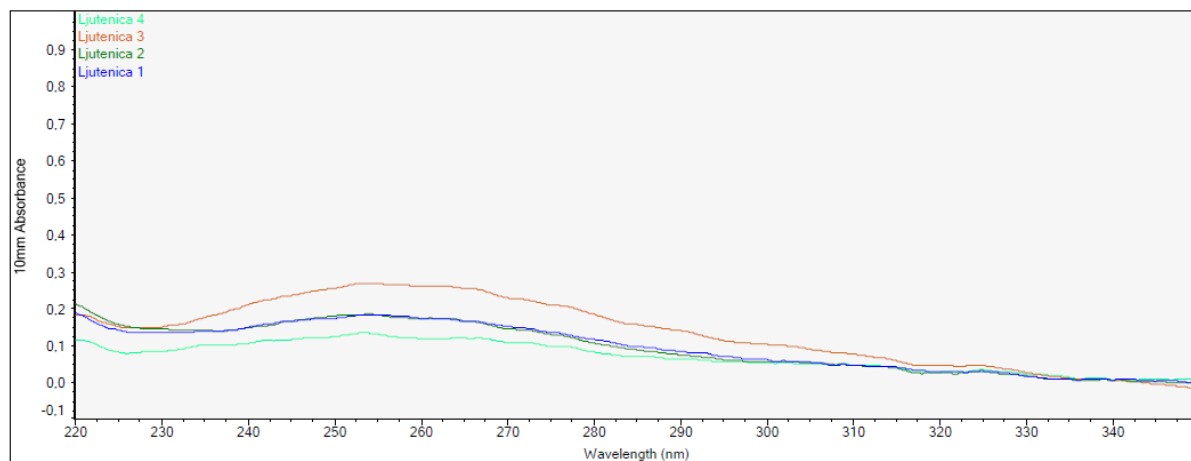
5.4.3 Izolace DNA z pomazánky Ljutenica

Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA je uvedeno v Tabulce 15. Závislosti absorbance DNA na vlnové délce je uvedena v Grafu 13. Vzorek č.3 byl ředěn 10x a 100x a byl amplifikován dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.4 pomocí primerů F_{26S} a R_{26S}

teplotním programem dle Tabulky 3. Detekce produktů PCR gelovou elektroforézou na agarose je uvedena na Obrázku 22.

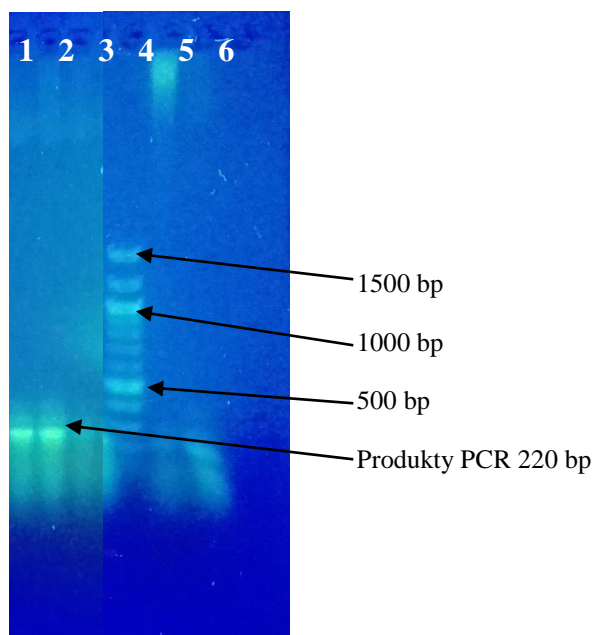
Tabulka 15: Koncentrace a hodnoty absorbance DNA izolovány z 150 mg vzorku pomazánky Ljutenica magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku CTAB s β -merkapt ethanolom a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) a isopropanolu ve 4 opakováních

Ljutenica/ opakování	Navážka [mg]	Koncentrace DNA [ng μL^{-1}]	$A_{260\text{nm}}$	$A_{280\text{nm}}$	$A_{260\text{nm}}/$ $A_{280\text{nm}}$	$A_{260\text{nm}}/$ $A_{230\text{nm}}$	Množství DNA [ng]
1	150	8,3	0,166	0,110	1,51	1,30	415
2		8,3	0,165	0,101	1,64	1,20	415
3		12,6	0,253	0,178	1,42	1,76	630
4		5,6	0,112	0,076	1,48	1,44	280



Graf 14: Absorpční spektrum DNA izolované z 150 mg pomazánky Ljutenica magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β -merkapt ethanolom a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) a isopropanolu ve 4 opakováních

Obrázek 22: Gelová elektroforéza produktů PCR (220 bp) – Amplifikována byla DNA izolovaná z 150 mg pomazánky Ljutenica magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β -merkptoethanolem a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) a isopropanolu v 1 opakování



Běh	DNA	Ředění DNA	Množství DNA ve směsi pro PCR [ng]	Detekce produktu PCR
1	Ljutenica	0	25,2	+++
2		10x		+++
3		100x		+
4	Standard DNA 100bp žebříček	0		
5	Negativní kontrola	0		-
6	Pozitivní kontrola <i>Brassica oleracea</i>	0	2	++

+, ++, +++: detekce produktů PCR o různé intenzitě

- produkty PCR nebyly detegovány

DNA byla izolována v koncentracích 5,6 – 12,6 ng μL^{-1} . DNA byla znečištěna, poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 1,42 - 1,64$; poměr $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}} = 1,30 - 1,76$.

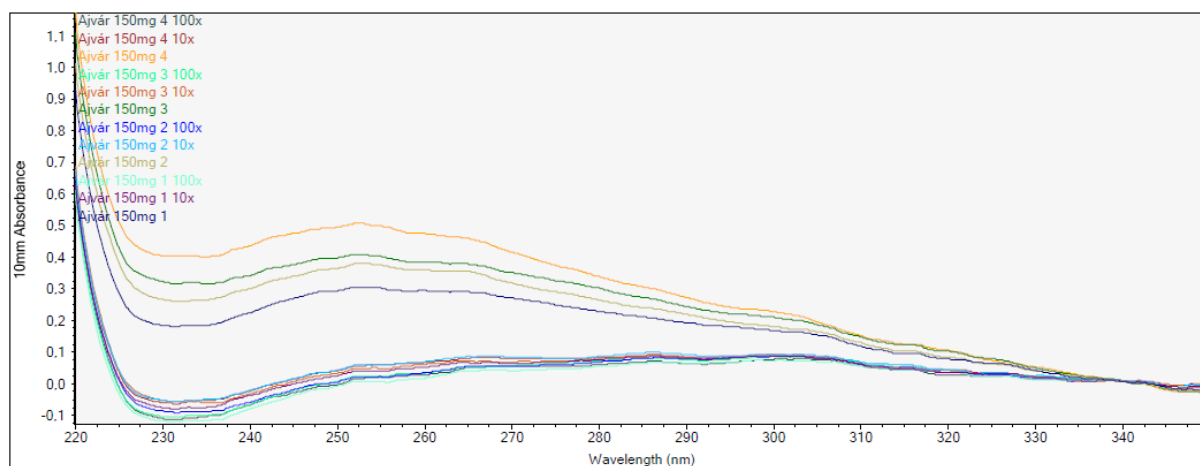
Produkty PCR byly detegovány v různé intenzitě v závislosti na množství DNA ve směsi pro PCR.

5.4.4 Izolace DNA z pomazánky Ajvár

Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA je uvedeno v Tabulce 16. Závislost absorbance DNA na vlnové délce je uvedena v Grafu 14. Detekce produktů PCR gelovou elektroforézou na agarose je uvedena na Obrázku 23.

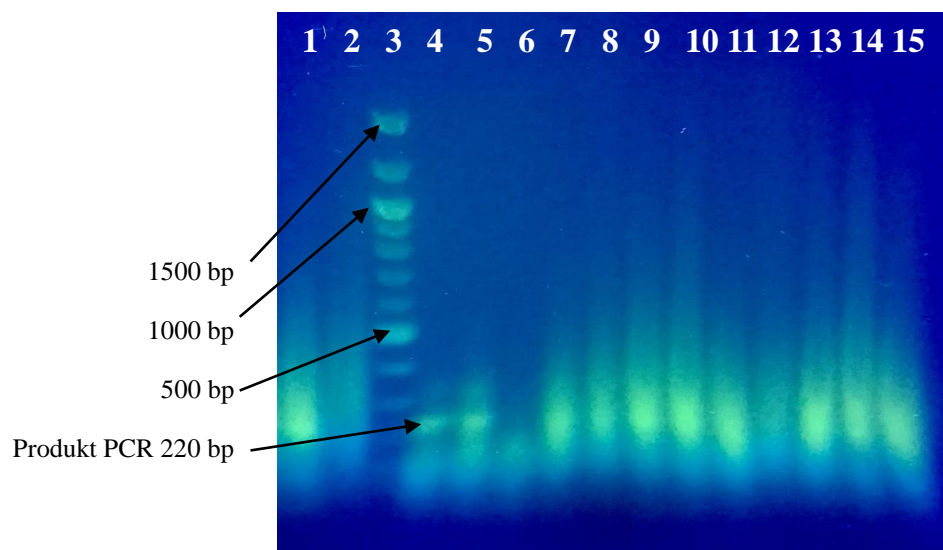
Tabulka 16: Koncentrace a hodnoty absorbcí DNA izolované z 150 mg pomazánky Ajvár magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β -merkptoethanolem a směsí chloroform:oktanol (24:1) ve 4 opakováních

Ajvár	Navážka [mg]	Koncentrace DNA [ng/ μ l]	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{260nm} / A _{280nm}	A _{260nm} / A _{230nm}	Množství DNA [ng]
1	150	14,3	0,286	0,220	1,30	1,63	715
2		17,6	0,351	0,256	1,37	1,36	880
3		18,8	0,376	0,294	1,28	1,20	940
4		23,3	0,466	0,329	1,42	1,17	1165



Graf 15: Absorpční spektrum DNA izolována z 300 mg pomazánky Ajvár magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β -merkptoethanolem a přidavkem směsí chloroform:oktanol (24:1) ve 4 opakováních

Obrázek 23: Gelová elektroforéza produktů PCR (220 bp) – Amplifikována byla DNA izolovaná z 150mg Ajeváru magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β -merkaptoethanolem a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) ve 4 opakováních



Běh	Opakování	DNA	Ředění DNA	Množství DNA ve směsi pro PCR [ng]	Detekce produktu PCR
1		Pozitivní kontrola <i>N. tabacum</i>	0	2	+++
2		Negativní kontrola	0		-
3		Standard DNA 100 bp žebříček	0		
4	1	Ajevár	0	28,6	++
5			10x		++
6			100x		-
7	2		0	35,2	+
8			10x		+
9			100x		-
10	3		0	37,6	+
11			10x		-
12			100x		-
13	4		0	46,6	+
14			10x		+
15			100x		-

+, ++, +++ detekce produktů PCR o různé intenzitě

- produkty PCR nebyly detegovány

DNA byla izolována v koncentracích 14,3 – 23,3 ng μL^{-1} . DNA byla znečištěna, poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 1,28 - 1,42$; poměr $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}} = 1,17 - 1,63$.

