



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# STANOVENÍ AUTENTICITY POTRAVIN ROSTLINNÉHO PŮVODU POMOCÍ MOLEKULÁRNÍCH METOD

DETERMINATION OF AUTHENTICITY OF PLANT FOODS BY MOLECULAR TECHNIQUES

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Anna Plášková

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Andrea Němcová, Ph.D.

BRNO 2020

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1409/2019 Akademický rok: 2019/20  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Anna Plášková**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Andrea Němcová, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Stanovení autenticity potravin rostlinného původu pomocí molekulárních metod

### Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) izolace a charakterizace DNA
- 2) amplifikace rostlinné DNA s využitím specifických primerů
- 3) identifikace druhu rostlinné DNA
- 4) srovnání identifikace pomocí jiných metod

### Termín odevzdání diplomové práce: 31.7.2020:

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

-----  
Bc. Anna Plášková

student(ka)

-----  
Ing. Andrea Němcová, Ph.D.

vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.

Děkan

## **ABSTRAKT**

Předložená diplomová práce je zaměřena na stanovení autenticity ovocných výživ určených pro ranou dětskou výživu pomocí molekulárních metod. V experimentální části byla provedena pomocí kitu izolace rostlinné DNA z ovoce (jahoda, meruňka, malina, jablko) a z šesti komerčních výrobků pro děti. Izolovaná DNA byla charakterizována a ověřena metodou PCR s primery specifickými pro rostlinnou rDNA (ITS2). Byly vybrány specifické páry primerů pro amplifikaci DNA z jednoho ovocného druhu. Specifičnost primeru byla hodnocena u čtyřech ovocných druhů. Ke stanovení citlivosti testu multiplex PCR byla použita směs ovocného pyré ze dvou plodů. Aby byla ověřena použitelnost navržené multiplex PCR, bylo analyzováno pomocí této metody šest ovocných komerčních výrobků. Předkládaná metodika detekce ovoce pomocí qPCR a multiplex-qPCR (duplex) zahrnuje takové metodické přístupy, které umožňují diagnostikovat dva druhy ovoce (jahoda-malina, meruňka-jablko) v jedné reakci, čímž snižují ekonomické i časové nároky potřebné pro detekci.

## **ABSTRACT**

The aim of presented diploma thesis was to determination of authenticity of fruit baby foods for early infant feeding using molecular methods. In the experimental part, isolation kit was used for isolation of plant DNA from fruits (strawberry, apricot, raspberry, apple) and from six commercial fruit products for children. Isolated DNA was characterized and verified using PCR methods with primers specific for plant rDNA (ITS2). Specific primer pairs were designed to amplify DNA for the detection of one fruit species. Primer specificity was assessed with four fruit species. A mixture of fruit puree from the two fruits was used to determine the sensitivity of the multiplex PCR assay. Six commercial fruit products were evaluated to verify the applicability of the multiplex PCR assay. The methodology of molecular detection of fruit DNA by qPCR and multiplex qPCR (duplex) includes approaches, which enable to detect two fruits (strawberry-raspberry, apricot-apple) in one reaction and thus reduces time and money requirements.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Autenticita potravin, detekce falšování potravin, duplex PCR, HPLC, polyfenoly, flavonoidy, jahoda, meruňka, malina, jablko, ovocná dětská výživa.

## **KEYWORDS**

Food Authenticity and Detection of Food Adulteration, duplex PCR, HPLC, polyphenols, flavonoids, strawberry, apricot, raspberry, apple, fruit baby food.

PLÁŠKOVÁ, Anna. *Stanovení autenticity potravin rostlinného původu pomocí molekulárních metod*. Brno, 2020. Diplomová práce. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123920>. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Andrea Němcová.

#### 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.

.....  
podpis studenta

#### PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala své vedoucí diplomové práce paní Ing. Andreji Němcové Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a čas, který mi věnovala během konzultací k mé diplomové práci. Dále bych chtěla poděkovat svým konzultantkám Ing. Lence Fialové a prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. a také Ing. Martinovi Szotkowskému za jejich rady, ochotu a pomoc při zpracování experimentální části. Velké poděkování si také zaslouží moji blízcí, kteří mě během diplomové práce soustavně podporovali a byli mi oporou.

## OBSAH

1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 Dětské výživy	8
2.2 Ovoce vhodné pro výrobu dětských výživ	8
2.2.1 Jahodník velkoplodý ( <i>Fragaria × ananassa</i> )	9
2.2.2 Meruňka obecná ( <i>Prunus armeniaca</i> )	10
2.2.3 Ostružiník maliník ( <i>Rubus idaeus</i> )	10
2.2.4 Jabloň ( <i>Mallus sp.</i> )	10
2.2.5 Nutriční hodnoty ovoce	11
2.2.6 Výroba dětské výživy	12
2.3 Autenticita potravin	12
2.4 Analýza potravin pomocí biologických metod založených na analýze DNA	13
2.4.1 Homogenizace vzorku	14
2.4.2 Lýze buněk	14
2.4.3 Extrakce a purifikace DNA	15
2.4.4 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA	15
2.4.5 Amplifikace DNA in vitro pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR)	16
2.4.5.1 Komponenty PCR	16
2.4.5.2 Princip PCR	17
2.4.5.3 Inhibitory a enhancery PCR	18
2.4.5.4 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)	19
2.4.5.5 Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM)	19
2.4.6 Horizontální gelová elektroforéza	20
2.5 Analýza potravin pomocí instrumentálních technik	20
2.5.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	20
2.5.2 Folin-Ciocalteuova metoda (FCM)	21
3 CÍLE PRÁCE	22
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
4.1 Materiál	23
4.1.1 Rostlinný materiál	23
4.1.2 Chemikálie	24
4.1.3 Pomůcky	26
4.2 Metody	27
4.2.1 Příprava vzorků pro analýzu	27
4.2.2 „Brief protocol“ z kitu	27
4.2.3 Spektrofotometrické stanovení rostlinné DNA	28
4.2.4 Příprava směsi pro qPCR a multiplex qPCR	28
4.2.5 Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR	29
4.2.6 Ověření amplifikovatelnosti izolované DNA pomocí primerů specifických pro ITS2 region rostlin	30
4.2.7 Výběr vhodných primerů specifických pro jahodu	30
4.2.8 Výběr vhodného jahodového primeru a optimalizace amplifikace DNA	31
4.2.9 Výběr vhodných specifických primerů pro meruňkovou DNA	31
4.2.10 Výběr vhodné koncentrace meruňkového primeru AGS6	31
4.2.11 Výběr vhodných specifických primerů pro malinovou DNA	31
4.2.12 Výběr vhodných specifických primerů pro jablkovou DNA	32
4.2.13 Test specifity zvolených specifických primerů - APX1B a AGS6	32
4.2.14 Test specifity zvolených specifických primerů - Ri1 a RiACO1	33
4.2.15 Test specifity zvoleného specifického primerů FT MDP	33

4.2.16 Multiplex PCR	33
4.2.17 Vysokorozlišovací analýza křivek tání (PCR-HRM)	33
4.2.18 Charakterizace modelových směsí a komerčních vzorků	34
4.2.18.1 Stanovení obsahu sušiny	34
4.2.18.2 Analýza celkových fenolických látek	34
4.2.18.3 Analýza celkových flavonoidů	35
4.2.19 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	35
4.3 Výsledky a diskuze	37
4.3.1 Koncentrace a čistota izolované rostlinné DNA	37
4.3.2 Ověření amplifikovatelnosti izolované DNA pomocí primerů specifických pro ITS2 region rostlin	39
4.3.2.1 Ověření amplifikovatelnosti izolované DNA z ovoce	39
4.3.2.2 Ověření amplifikovatelnosti izolované DNA z modelových a komerčních vzorků	41
4.3.3 Výběr vhodných specifických primerů pro jahodovou DNA	45
4.3.4 Výběr vhodného jahodového primeru a optimalizace amplifikace DNA	47
4.3.5 Výběr vhodných specifických primerů pro meruňkovou DNA	50
4.3.6 Výběr vhodných specifických primerů pro malinovou DNA	52
4.3.7 Výběr vhodných specifických primerů pro jablkovou DNA	54
4.3.8 Testy specifcity vybraných primerů	56
4.3.8.1 Test specifcity jahodového primeru APX1B	56
4.3.8.2 Test specifcity meruňkového primeru AGS6	58
4.3.8.3 Test specifcity malinových primerů Ri1 a RiACO1	59
4.3.8.4 Test specifcity jablečného primeru FT MDP	61
4.3.9 Multiplex PCR pro jahodovou a malinovou DNA	62
4.3.10 Multiplex PCR pro meruňkovou a jablkovou DNA	65
4.3.11 Multiplex PCR pro modelové směsi a komerční vzorky	67
4.3.12 Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM)	71
4.3.13 Vysokorozlišovací analýza křivek tání pro modelové a komerční směsi	73
4.3.14 Analýza modelových směsí a komerčních vzorků pomocí instrumentálních technik	79
4.3.14.1 Stanovení obsahu sušiny	79
4.3.14.2 Analýza celkových fenolických látek	80
4.3.14.3 Analýza celkových flavonoidů	84
4.3.14.4 Stanovení fenolických látek pomocí vysokorozlišovací kapalinové chromatografie	85
5 SHRNU TÍ VÝSLEDKŮ A ZÁVĚR	89
6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	100
7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ	100
8 SEZNAM PŘÍLOH	100
9 PŘÍLOHY	101