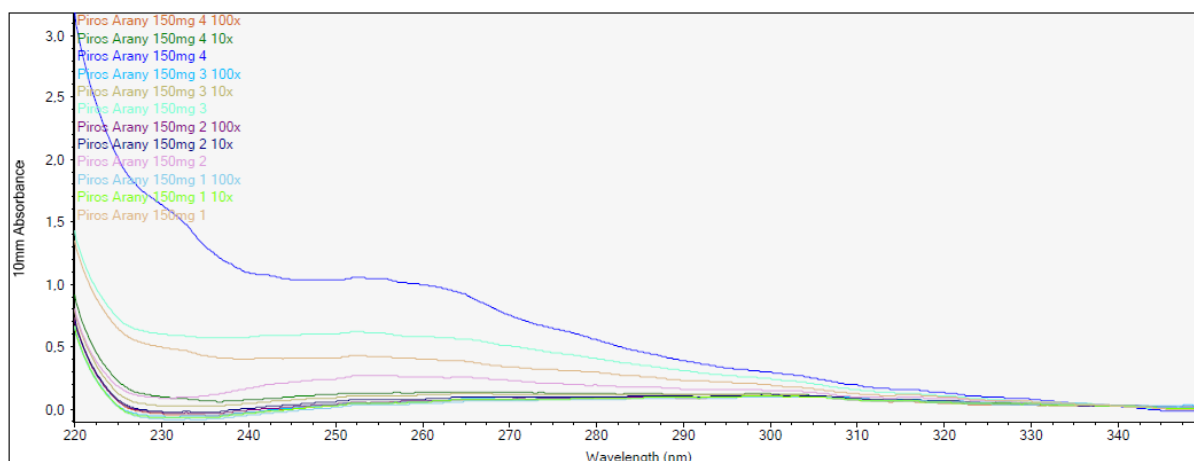
Produkty PCR byly detegovány v různé intenzitě v závislosti na množství DNA ve směsi pro PCR.

5.4.5 Izolace DNA z pomazánky Piros Arany

Vzorky pomazánky Piros Arany (150 mg) byly homogenizovány pomocí 800 μL CTAB a 1 μL β -merkapt ethanolu dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.1. Byl přidáno 800 μL směsi chloroform:oktanol (24:1) dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.1.1. Další práce s DNA byly provedeny dle postupu uvedeném v kapitole 5.4. Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA je uvedeno v Tabulce 17. Závislost absorbance DNA na vlnové délce je uvedena v Grafu 15. Detekce produktů PCR gelovou elektroforézou na agarose je uvedena na Obrázku 24.

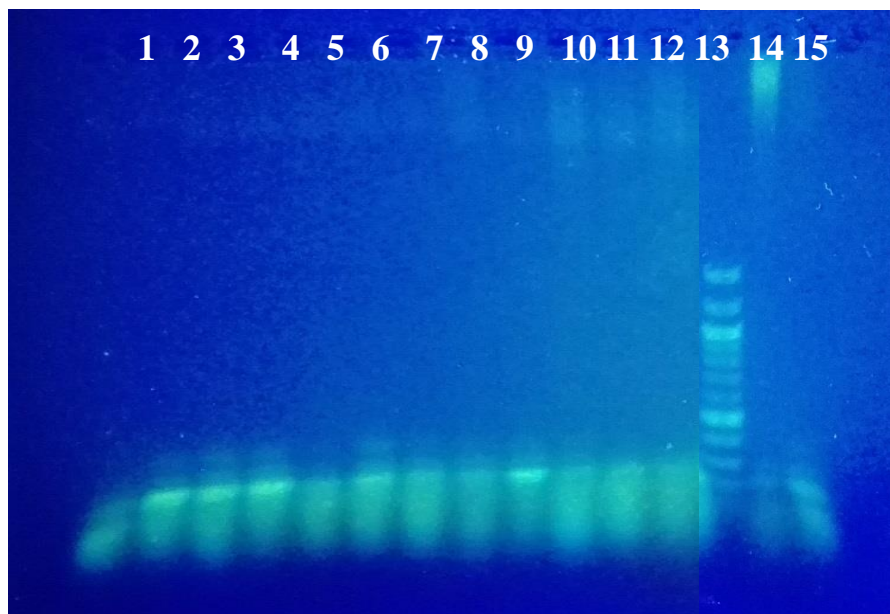
Tabulka 17: Koncentrace a hodnoty absorbancí DNA izolované z 150 mg vzorku pomazánky Piros Arany magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí CTAB s β -merkapt ethanolem a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) a isopropanolu ve 4 opakováních

Piros Arany/ opakování	Navážka [mg]	Koncentrace DNA [$\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$]	$A_{260\text{nm}}$	$A_{280\text{nm}}$	$A_{260\text{nm}}/$ $A_{280\text{nm}}$	$A_{260\text{nm}}/$ $A_{230\text{nm}}$	Množství DNA [ng]
1	150	18,9	0,378	0,274	1,38	0,79	945
2		11,8	0,235	0,168	1,40	3,57	590
3		27,9	0,558	0,383	1,46	0,96	1395
4		48,9	0,977	0,534	1,83	0,60	2445



Graf 16: Absorpční spektrum DNA z 150mg Piros Arany magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β -merkaptethanolem a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) a isopropanolu ve 4 opakováních

Obrázek 24: Gelová elektroforéza produktů PCR (220 bp) – Amplifikována byla DNA izolovaná z 150 mg pomazánky Piros Arany magnetickými částicemi PGMAox. Homogenát byl připraven pomocí roztoku s CTAB a β -merkaptethanolem a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) a isopropanolu ve 4 opakováních



Běh	Opakování	DNA	Ředění DNA	Množství DNA ve směsi pro PCR [ng]	Detekce produktu PCR
1	1	Piros Arany	0	37,8	+
2			10x		+++
3			100x		++

Běh	Opakování	DNA	Ředění DNA	Množství DNA ve směsi pro PCR [ng]	Detekce produktu PCR	
4	2	Piros Arany	0	23,6	++	
5			10x		+	
6			100x		++	
7	3		0	55,8	+	
8			10x		+	
9			100x		++	
10	4		0	97,8	+	
11			10x		+	
12			100x		+	
13			Standard DNA 100 bp žebříček			+++
14			Negativní kontrola			
15			Pozitivní kontrola <i>Brassica oleacea</i> .		2	++

+, ++, +++ detekce produktů PCR o různé intenzitě

- produkty PCR nebyly detegovány

DNA byla izolována v koncentracích 11,8 – 48,9 ng μL^{-1} . DNA byla znečištěna, poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 1,38 - 1,83$; poměr $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}} = 0,60 - 3,57$.

Produkty PCR byly detegovány v různé intenzitě v závislosti na množství DNA ve směsi pro PCR.

5.5 Příprava ampliconů 700 bp a 400 bp Žitavské papriky na sekvencování a vyhodnocení sekvencí

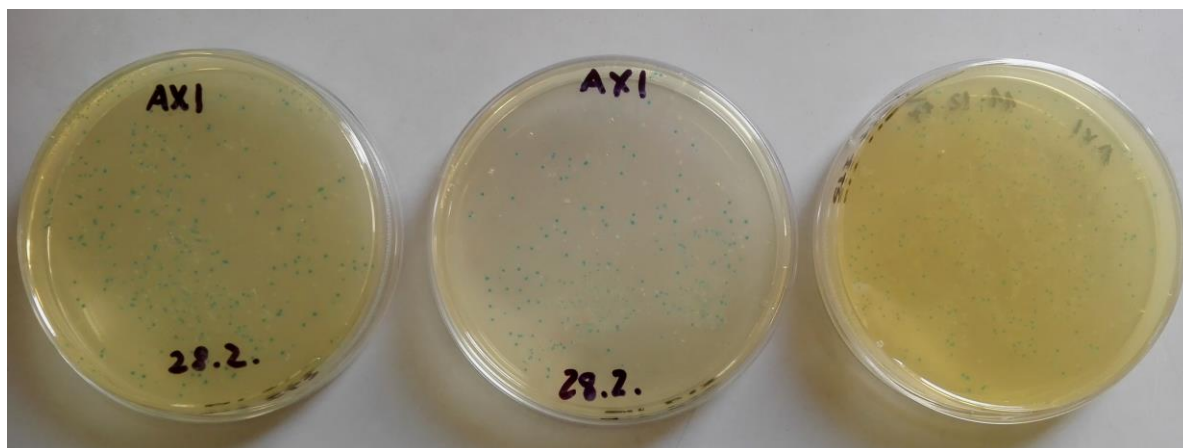
DNA byla izolována z 150 mg mleté Žitavské papriky a amplifikována dle postupů uvedených v kapitolách 4.6.1, 4.6.1.1, 4.6.2 a 4.6.4. Dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.6.2 amplicon o velikosti 700 bp a 400 bp* byl ligován do vektoru pDRIVE a transformován do buněk *E. coli* dle 4.6.6.3. Na agaru s AXI (LB agar s přidavkem ampicilinu, X-gal, a IPTG) byly selektovány transformanty s rekombinantním a nerekombinantním plasmidem (Obrázek 25). Dle postupu uvedeném v kapitole 4.6.6.5 byla provedena PCR z jedné bakteriální kolonie (Obrázek 26) s cílem ověřit velikost insertu. Pro sekvencování ampliconů 700 bp byly vybrány amplicony označené Zit_1, Zit_2, Zit_3,

Zit_6 a Zit_7. Pro analýzu byly použity 2 amplikony (Zit3ctab a Zit5ctab) získané po amplifikaci DNA izolované klasickou metodou CTAB.

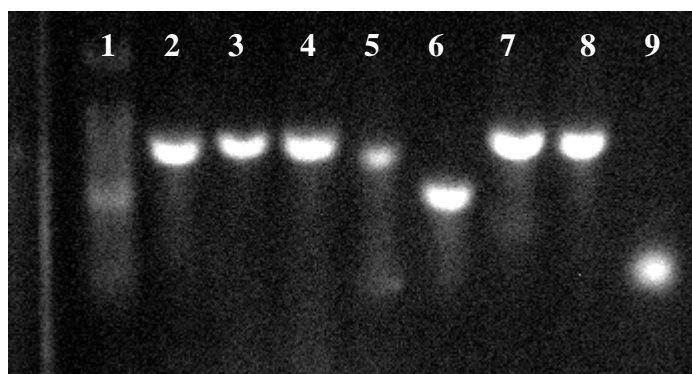
Po sekvencování amplikonů (700 bp) a analýze sekvencí (Obrázek 27) byl zkonstruován fylogenetický strom (Obrázek 28). Byla zjištěna fylogenetická příbuznost sekvencí amplikonů Zit_1, Zit_6 a Zit3ctab Žitavské papriky s klony v nukleotidové databázi GenBank odpovídající paprice seté *Capsicum annum*. Ostatní klony (Zit_2, Zit_3, Zit_7 a Zit5ctab) byly jen vzdáleně příbuzné některým zástupcům čeledi Solanaceae.

*Amplikony 400 bp byly získány primery Zd1 a R_5.8S, detekce produktů je znázorněn na Obrázku 30. Dle 4.6.6.1 byly přečištěny amplikony a ligace proběhla dle 4.6.6.2 po dobu 2,5 hodiny. Dle 4.6.6.3 proběhla transformace vektoru do buněk *E. coli*.

Obrázek 25: Petriho misky s AXI agarem. Bílé bakteriální kolonie obsahují rekombinantní vektor pDRIVE na rozdíl od modrých kolonií



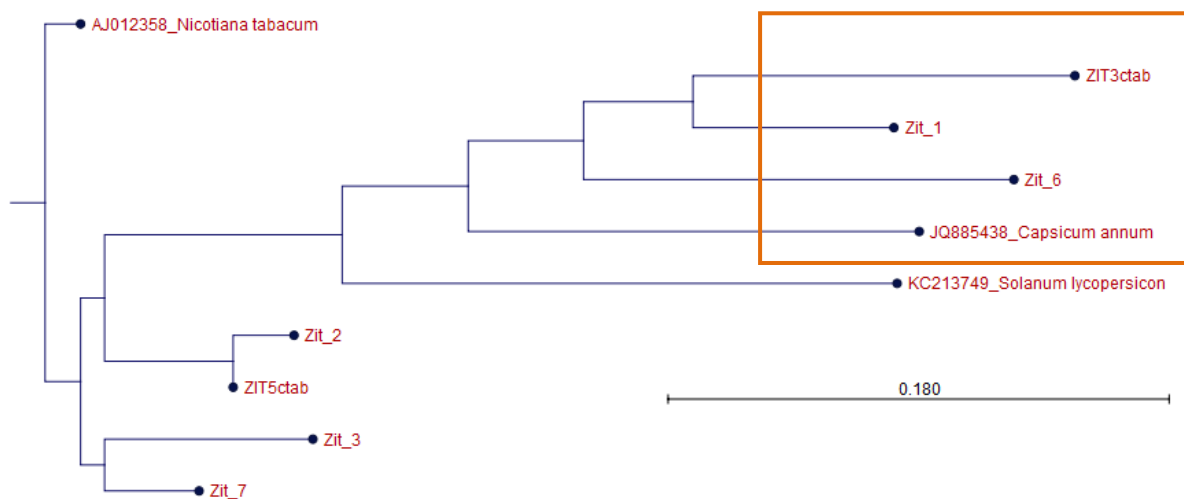
Obrázek 26: Gelová elektroforéza produktů PCR – Amplifikována byla DNA rekombinantního plasmidu a nerekombinantního plasmidu z bakteriálních kolonií *E. coli*



Běh	DNA amplikonu	Označení pro sekvencování	Detekce produktu PCR	Přibližnáá délka amplikonu
1	Standard DNA 100 bp žebříček	-	++	
2	Rekombinantní plasmid – bílá kolonie	Zit_1	+++	700 bp
3		Zit_2	+++	700 bp
4		Zit_3	+++	700 bp
5		-	++	< 700 bp
6		-	+++	< 700 bp
7		Zit_6	+++	700 bp
8		Zit_7	+++	700 bp
9		Nerekombinantní plasmid – modrá kolonie	-	+++

++, +++ detekce produktů PCR o různé intenzitě

Je zřejmé, že sekvence jsou sice příbuzné, ale ne zcela identické (obsahují bodové záměny-mutace). Míru identity znázorňuje graf pod sekvencemi – 100 % identita v dané pozici je znázorněna maximálním sloupcem.



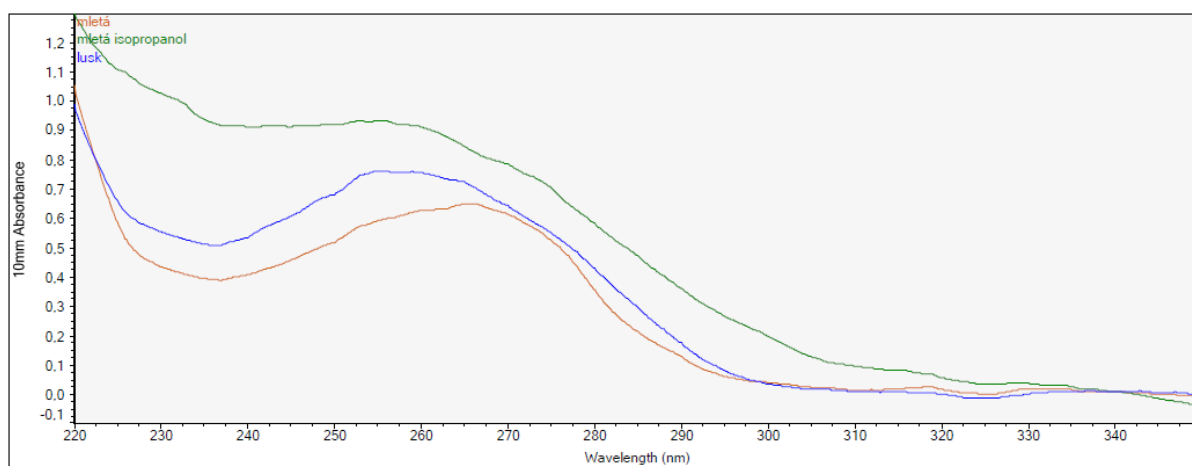
Obrázek 28: Fylogenetický strom konstruovaný z výše uvedených klonů a referenčních sekvencí v databázi GenBank. Klony odpovídající sekvenci papričky (KC885438_Capsicum annum) jsou znázorněny rámečkem. Zbývající klony jsou umístěny vzdáleně od referenční sekvence papričky a jejich původ nelze prozatím určit.

5.6 Kontrola intaktnosti izolované DNA

Během další práce se nepodařilo amplifikovat DNA izolovanou z lusku a mleté Žitavské papriky pomocí primerů F_18S a R_5.8S. S cílem ověření relativní intaktnosti DNA byla izolována ve 2 opakováních z lusku a mleté papriky z homogenátů s přídavkem chloroform:oktanolu pomocí magnetických částic a z homogenátu s přídavkem chloroform:oktanolu a přesrážením isopropanolem (bez použití magnetických částic) dle postupů uvedených v kapitolách 4.6.1, 4.6.1.1 4.6.1.2 a 4.6.2. Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA je uvedeno v Tabulce 18. Závislost absorpance DNA na vlnové délce je uvedena v Grafu 16. Na agarosový gel bylo naneseno 75 μ L DNA. Detekce produktů PCR gelovou elektroforézou na agarose je uvedena na Obrázku 29.

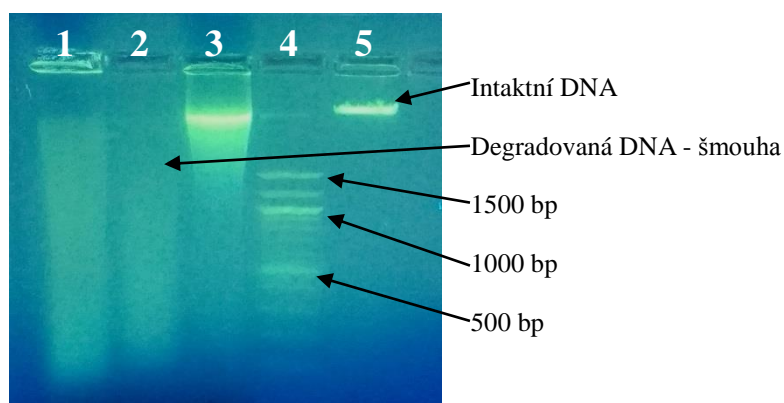
Tabulka 18: Koncentrace a hodnoty absorbancí DNA izolované z 150 a 300 mg vzorku mleté a mražené Žitavské papriky magnetickými částicemi PGMAox a bez magnetických částic. Homogenáty byly připraveny pomocí CTAB s β -merkptoethanolem a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) bez a s přesrážením isopropanolem

DNA Žitavské papriky	Přesrážení isopropanolem	Izolace magnetickými částicemi	Navážka [mg]	Koncentrace DNA [ng μL^{-1}]	$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$	$A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$	Množství DNA [ng]
Mletá	-	+	150	30,9	1,77	1,45	3090
Mletá	+		150	45,2	1,57	0,89	4520
Lusk	+	+	300	37,4	1,78	1,37	3740



Graf 17: Absorpční spektrum DNA z 150 a 300 mg mleté Žitavské papriky a z lusu magnetickými částicemi PGMAox a bez magnetických částic. Homogenát byl připraven pomocí CTAB s β -merkptoethanolem a přidavkem směsi chloroform:oktanol (24:1) bez a s přesrážením isopropanolem.

Obrázek 29: Gelová elektroforéza DNA izolované pomocí magnetických částic a bez nich z mleté Žitavské papriky a z lusu mražené Žitavské papriky. Na gel bylo naneseno 75 μL DNA.



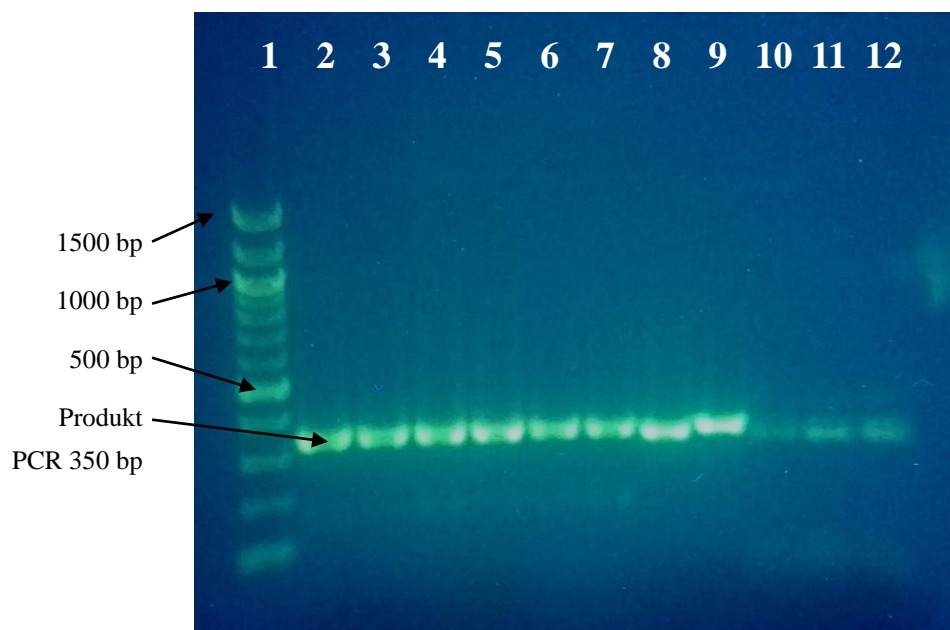
Běh	Žitavská paprika - DNA	Přesrážení isopropanolem	Izolace magnetickými částicemi	Množství DNA [ng]/běh	Detekce DNA
1	Mletá	-	+	2317,5	Šmouha
2	Mletá	+	-	3390	Šmouha
3	Lusk	+	+	2805	Šmouha + proužek
4	Standard DNA 100 bp žebříček			-	
5	Lambda DNA			200	Proužek

DNA byla izolována v přibližně stejné koncentraci jak s magnetickými částicemi, tak bez nich. DNA izolovaná z mleté Žitavské papriky byla výrazně degradovaná. DNA izolovaná z lusu mražené Žitavské papriky byla degradovaná méně, byl detekován diskretní proužek.

5.6.1 Ověření amplifikace v PCR

Degradovaná DNA z mleté Žitavské papriky a DNA izolovaná z mraženého lusu a semen Žitavské papriky byla amplifikována primery Zdf_18S a Zdr_5.8S a LA polymerasou dle postupu uvedeného v kapitole 4.6.4 programem uvedeným v Tabulce 4. Na gel bylo nanášeno 5 μ L produktů PCR (Obrázek 30). Vzhledem k tomu, že byly detegovány slabé produkty PCR v negativních kontrolách, byla DNA mleté Žitavské papriky amplifikována s primery Zdf_18S a R_5.8S (Obrázek 31)

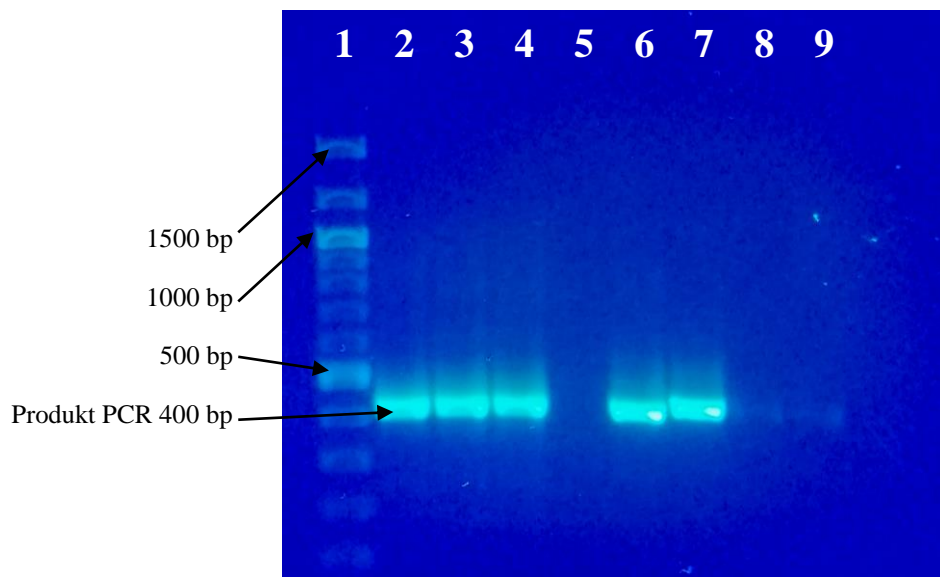
Obrázek 30: Gelová elektroforéza produktů PCR (350 bp) – Byla amplifikována degradovaná DNA izolovaná z lusu, semen a mleté Žitavské papriky. Na gel bylo nanášeno 5 μ l amplikonů.



Běh	DNA Žitavské papriky	Detekce produktu PCR
1	Standard DNA 100 bp žebříček	+++
2	Lusk	+++
3		+++
4		+++
5	Semena	+++
6	Mletá	+++
7		+++
8	Pozitivní kontrola <i>Nicotiana tabacum</i>	+++
9	Pozitivní kontrola <i>Brassica oleracea</i>	+++
10	Negativní kontrola	+
11		+
12		+

+, +++ detekce produktů PCR o různé intenzitě

Obrázek 31: Gelová elektroforéza produktů PCR (400 bp) – Aamplifikována byla DNA izolovaná z mleté Žitavské papriky. Na gel byly naneseny 3 μ L ampliconů.



Běh	DNA	Detekce produktů PCR
1	Standard DNA 100 bp žebříček	+++
2	Mletá Žitavská paprika	+++
3		+++
4		+++

Běh	DNA	Detekce produktů PCR
5	-	-
6	Pozitivní kontrola <i>Nicotiana tabacum</i>	+++
7	Pozitivní kontrola <i>Brassica oleracea</i>	+++
8	Negativní kontrola	+/-
9		+/-

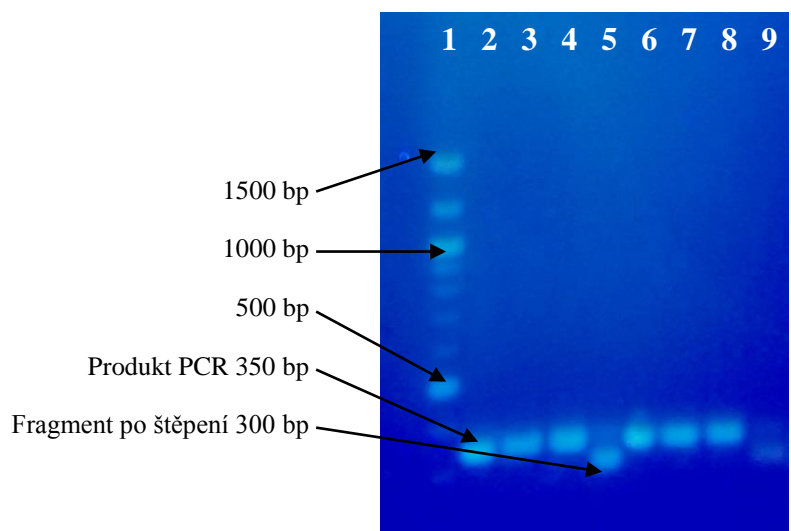
+/-, +++ detekce produktů PCR o různé intenzitě

Degradovaná DNA z mleté Žitavské papriky se amplifikovala v PCR s primery Zdf_18S a R_5.8S stejně jako DNA z pozitivních kontrol. Produkty PCR velmi nízké intenzity byly amplifikovány i v negativních kontrolách.

5.7 Ověření specifity produktů PCR (350 bp)

Pomocí programu NEBcutter byla naleznena restrikční místa v sekvenci DNA papriky *Capsicum annum* získané po amplifikaci primery Zdf_18S a Zdr_5.8S a primery Zdf_18S a R_5.8S. Produkty PCR 350 bp byly štěpeny restriktasami *RsaI*, *HaeIII* a *Sau3AI* dle postupu 4.6.7. Výsledky štěpení byly vizualizované po gelové elektroforéze dle postupu 4.6.5 (Obrázek 32, Obrázek 33).

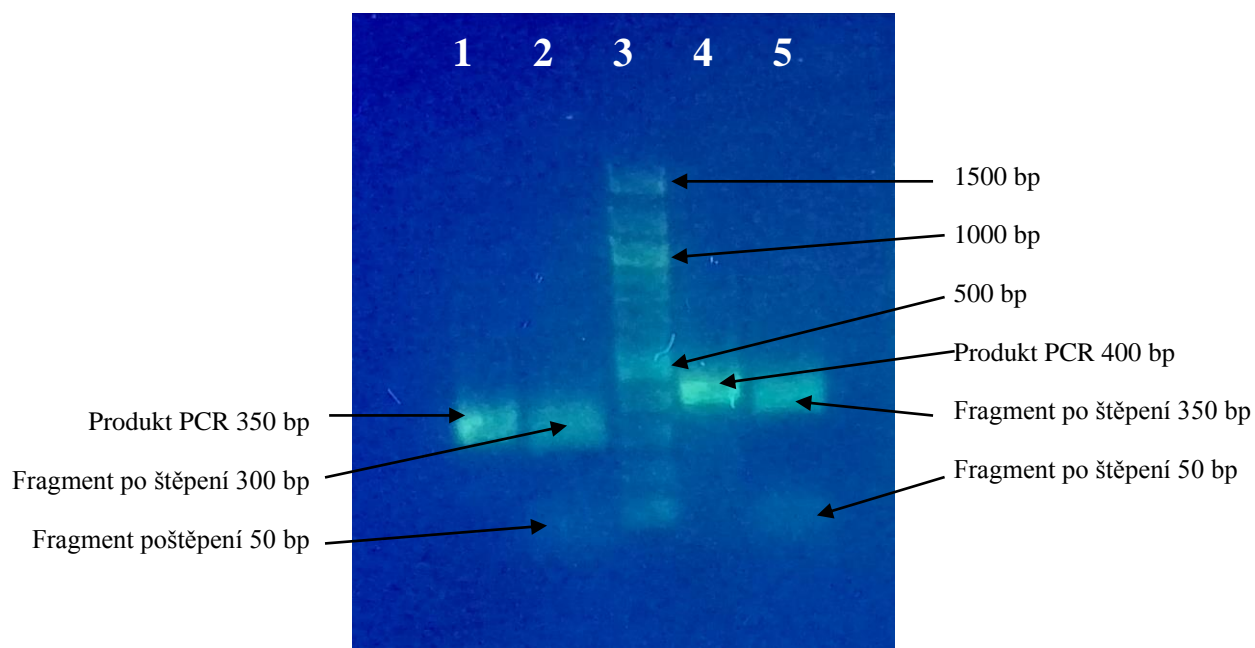
Obrázek 32: Gelová elektroforéza produktu PCR (350 bp) po štěpení restriktasami



Běh	DNA Žitavské papriky	Použita restriktasa	Štěpení	Velikost fragmentů
1	Standard po 100 bp žebříček	-		
2	Semena	Bez restriktasy	-	350 bp
3		<i>RsaI</i>	-	350 bp
4		<i>HaeIII</i>	-	350 bp

Běh	DNA Žitavské papriky	Použita restriktasa	Štěpení	Velikost fragmentů
5	Semena	<i>Sau3AI</i>	+	350 bp + 300 bp
6	Mletá	Bez restriktasy	-	350 bp
7		<i>RsaI</i>	-	350 bp
8		<i>HaeIII</i>	-	350 bp
9		<i>Sau3AI</i>	+	300 bp

Obrázek 33: Gelová elektroforéza produktu PCR (350 bp a 400 bp) po štěpení restriktasami



Běh	DNA Žitavské papriky	Použita restriktasa	Štěpení	Velikost fragmentů
1	Mletá 350 bp	Bez restriktasy	-	350 bp
2		<i>Sau3AI</i>	+	300 bp + 50 bp
3	Standard DNA 100 bp žebříček			
4	Mletá 400 bp	Bez restriktasy	-	400 bp
5		<i>Sau3AI</i>	+	350 bp + 50 bp

6. DISKUSE

Diplomová práce se zabývala optimalizací metody mikroizolace DNA z potravinových výrobků obsahujících papriku. Pro optimalizaci množství navážky byl k izolaci DNA použit lusk čerstvé Žitavské papriky, poté byla DNA izolována z různých výrobků mleté sušené papriky (Žitavská paprika sladká mletá, Eko paprika sladká, Eko paprika dimljena, Kalocsa környéki örölt paprika) a směsi koření (Serious Blends) a různých druhů pomazánek (Ajvár, Namaz s papriko, Ljutenica, Pindjur, Piros Arany).

6.1 Optimalizace navážky pro izolaci DNA z čerstvé papriky

Pro zjištění optimálního množství navážky byla izolována DNA z lusku čerstvé Žitavské papriky. Největší množství DNA ($27,5 - 38,5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) bylo získáno z navážky 300 mg. Rozdílné koncentrace izolované DNA byly způsobeny tím, že nebylo možné všechny navážky rovnoměrně homogenizovat. Z větších navážek (500 a 700 mg) se nepodařilo izolovat větší množství DNA, protože během homogenizace kopistem v 1,5 mL Eppendorfových zkumavkách vznikala pěna a docházelo k vytečení části homogenátu.

Nukleové kyseliny mají maximum absorbance při 260 nm, některé proteiny při 280 nm. Z poměru těchto hodnot lze posoudit čistotu DNA. Dostatečně čistý vzorek DNA má poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ v rozmezí hodnot 1,8-2,0 [32]. DNA izolovaná z lusku papriky ze všech testovaných navážek byla znečištěna proteiny. Obdobně poměr $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ vyjadřuje kontaminaci vzorku polyfenoly. Rostlinný materiál obsahuje různé polyfenolické sloučeniny, které jsou izolovány spolu s DNA. Poměr $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ u vzorků čisté DNA by měl být v rozmezí 2,0 – 2,2.

6.2 Izolace, purifikace a amplifikace DNA z čerstvého lusku Žitavské papriky

DNA izolovaná z homogenátu magnetickými částicemi nebyla dostatečně čistá – dle spektrofotometrické měření DNA obsahovala sloučeniny absorbující při 230 nm, pravděpodobně fenolické látky. Pro čištění vzorku lze používat k homogenátu s roztokem s CTAB přísádek stejného objemu extrakční směsi chloroform:oktanol (24:1) nebo chloroform:isoamylalkoholu (24:1). Dojde k rozdělení směsi do dvou fází: horní fázi tvoří vodný roztok obsahující DNA; spodní organická fáze je tvořená chloroformem (a fenolem). Mezi vodní a organickou fází se nachází mezifáze tvořená denaturovanými proteiny a zbytky buněčných stěn. Po extrakci směsí chloroform:oktanol (24:1) byly lépe odděleny horní a dolní fáze, horní vodná fáze byla bezbarvá (Obrázek 6). DNA byla izolována v koncentracích $19,9 - 29,3 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Rozdílné koncentrace izolované DNA byly pravděpodobně způsobeny tím, že nebylo možné všechny vzorky rovnoměrně homogenizovat. Naměřena koncentrace DNA je nižší, než bez extrakci směsí chloroform:oktanolu, ale tato hodnota může být snižena i menším množstvím dalších sloučenin absorbujících při 260 nm. Z poměru $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ byla zjištěna čistota DNA [32]. Po srovnání DNA bez a s extrakci směsí chloroform:oktanol (24:1) byl poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ stále pod optimální hodnotou. Větší změna byla u poměru

$A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$. Oproti vzorků bez extrakce směsí chloroform:oktanol, extrahované homogenáty obsahovaly mnohem menší množství fenolických látek. Vzorek č.3 měl ideální poměr $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$. I když DNA zůstala částečně znečištěná, PCR produktu se podařilo amplifikovat. Jako templát byla použita neředěná DNA a DNA v ředění 10× a 100×. Po porovnání amplikonů získaných po amplifikaci DNA izolované z homogenátu čerstvého plodu s přidavkem směsí chloroform:oktanol (24:1) dle spektrofotometrických měření se čistota DNA zlepšila, ale amplikony nebyly tak intenzivní.

6.3 Izolace a amplifikace DNA z mletých sušených výrobků

Izolace DNA byla optimalizována z čerstvé papriky, optimální množství pro izolaci byla 300 mg vzorku. Jelikož obsah vody v mletých sušených vzorcích je mnohem menší než v čerstvém lusku, 300 mg mleté papriky bylo obtížněji homogenizovatelné. Proto pro homogenizaci bylo naváženo 150 mg mleté papriky do 2 mL Eppendorfových zkumavek. Avšak v některých případech izolovaná DNA byla obtížněji amplifikovatelná. Komplikace byly pravděpodobně způsobeny rozdílným složením vzorků, nebo technologickým zpracováním – sušením a mletím DNA byla částečně degradována [41]. Vysoký obsah polyfenolů byl ověřen spektrofotometricky. V souladu s literaturou, která udává, že nejbohatější částí papriky na polyfenoly je lusk a semena [50], všechny DNA izolované z mletých sušených výrobků byly znečištěné polyfenolickými látkami.

6.3.1 Izolace DNA z mleté Žitavské papriky

Vzhledem k tomu, že vzorky byly homogenizovány v 2 mL Eppendorfových zkumavkách a bylo přidáno víc CTAB-u, bylo přidáno menší množství směsí chloroform:oktanol (24:1). Po extrakci a centrifugaci byla odebrána horní fáze, která byla oranžová a viskózní. Během izolace DNA magnetickými částicemi, částice s navázanou DNA byly 2× promyty 70 % ethanolem, protože po jednom promytí Eppendorfova zkumavka byla světle oranžová. Z 150 mg papriky byla izolována DNA v koncentracích 34,6-37,1 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ a z 300 mg 62,2-75,1 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, což odpovídá množství papriky. Poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ byl v rozmezí 1,33-1,38, takže izolovaná DNA obsahovala proteiny. Několik prací se zabývá proteinovým složením papriky, například práce [51] je zaměřena na izolaci antimikrobiálních peptidů, které byly separovány chromatograficky a absorbovaly při 280 nm. Dle poměru $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ byla izolovaná DNA znečištěna fenolickými látkami [32]. Případné znečištění fenolickými látkami by mohlo být odstraněno další purifikací homogenátu. Polysacharidy zvyšují viskozitu roztoku, viskózní chování horní fáze byla pozorována po extrakci při odebrání homogenátu. Znečištění DNA však neinhibovalo PCR, amplikony 700 bp byly detegovatelné v různé intenzitě v závislosti na množství DNA v směsích pro PCR.

6.3.2 Izolace a amplifikace DNA z mleté Eko papriky sladké

Homogenát odebraný pro separaci DNA byl viskózní a olejovitý a měl oranžovou barvu. Magnetické částice s navázanou DNA byly 2× promývány 70 % ethanolem. Byla izolována DNA v hodně odlišných koncentracích v rozmezí 14,6-87,4 ng·μL⁻¹. Velké rozdíly v izolovaném množství DNA mohlo být způsobeno tím, že během izolace DNA navázané na magnetických částicích nelze odebrat stejné množství částic. Částice sedimentují rychle a směs před každým odebráním se musí potřepat. Poměr A_{260nm}/A_{280nm} byl v rozmezí 1,29-1,46, to znamená, že DNA je znečištěna proteiny. Poměr A_{260nm}/A_{230nm} byl v rozmezí 0,78-1,59, což mohlo být způsobeno znečištěním fenolickými látkami. Viskózní chování homogenátu je typickým znakem polysacharidů. Každopádně po amplifikaci s primery F_18S a R_5.8S nejlépe se amplifikovaly DNA, které měly nejvyšší koncentraci. Vzorke 100× ředěné DNA se neamplifikovaly, pravděpodobně byla nízká koncentrace znečištěné DNA, která nepostačovala pro reakci. Detekce amplikonů byla obtížná i z důvodů vznikajících šmouh, které neumožňovaly vizualizaci méně intenzivních amplikonů. Důvodem vznikajících šmouh mohla být amplifikace částečně degradované DNA.

6.3.3 Izolace DNA z mleté Eko papriky dimljena (uzená)

Homogenát připravený z navážek 150 mg odebraný pro separaci DNA byl viskózní a olejovitý a měl hnědou barvu. Magnetické částice s navázanou DNA byly 2× promyty 70 % ethanolem. DNA byla izolována v koncentracích v rozmezí 27,0-44,6 ng·μL⁻¹ a byla znečištěna. Poměr A_{260nm}/A_{280nm} byl v rozmezí 1,31-1,40, což může značit znečištění proteiny. Poměr A_{260nm}/A_{230nm} byl v rozmezí 0,72-0,98, což může značit znečištění fenolickými sloučeninami. Vzhledem k tomu, že homogenát byl viskózní, polysacharidy byly pravděpodobně izolovány spolu s DNA. Extrahované olejové kapky, které zůstaly v horní fázi také zvyšovaly viskozitu DNA [52]. Během uzení papriky vznikají různé sloučeniny jako např. polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), které mohou ovlivnit i absorpční spektrum v UV oblasti. K amplifikaci byly použity primery F_18S a R_5.8, ale DNA se neamplifikovala. Proto byla izolována DNA znovu ve čtyřech opakováních z homogenátů přečištěných přesrážením isopropanolem. Sediment po promývání ethanolem měl světle hnědou barvu. DNA byla izolována v koncentracích v rozmezí 11,1-25,8 ng·μL⁻¹ a byla znečištěna. Poměr A_{260nm}/A_{280nm} byl v rozmezí 1,44-2,19, což může značit znečištění proteiny. Poměr A_{260nm}/A_{230nm} byl v rozmezí 0,62-0,90, což může značit znečištění fenolickými sloučeninami.

DNA byla amplifikována s použitím primerů F_18S a R_5.8 ale DNA se neamplifikovala. V literatuře byl studován mutagenní vliv PAU na DNA. Tyto sloučeniny inhibují funkci některých enzymů, jako např. funkci polymerasy. Izolovaná DNA může být degradovaná během výroby, kdy paprika je zahřívána. Rovněž sloučeniny vznikající během uzení mohou poškodit DNA [53, 54]. Byla stanovena množství PAU v různých tradičních uzených potravinách, mezi kterými tradiční Španělská uzená paprika Pimenton de la Vera měla nejvyšší hodnoty [54]. Z výše uvedených důvodů jsme předpokládali degradaci DNA, a proto byly k amplifikaci použity primery F_26S a R_26S. Amplikony mají délku 220 bp. V případě

degradace DNA je amplifikace kratších úseku pravděpodobnější, než amplifikace úseku 700 bp. DNA se amplifikovala, kromě specifických produktů vznikaly i nespecifické produkty.

6.3.4 Izolace DNA z mleté Kalocsa környéki örölt papriky (uzená)

Homogenát připravený z navážky 150 mg odebraný pro separaci DNA byl viskózní a olejovitý a měl tmavě oranžovou barvu. Magnetické částice s navázanou DNA byly 2× promyty 70 % ethanolem. DNA byla izolována v koncentracích v rozmezí 25,3-44,2 ng· μL^{-1} . Poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ byl v rozmezí 1,44-1,52, což může značit mírné znečištění proteiny. Poměr $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ byl v rozmezí 0,80-0,98, což může značit znečištění fenolickými sloučeninami. Vzhledem k tomu, že homogenát byl viskózní, polysacharidy byly pravděpodobně izolovány spolu s DNA. Během uzení papriky vznikají různé sloučeniny jako např. polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), které mohou ovlivnit i absorpční spektrum. aVzorky DNA byly amplifikovány s primery F_18S a R_5.8. Detegované amplikony byly většinou u neřaděných vzorků DNA. byly jenom slabé nebo velmi slabé intenzity. Detekce amplikonů byla obtížné i z důvodů vznikajících šmouh, které neumožňovaly vizualizaci méně intenzivních amplikonů. Důvodem vznikajících šmouh může být částečná degradace DNA. Izolovaná DNA mohla být degradovaná během zpracování, kdy vzorek je zahříván, nebo sloučeniny vznikající během uzení mohou poškodit DNA (např. PAU) [53, 54]. V tomto případě degradace nebyla až tak intenzivní, jak u Eko papriky dimljena; templátová DNA byla dostatečně intaktní pro amplifikaci delších úseku DNA (700 bp).

6.3.5 Izoace DNA ze Serious Blends

Výrobek je směs sušené zeleniny (paprika, česnek, cibule, pepř) a soli. Sušená zelenina a sůl tvoří nehomogenní směs, hrubé velké částice nebylo možné rovnoměrně homogenizovat kopistem. Homogenát byl slabě oranžový. Magnetické částice s navázanou DNA byly 2× promyty 70 % ethanolem. DNA byla izolována v koncentrací 14,0-29,1 ng· μL^{-1} . Poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ byl v rozmezí 1,27-1,44, což může značit znečištění proteiny. Poměr $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ byl v rozmezí 0,96-1,54, což může značit znečištění fenolickými sloučeninami. Homogenát nebyl viskózní jak ostatní mleté sušené produkty, pravděpodobně nebylo spolu s DNA izolováno větší množství polysacharidů. Kromě papriky i ostatní složky směsi – česnek i cibule jsou bohatými zdroji fenolických sloučenin. Pomocí primerů F_18S a R_5.8S byly amplifikovány všechny vzorky izolované DNA. Vzhledem k tomu, že z ostatních mletých sušených výrobků, které obsahovaly jenom papriku, izolovaná DNA byla obtížně amplifikovatelná. Lze předpokládat, že rostlinná DNA, která se amplifikovala byla izolována hlavně z česneku a cibule.

6.4 Izolace DNA z potravin obsahujících papriku

Pro izolaci DNA z potravin obsahujících papriku byly naváženy vzorky po 150 nebo 300 mg. Obsah papriky ve výrobcích byla v rozmezí 48-87 %. Při odběru vzorků byla snaha odseparovat kousky papriky od ostatních složek tak, aby izolována DNA byla opravdu z papriky. Výrobky dle složení (Tabulka 1) obsahovaly řadu látek, které by mohly komplikovat izolaci a amplifikaci. Proto před separací magnetickými částicemi byl homogenát přesrážen isopropanolem a sediment 2× opláchnut ethanolem. Sediment byl bílý díky přítomnosti soli. Všechny analyzované potraviny obsahovaly organickou kyselinu – buď kyselinu octovou nebo citrónovou. Kromě paprikové pasty Piros Arany všechny potraviny byly tepelně zpracovány pasterací, v některých výrobcích (Pindjur a Ajvár) paprika byla i pečená. Z tohoto důvodu byla předpokládána degradace DNA. DNA byla amplifikována pomocí primerů F_26S a R_26S (produkt PCR o velikosti 220 bp).

6.4.1 Izolace DNA z pomazánky Namaz

DNA byla izolována v rozmezí 8,5-19,4 ng·μL⁻¹. Poměr A_{260nm}/A_{280nm} byl v rozmezí 1,32-1,38, což svědčí znečištění proteiny. Poměr A_{260nm}/A_{230nm} byl v rozmezí 0,97-1,19, což svědčí znečištění fenolickými sloučeninami. Na rozdíl od mleté papriky homogenát nebyl viskózní. Pravděpodobně s nižším obsahem buněk bylo koextrahováno i menší množství polysacharidů, které nezahustily homogenát. Kromě sekundárních metabolitů papriky potravina obsahovala i další složky bohaté na polyfenoly jako jsou hořčice [55], koření [56] a riboflaviny [57] absorbující v UV oblasti [58]. DNA byla amplifikována pomocí primerů F_26S a R_26S; intenzita amplikonů odpovídala koncentraci v PCR směsi.

6.4.2 Izolace DNA z pomazánky Pindjur

DNA byla izolována v rozmezí 35,3-125,2 ng·μL⁻¹. Poměr A_{260nm}/A_{280nm} byl v rozmezí 1,37-1,73, což svědčí o slabším znečištění proteiny. Poměr A_{260nm}/A_{230nm} byl v rozmezí 1,14-2,14, což může značit mírné znečištění fenolickými sloučeninami. Kromě pasterace výrobků, paprika byla pečená, což mohlo vést k degradaci DNA. Pro amplifikaci s primery F_26S a R_26S byla použita DNA o nejvyšší koncentraci a čistotou (A_{260nm}/A_{280nm} = 1,73). Po detekci amplikonů bylo zjištěno, že nejintenzivnější amplifikony poskytla 100× ředěná DNA a nejméně intenzivní amplifikony neředěná DNA. Dle doporučení firmy NEB [59] optimální množství templátové DNA v PCR směsi je v rozmezí 1ng-1μg, takže relativně vysoká koncentrace DNA by neměla inhibovat amplifikaci – nespecifické produkty nebyly detegovány. Pravděpodobně DNA obsahovala inhibitory PCR, které byly vyředěny spolu s DNA.

6.4.3 Izolace DNA z pomazánky Ljutenica

DNA byla izolována v rozmezí 5,6-12,6 ng·μL⁻¹. Poměr A_{260nm}/A_{280nm} byl v rozmezí 1,42-1,64, což může značit znečištění proteiny. Poměr A_{260nm}/A_{230nm} byla v rozmezí 1,20-1,76, což

může svědčit o mírném znečištění fenolickými sloučeninami. Kromě pasterace výrobků paprika byla pečená, což je technologický postup, který může dále degradovat DNA. Pro amplifikaci s primery F_26S a R_26S byly detegovány amplikony. Intenzita amplikonů odpovídala množství DNA ve směsi PCR. Stejná intenzita amplikonů byla detegována po amplifikaci neředěných a 10× ředěných vzorků DNA; nejmenší intenzita byla u 100× ředěných vzorků DNA.

6.4.4 Izolace DNA z pomazánky Ajvár

Mletou kašovitou papriku se nepodařilo odseparovat od ostatních složek pomazánky, především od lilku. DNA byla izolována v rozmezí 14,3-23,3 ng·μL⁻¹. Poměr A_{260nm}/A_{280nm} byl v rozmezí 1,28-14,2, což může značit znečištění proteiny. Poměr A_{260nm}/A_{230nm} byl v rozmezí 1,17-1,63, což může značit mírné znečištění fenolickými sloučeninami. Kromě pasterace výrobků, paprika byla pečená a mletá, což může dále degradovat DNA. DNA byla amplifikována s primery F_26S a R_26S. Intenzita amplikonů po vizualizaci na gelu byla nízká. Kromě amplikonů byly vizualizovány šmouhy. To mohlo být způsobeno silnou degradací DNA během zpracování, navíc výrobek měl prošlou lhůtu spotřeby.

6.4.5 Izolace DNA z pomazánky Piros Arany

DNA byla izolována v rozmezí 11,8-48,9 ng·μL⁻¹. Poměr A_{260nm}/A_{280nm} v rozmezí 1,38-1,83, což může značit znečištění proteiny. Poměr A_{260nm}/A_{230nm} byl v rozmezí 0,60-3,57, což může značit znečištění fenolickými sloučeninami. Výrobek nebyl tepelně ošetřen, jenom mechanicky homogenizovaný. Trvanlivost byla získána přidáním soli (11,5 %)-a jako konzervant byl použit sorbát draselný. Absorpční spektrum mohlo být ovlivněno obsahem sorbátu, který absorbuje v UV oblasti světla [60]. DNA byla amplifikována s primery F_26S a R_26S. Intenzita vizualizovaných amplikonů byla hodně odlišná, většinou ředěná DNA se amplifikovala intenzivněji. To může být znakem přítomnosti inhibitorů.

6.5 Sekvenování klonů PCR produktů z Žitavské papriky

Po transformaci byly selektovány transformanty, které přijaly vektor pDRIVE. Během ligace amplikonů do vektoru se narušuje integrita genu lacZ'. Tento gen kóduje část enzymu β-galaktosidasu a je syntetizován jenom buňkami, které získaly nerekombinantní plasmid a tvoří modré kolonie. Bílé kolonie s rekombinantním plasmidem mají narušenou integritu lacZ' genu a nejsou schopny produkovat enzym β-galaktosidasu, a proto nevzniká modrý produkt. Do směsi pro PCR byla odebrána jedna bílá kolonie špičkou pipety tak aby nebyl odebrán agar. V průběhu denaturace došlo k uvolnění DNA z bakterií a k amplifikaci plasmidové DNA. Dle výsledků PCR požadovanou délku amplikonů mělo jenom 5 vzorků ze 7 bílých kolonií (Obrázek 26). Amplikony z modré kolonie měly mnohem kratší délku (což bylo očekávané). Dva klony (dráhy 5 a 6 gelu), jejichž amplikony měly neočekávanou

velikost, přestože pocházely z bílých kolonií, interpretujeme jako zmutované nebo deletované a dále jsme se jimi nezabývali.

Po sekvencování amplikonů 700 bp a 400 bp* byly nalezené sekvence porovnány s nukleotidovou databází GenBank on line. Dle míry podobnosti byl zkonstruován fylogenetický strom. Skutečně tři klony ze sedmi (43%) odpovídaly sekvenci ITS1 *Capsicum annum* podle umístění na stejné větvi jako referenční sekvence na fylogenetickém stromu (Obrázek 28). Čtyři klony (57%) byly jen vzdálené příbuzné *C. annum*. Může se jednat o kontaminaci vzniklou v průběhu izolace DNA a PCR. Avšak negativní kontrola neposkytovala žádný signál na gelu, což by mohlo ukazovat na skutečnost, že jsme v práci postupovali čistě. Mohlo by se tedy jednat o DNA pocházející ze Žitavské papriky a tedy, že potravinovaný produkt obsahuje kromě papriky (*Capsicum annum*) ještě další blíže nespecifikovaný rostlinný druh, resp. DNA pocházející z něj.

*DNA izolovaná z různých zdrojů Žitavské papriky byla amplifikována s primery Zdf_18S a Zdr_5.8S (amplikony o délce 350 bp). Amplikony byly detegovány bez jakýchkoliv šmouh. Problémem u těchto primerů byla negativní kontrola, ve které i po opakované amplifikaci byl detegován slabý produkt PCR. Tento problém byl vyřešen kombinací primerů Zdf_18S a R_5.8S (amplikony o délce 400 bp). Vedle amplikonů z DNA Žitavské papriky a pozitivních kontrol nebyly detegovány produkty PCR v negativní kontrole.

6.6 Kontrola intaktnosti izolované DNA

DNA izolována z mleté Žitavské papriky se neamplifikovala s primery F_18S a R_5.8S. Byla proto kontrolována degradace DNA. Vznikající šmouha na gelu ukázala, že DNA je degradovaná. Kontrolní DNA z lusku mražené Žitavské papriky byla degradovaná méně. Amplikony z mraženého lusku papriky nebyly intenzivní, ale byly detegovatelné. Společným problémem při amplifikaci DNA z mleté papriky a z mražené papriky byl vznik šmouhy. Dle různých publikací bylo zjištěno, že mleté papriky a různé koření jsou kontaminovány bakteriemi [61] a plísněmi [62, 63] produkující nukleasy, které mohou degradovat DNA. Dle spektrofotometrické měření DNA izolována bez použití magnetických částic dle poměru $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ obsahovala malé množství proteinů. Dle poměru $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ všechny vzorky obsahovaly fenolické látky. Největší množství DNA bylo izolováno z mleté papriky bez magnetických částic, ale dle poměrů $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ a $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ tato DNA obsahovala největší množství kontaminantů.

6.7 Ověření specifity produktů PCR (350 bp a 400 bp)

Restriktasami byly štěpeny amplikony přímo bez předcházející purifikace. Z použitých restriktas se amplikony štěpily jenom enzymem *Sau3AI*, ostatní enzymy amplikony neštěpily ani po štěpení přes noc. Enzymem *Sau3AI* byl štěpen produkt PCR o délce 350 bp a 400 bp. Porovnáním s neštěpenými amplikony lze vidět zkrácení původní délky amplikonů a objevení krátkých amplikonů o délce 50 bp.

7. ZÁVĚR

Bylo ukázáno, že metoda mikroizolace DNA pomocí magnetických mikročástic z potravin s obsahem rostlinného materiálu je vhodná pro analýzu testovaných vzorků potravin. Spektrofotometricky bylo zjištěno, že DNA i když obsahovala kontaminující příměsy se amplifikovala v PCR. U některých potravinových výrobků se neamplifikovala DNA s primery F_18S a R_5.8S (amplikony o délce 700 bp, protože pravděpodobně v důsledku technologické zpracování byla izolována v degradované formě). U těchto výrobků se podařilo i amplifikovat kratší úsek dlouhý 220 bp pomocí primerů F_26S a R_26S.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] COSTA, Joana, Isabel MAFRA a M. Beatriz P.P. OLIVEIRA. Advances in vegetable oil authentication by DNA-based markers. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2012, 26(1), 43-55 [cit. 2018-04-15]. DOI: 10.1016/j.tifs.2012.01.009. ISSN 09242244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224412000283>
- [2] DANEZIS, Georgios P., Aristidis S. TSAGKARIS, Federica CAMIN, Vladimir BRUSIC a Constantinos A. GEORGIU. Food authentication: Techniques, trends & emerging approaches. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2016, 85, 123-132 [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.1016/j.trac.2016.02.026. ISSN 01659936. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993615301291>
- [3] ORTEA, Ignacio, Gavin O'CONNOR a Alain MAQUET. Review on proteomics for food authentication. *Journal of Proteomics* [online]. 2016, 147, 212-225 [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.1016/j.jprot.2016.06.033. ISSN 18743919. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874391916302792>
- [4] GIMÉNEZ, Maria J., Fernando PISTÓN, Antonio MARTÍN a Sergio G. ATIENZA. Application of real-time PCR on the development of molecular markers and to evaluate critical aspects for olive oil authentication. *Food Chemistry* [online]. 2010, 118(2), 482-487 [cit. 2018-03-10]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.05.012. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814609006414>
- [5] WU, Yajun, Hailiang ZHANG, Jianxun HAN, Bin WANG, Wei WANG, Xingrong JU a Ying CHEN. PCR-CE-SSCP applied to detect cheap oil blended in olive oil. *European Food Research and Technology* [online]. 2011, 233(2), 313-324 [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1007/s00217-011-1520-y. ISSN 1438-2377. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-011-1520-y>
- [6] SCHÖRINGHUMER, Kerstin a Margit CICHNA-MARKL. Development of a Real-Time PCR Method To Detect Potentially Allergenic Sesame (*Sesamum indicum*) in Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2007, 55(26), 10540-10547 [cit. 2018-05-03]. DOI: 10.1021/jf0719407. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0719407>
- [7] GRYSO, Nicolas. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2010, 396(6), 2003-2022 [cit. 2018-04-06]. DOI: 10.1007/s00216-009-3343-2. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-009-3343-2>
- [8] MORISSET, Dany, Dejan ŠTEBIH, Mojca MILAVEC, Kristina GRUDEN, Jana ŽEL a Joshua L. HEAZLEWOOD. Quantitative Analysis of Food and Feed Samples with Droplet Digital PCR. *PLoS ONE* [online]. 2013, 8(5), e62583- [cit. 2018-03-11]. DOI: 10.1371/journal.pone.0062583. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0062583>

- [9] ABBAS, Ouissam, Manuela ZADRAVEC, Vincent BAETEN, et al. Analytical methods used for the authentication of food of animal origin. *Food Chemistry* [online]. 2018, 246, 6-17 [cit. 2018-04-15]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.11.007. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814617318095>
- [10] VAŇHA, J., A. HINKOVÁ, M. SLUKOVÁ a F. KVASNIČKA. Detection of plant raw materials in meat products by HPLC. *Czech Journal of Food Sciences* [online]. 2018, 27(No. 4), 234-239 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.17221/205/2008-CJFS. ISSN 12121800. Dostupné z: <http://www.agriculturejournals.cz/web/cjfs.htm?volume=27&firstPage=234&type=published> Article
- [11] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- [12] KRÁLOVÁ, Blanka. *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 80-7080-449-1.
- [13] RUML, Tomáš, Michaela RUMLOVÁ a Václav PAČES. *Genové inženýrství*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 80-7080-499-8.
- [14] CLARK, Stuart A. *Rapid detection assays for food and water*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, c2001. Special publication (Royal Chemical Society (Great Britain)), no. 272. ISBN 0-85404-779-4.
- [15] KHANUJA, Suman P. S., Ajit K. SHASANY, M. P. DAROKAR a Sushil KUMAR. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1999, roč. 17, č. 1, s. 74-74. ISSN 07359640. DOI: 10.1023/A:1007528101452. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1007528101452>
- [16]. SAHU, S. K. M., THANGARAJ, M., KATHIRESAN, K.. DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. *ISRN Molecular Biology*. [online]. 2012, 2012, 1-6 [cit. 2018-03-10]. DOI: 10.5402/2012/205049. ISSN 2090-7907. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/archive/2012/205049/>
- [17] WARUDE, Dnyaneshwar, Preeti CHAVAN, Kalpana JOSHI a Bhushan PATWARDHAN. DNA isolation from fresh, dry plant samples with highly acidic tissue extracts. *Plant Molecular Biology Reporter*. [online]. 2003, 21(4), 467-467 [cit. 2018-03-03]. ISSN 0735-9640. DOI: 10.1007/BF02772600. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02772600>
- [18] A. Dehestani a S.K. Kazemi Tabar . A Rapid Efficient Method for DNA Isolation from Plants with High Levels of Secondary Metabolites. *Asian Journal of Plant Sciences* [online]. 2007, 6(6), 977-981 [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.3923/ajps.2007.977.981. ISSN 16823974. Dostupné z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=ajps.2007.977.981>
- [19] ZHANG, Lingling, Bo WANG, Lei PAN a Junhua PENG. Recycling isolation of plant DNA, a novel method. *Journal of Genetics and Genomics*. [online]. 2013, 40(1), 45-54 [cit.

2018-03-03]. ISSN 16738527. DOI: 10.1016/j.jgg.2012.10.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1673852712001920>

[20] DEMEKE, Tigst a G. Ronald JENKINS. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2010, 396(6), 1977-1990 [cit. 2018-03-18]. DOI: 10.1007/s00216-009-3150-9. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-009-3150-9>

[21] VARMA, Astha, Harish PADH a Neeta SHRIVASTAVA. Plant genomic DNA isolation: An art or a science. *Biotechnology Journal* [online]. 2007, 2(3), 386-392 [cit. 2018-03-18]. DOI: 10.1002/biot.200600195. ISSN 18606768. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/biot.200600195>

[22] BORLIDO, L., A.M. AZEVEDO, A.C.A. ROQUE a M.R. AIRES-BARROS. Magnetic separations in biotechnology. *Biotechnology Advances*[online]. 2013, 31(8), 1374-1385 [cit. 2018-04-16]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.05.009. ISSN 07349750. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975013000906>

[23] HE, Jincan, Meiyong HUANG, Dongmei WANG, Zhuomin ZHANG a Gongke LI. Magnetic separation techniques in sample preparation for biological analysis: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2014, 101, 84-101 [cit. 2018-04-16]. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.04.017. ISSN 07317085. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708514002088>

[24] YAVUZ, Cafer T., Arjun PRAKASH, J.T. MAYO a Vicki L. COLVIN. Magnetic separations: From steel plants to biotechnology. *Chemical Engineering Science* [online]. 2009, 64(10), 2510-2521 [cit. 2018-04-16]. DOI: 10.1016/j.ces.2008.11.018. ISSN 00092509. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009250908006477>

[25] PEČOVÁ, M., L. ZAJONCOVÁ, K. POLÁKOVÁ, J. ČUDA, M. ŠAFAŘÍKOVÁ, M. ŠEBELA a I. ŠAFAŘÍK. Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich v biochemii a biotechnologii. *Chemické Listy*. 2011, roč. 105, č. 7, s. 524-530.

[26] HORÁK, D. BENEDYK, N. Magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres prepared by dispersion polymerization in the presence of electrostatically stabilized ferrofluids. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. [online]. 2004, 42(22), 5827-5837 [cit. 2018-03-03]. ISSN 0887-624x. DOI: 10.1002/pola.20406. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pola.20406>

[27] AGUILAR-ARTEAGA, K., J. A. RODRIGUEZ a E. BARRADO. Magnetic solids in analytical chemistry: A review. *Analytica Chimica Acta*. [online]. 2010, 674(2), 157-165 [cit. 2018-03-07]. ISSN 00032670. DOI: 10.1016/j.aca.2010.06.043. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267010008366>

[28] RITTICH, Bohuslav a Alena ŠPANOVÁ. SPE and purification of DNA using magnetic particles. *Journal of Separation Science* [online]. 2013, 36(15), 2472-2485 [cit. 2018-04-02].

DOI: 10.1002/jssc.201300331. ISSN 16159306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201300331>

[29] BERGEMANN, C., D. MÜLLER-SCHULTE, J. OSTER, L. BRASSARD a A. S LÜBBE. Magnetic ion-exchange nano- and microparticles for medical, biochemical and molecular biological applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* [online]. 1999, 194(1-3), 45-52 [cit. 2018-03-03]. DOI: 10.1016/S0304-8853(98)00554-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030488539800554X>

[30] SINDEN, R.R. *DNA structure and function*. San Diego: Academic Press, c1994. ISBN 0126457506.

[31] ZVÁROVÁ, J. a I. MAZURA. *Metody molekulární biologie a bioinformatiky*. Praha: Karolinum, 2012. Biomedicínská informatika. ISBN 9788024621500.

[32] ŠPANOVÁ, A. a B. RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. ISBN 9788021440043.

[33] LEE, Pei Yun, John COSTUMBRADO, Chih-Yuan HSU a Yong Hoon KIM. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2012, (62), - [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.3791/3923. ISSN 1940-087X. Dostupné z: <http://www.jove.com/video/3923/>

[34] COSTA, Leonardo Severo da, Lia Rejane Silveira REINIGER, Valdir Marcos STEFENON, Berta Maria HEINZMANN a Adriel Dos Santos OLIVEIRA. Comparative analysis of five DNA isolation protocols and three drying methods for leaves samples of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. *Semina: Ciências Agrárias* [online]. 2016, 37(3), 1177- [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.5433/1679-0359.2016v37n3p1177. ISSN 1679-0359. Dostupné z: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/21305>

[35] DAVALIEVA, Katarina a Georgi D. EFREMOV. INFLUENCE OF SALTS AND PCR INHIBITORS ON THE AMPLIFICATION CAPACITY OF THREE THERMOSTABLE DNA POLYMERASES. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering* [online]. 2010, 29(No. 1), -57–62 [cit. 2018-04-25]. ISSN 857 – 5552.

[36] MENDES, G.P., P.S. VIEIRA, S. LANCEROS-MÉNDEZ, L.D. KLUSKENS a M. MOTA. Transformation of *Escherichia coli* JM109 using pUC19 by the Yoshida effect. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2015, 115, 1-5 [cit. 2016-05-11]. DOI: 10.1016/j.mimet.2015.05.012. ISSN 01677012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701215001517>

[37] SMITH, Donna S., Philip W. MAXWELL a Solke H. DE BOER. Comparison of Several Methods for the Extraction of DNA from Potatoes and Potato-Derived Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2005, 53(26), 9848-9859 [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.1021/jf051201v. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf051201v>

- [38] Weighardt, F. (2007). GMO quantification in processed food and feed. *Nature Biotechnology* [online]. 2007, 25(11), 1213-1214 [cit. 2018-03-10]. doi: 10.1038/nbt1107-1213c
- [39] LIU, Yang, Xiaoyue WANG, Lili WANG, Xiaochen CHEN, Xiaohui PANG a Jianping HAN. A Nucleotide Signature for the Identification of American Ginseng and Its Products. *Frontiers in Plant Science* [online]. 2016, 7, - [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.3389/fpls.2016.00319. ISSN 1664-462X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016.00319/abstract>
- [40] CHEN, Ying, Yuan WANG, Yiqiang GE a Baoliang XU. Degradation of Endogenous and Exogenous Genes of Roundup-Ready Soybean during Food Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2005, 53(26), 10239-10243 [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.1021/jf0519820. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0519820>
- [41] TROJÁNEK, Zdeněk, Aleš KOVAŘÍK, Alena ŠPANOVÁ, Kristýna MAROŠIOVÁ, Daniel HORÁK a Bohuslav RITTICH. Application of magnetic polymethacrylate-based microspheres for the isolation of DNA from raw vegetables and processed foods of plant origin. *Journal of Food Processing and Preservation* [online]. 2018, 42(1), e13384- [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1111/jfpp.13384. ISSN 01458892. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jfpp.13384>
- [42] DIBERNARDO, G., S. DELGAUDIO, U. GALDERISI, A. CASCINO a M. CIPOLLARO. Comparative Evaluation of Different DNA Extraction Procedures from Food Samples. *Biotechnology Progress* [online]. 2007, 23(2), 297-301 [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.1021/bp060182m. ISSN 8756-7938. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1021/bp060182m>
- [43] HIRAMOTO, Kazuyuki, Tetsuta KATO a Kiyomi KIKUGAWA. Generation of DNA-breaking activity in the Maillard reaction of glucose-amino acid mixtures in a solid system. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* [online]. 1993, 285(2), 191-198 [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.1016/0027-5107(93)90106-P. ISSN 00275107. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002751079390106P>
- [44] ŞAKALAR, Ergün, M.Fatih ABASIYANIK, Emre BEKTIK a Annageldi TAYYROV. Effect of Heat Processing on DNA Quantification of Meat Species. *Journal of Food Science* [online]. 2012, 77(9), N40-N44 [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2012.02853.x. ISSN 00221147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2012.02853.x>
- [45] BAUER, Torsten, Philipp WELLER, Walter P. HAMMES a Christian HERTEL. The effect of processing parameters on DNA degradation in food. *European Food Research and Technology* [online]. 2003, 217(4), 338-343 [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.1007/s00217-003-0743-y. ISSN 1438-2377. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-003-0743-y>

- [46] SAKAMOTO, W. a T. TAKAMI. Nucleases in higher plants and their possible involvement in DNA degradation during leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* [online]. 2014, 65(14), 3835-3843 [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.1093/jxb/eru091. ISSN 0022-0957. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/eru091>
- [47] KOVARIK, A. Rapid Concerted Evolution of Nuclear Ribosomal DNA in Two Tragopogon Allopolyploids of Recent and Recurrent Origin. *Genetics* [online]. 2005, 169(2), 931-944 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1534/genetics.104.032839. ISSN 0016-6731. Dostupné z: <http://www.genetics.org/cgi/doi/10.1534/genetics.104.032839>
- [48] YOONG LIM, K., A. KOVARIK, R. MATÝĀSEK, M. BEZDĚEK, C.P. LICHTENSTEIN a A.R. LEITCH. Gene conversion of ribosomal DNA in *Nicotiana tabacum* is associated with undermethylated, decondensed and probably active gene units. *Chromosoma* [online]. 2000, 109(3), 161-172 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1007/s004120050424. ISSN 0009-5915. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s004120050424>
- [49] QIAGEN. www.qiagen.com [online]. [cit. 2018-03-21]. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=4d546584-2550-4806-a663-995fef1431d9&lang=en>
- [50] DI SOTTO, Antonella, Martina VECCHIATO, Lorena ABETE, et al. Capsicum annum L. var. Cornetto di Pontecorvo PDO: Polyphenolic profile and in vitro biological activities. *Journal of Functional Foods* [online]. 2018, 40, 679-691 [cit. 2018-04-17]. DOI: 10.1016/j.jff.2017.11.041. ISSN 17564646. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464617307132>
- [51] DIAS, Germana Bueno, Valdirene Moreira GOMES, Umberto Zottich PEREIRA, et al. Isolation, Characterization and Antifungal Activity of Proteinase Inhibitors from *Capsicum chinense* Jacq. Seeds. *The Protein Journal* [online]. 2013, 32(1), 15-26 [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.1007/s10930-012-9456-z. ISSN 1572-3887. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10930-012-9456-z>
- [52] GAT, Yogesh a Laxmi ANANTHANARAYAN. Use of paprika oily extract as pre-extrusion colouring of rice extrudates: impact of processing and storage on colour stability. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2016, 53(6), 2887-2894 [cit. 2018-04-17]. DOI: 10.1007/s13197-016-2271-3. ISSN 0022-1155. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-016-2271-3>
- [53] TORMO, M.A., J.E. CAMPILLO, J. VIÑA, J. GÓMEZ-ENCINAS, C. BORRÁS, M.D. TORRES a C. CAMPILLO. The mechanism of the antioxidant effect of smoked paprika from La Vera, Spain. *CyTA - Journal of Food* [online]. 2013, 11(2), 114-118 [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.1080/19476337.2012.700952. ISSN 1947-6337. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19476337.2012.700952>
- [54] FASANO, Evelina, Iria YEBRA-PIMENTEL, Elena MARTÍNEZ-CARBALLO a Jesús SIMAL-GÁNDARA. Profiling, distribution and levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in traditional smoked plant and animal foods. *Food Control* [online]. 2016, 59,

581-590 [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.06.036. ISSN 09567135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713515300657>

[55] RAJAMURUGAN, R., N. SELVAGANABATHY, S. KUMARAVEL, CH. RAMAMURTHY, V. SUJATHA a C. THIRUNAVUKKARASU. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Brassica nigra* (L.) Koch. leaf extract. *Natural Product Research* [online]. 2012, 26(23), 2208-2210 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1080/14786419.2011.637215. ISSN 1478-6419. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786419.2011.637215>

[56] GU, Fenglin, Lehe TAN, Huasong WU, Yiming FANG a Qinghuang WANG. Analysis of the blackening of green pepper (*Piper nigrum* Linnaeus) berries. *Food Chemistry* [online]. 2013, 138(2-3), 797-801 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.11.033. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814612017608>

[57] ASTANOV, S., M. Z. SHARIPOV, A. R. FAIZULLAEV, E. N. KURTALIEV a N. NIZOMOV. Thermal Destruction of Riboflavin in Different Aggregate States. *Journal of Applied Spectroscopy* [online]. 2014, 81(1), 37-42 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1007/s10812-014-9883-z. ISSN 0021-9037. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10812-014-9883-z>

[58] ANOUAR, El Hassane, Johannes GIER SCHNER, Jean-Luc DUROUX a Patrick TROUILLAS. UV/Visible spectra of natural polyphenols: A time-dependent density functional theory study. *Food Chemistry* [online]. 2012, 131(1), 79-89 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.08.034. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611011666>

[59] Guidelines for PCR Optimization with Taq DNA Polymerase. New England Biolabs [online]. [cit. 2018-04-20]. Dostupné z: <https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/guidelines-for-pcr-optimization-with-taq-dna-polymerase>

[60] GÖREN, Ahmet C., Gökhan BILSEL, Adnan ŞİMŞEK, Mine BILSEL, Fatma AKÇADAĞ, Kevser TOPAL a Hasan OZGEN. HPLC and LC-MS/MS methods for determination of sodium benzoate and potassium sorbate in food and beverages: Performances of local accredited laboratories via proficiency tests in Turkey. *Food Chemistry* [online]. 2015, 175, 273-279 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.11.094. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614018238>

[61] GAŇOVÁ, M. *Využití magnetických částic pro izolaci DNA z vybraných druhů koření*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 105 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Aleš Kovařík, CSc.

[62] MOLNÁR, Helga, Ildikó BATA-VIDÁCS, Erzsébet BAKA, Zsuzsanna CSERHALMI, Sándor FERENCZI, Rita TÖMÖSKÖZI-FARKAS, Nóra ADÁNYI a András SZÉKÁCS. The effect of different decontamination methods on the microbial load, bioactive components, aroma and colour of spice paprika. *Food Control* [online]. 2018, 83, 131-140 [cit. 2018-04-

22]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.04.032. ISSN 09567135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713517302190>

[63] SANTOS, L., S. MARÍN, V. SANCHIS a A.J. RAMOS. In vitro effect of some fungicides on growth and aflatoxins production by *Aspergillus flavus* isolated from Capsicum powder. *Food Additives & Contaminants: Part A* [online]. 2011, 28(1), 98-106 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1080/19440049.2010.529622. ISSN 1944-0049. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19440049.2010.529622>

9. SEZNAM ZKRATEK

bp	pár bází
CTAB	cetiltrimetylamonium bromid
Dn	průměr magnetické částice
dNTP	2'-deoxynukleozid-5'-trifosfát
Dw	průměrná váha magnetické mikročástice
EDTA	kyselina etyléndiamíntetraoctová
IPTG	isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid
PCR	polymerasová řetězová reakce
PGMA	poly(glycidyl methakrylát)
RAPD	náhodná amplifikace polymorfní DNA
SCAR	amplifikovaná oblast charakterizovaná sekvencí
Tm	teplota tání
X-gal	5-bromo-4-chloro-indoyl- β -D galaktopyranosid

10. SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Abstrakt na konferenci Chemie je život 2018

IZOLACE DNA Z VYBRANÝCH ZELENINOVÝCH VÝROBKŮ (PAPRIKA)

Bc. Sabína Góghová

RNDr. Aleš Kovařík, CSc., doc. RNDr. Alena Španová, CSc., doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.

*Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií
Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Česká Republika
xcgoghova@fch.vut.cz*

Izolace DNA z komplexních vzorků potravin rostlinného původu je často obtížná. Rostlinná pletiva jsou bohatá na proteiny, polysacharidy a sekundární metabolity, což jsou zdroje interferujících látek, které mohou být izolovány spolu s DNA. Technologické zpracování potravin může dále komplikovat izolaci DNA v kvalitě vhodné pro další práci. Práce se zabývala izolací DNA v kvalitě pro PCR ze zeleninových výrobků obsahujících papriku (*Capsicum annum*). DNA byla izolována z pěti vzorků mletých sušených paprik a z pěti výrobků obsahujících papriku. Vzorky byly homogenizovány v lyzačním pufru s CTAB a poté byla DNA extrahována do vodné fáze přidávkem stejného objemu směsi chloroform-oktanol (24:1). Z homogenátů byla izolována DNA pomocí magnetických částic PGMA s karboxylovými funkčními skupinami. Kvalita a kvantita DNA byla stanovena spektrofotometricky a ověřena metodou PCR s primery specifickými pro rostlinnou rDNA. Kvalita izolované DNA se lišila v závislosti na technologickém zpracování výrobků. DNA izolovaná z uzené mleté papriky a z tepelně ošetřených výrobků (s výjimkou jednoho výrobku) byla degradovaná a amplifikovala se jen s primery F_26S a R_26S (produkt PCR o velikosti 220 bp) na rozdíl od primerů F_18S a R_5.8S (produkt PCR 700 bp). DNA izolované z dalších potravinových výrobků se amplifikovaly s primery F_18S a R_5.8S (produkt PCR 700 bp). PCR produkt z jedné mleté papriky (Žitavská paprika) byl klonován a sekvencován. Porovnáním sekvencí s nukleotidovou databází GenBank bylo zjištěno, že některé klony skutečně odpovídají sekvencím *Capsicum annum*. Avšak vyskytly se i klony, jejichž sekvence neodpovídala paprice ani žádné sekvenci v databázi. Znamená to, že potravinové produkty pocházejí z jedné suroviny mohou obsahovat DNA z více biologických druhů.