# 1 ÚVOD

Problematika falšování surovin, které vstupují do konečných potravinářských výrobků je tady od dob, kdy tyto produkty začaly být vyráběny za účelem prodeje. Z historických textů jsou známy případy falšování potravin i tresty, které za takové činy hrozily. Za zakladatele analytických postupů detekce falšování potravin je považován britský chemik německého původu Fridrich Accum. Ten v roce 1820 publikoval dílo s názvem Pojednání o falšování potravin a kulinářských otravách. Hlavním problémem jsou především falšované výrobky, u kterých nejde jen o šizení spotřebitele, ale které by mohly ohrozit jeho zdraví a život. Známým příkladem je třeba metanolová aféra, která u nás proběhla v roce 2012. Proto je nutné zajistit kontrolu kvality potravin, díky které bude ověřena bezpečnost a autentičnost dostupných produktů, a také správně informovat spotřebitele o složení a původu dostupných produktů [1], [2].

V prvních letech života dítěte je velmi důležitá kvalitní a vyvážená strava, která ovlivňuje jeho fyzický i psychický růst a vývoj. Počáteční a pokračovací kojenecká výživa a výživa malých dětí spadá do potravin určených pro zvláštní výživu. Jejichž složení je velmi přísně regulováno a sledováno státními autoritami. Pro dítě od 6 měsíců do 3 let je jídelníček dosti omezený, a proto může být například ovocné pyré dobrým zdrojem energie, základních živin, vitaminů, minerálů a vlákniny. Potravinové výrobky na rostlinné bázi jsou pro dítě snadno stravitelné a mimo jiné nabízejí vysoké množství živin [3], [4].

Komerční ovocná dětská výživa je konzervovaný produkt, jehož základní složkou je ovocné pyré z jednoho nebo více druhů ovoce, voda a cukr. Dalšími přísadami mohou být zahuš'ovadla a antioxidanty. Mezi základní faktory ovlivňující výživovou hodnotu dětských výživ patří: množství, typ a kvalita použitého ovoce a podmínky jeho zpracování. Tepelným zpracováním jako je například sterilizace, se snižuje obsah karotenoidů a vitaminů rozpustných ve vodě. Ovoce je nejdražší surovinou ovocné přesnídávky, a proto je nejpohodlnější pro falšování. Může být částečně nahrazeno buď levnějšími ingrediencemi, jiným druhem levnějšího ovoce, cukrem, jiným rostlinným materiálem, nebo přidáním více umělých aditiv. Pro detekci těchto typů potravinového falšování už existují zavedené metody, jako jsou: vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) nebo chemometrické metody. Zajímavou alternativou k předchozím metodám představují molekulární metody, kam patří PCR, umožňující kvantitativní i kvalitativní analýzu s vysokou specificitou. Díky nim se dá odlišit neúmyslná kontaminace od pravděpodobně úmyslného falšování [2], [4], [5], [6].

Cílem této práce byl výběr vhodných druhově specifických primerů pro jahodu, malinu, jablko a meruňku. Dalším cílem bylo zavést multiplex qPCR-HRM, umožňující rychlý a jednoduchý důkaz použitých druhů ovoce v dětských přesnídávkách. Dále byla porovnána účinnost molekulárně biologické metody a instrumentální metody při stanovení autenticity potravin. Nakonec zde byla snaha o vytvoření levnější molekulárně biologické metody, než je multiplex PCR s fluorescenčními sondami.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Dětské výživy

Jak už bylo zmíněno v úvodu, dětské ovocné výživy se skládají z ovoce, cukru, vody a dalších libovolných přísad. Existují rozdíly mezi jednotlivými dětskými výživami, kdy některé obsahují pouze ovocné pyré a jiné se liší významným množstvím cukru, vody a škrobem, který slouží jako plnivo. Nutriční hodnota ovocných výživ závisí na složení, tedy na typu a množství čerstvé suroviny, ze které jsou vyrobeny. Nutriční hodnotu také ovlivňují podmínky zpracování. K faktorům, které mohou snížit obsah živin v produktu, patří oxidace, přítomnost kontaminantů (kovy nebo migrující molekuly z obalu) nebo neenzymatické hnědnutí. Tyto reakce jsou obvykle ovlivněny zahříváním. Při výrobě dětské výživy může dojít k poškození ovoce během blanšírování, varu, pasterizace, sterilizace, ale také kvůli špatným skladovacím podmínkám [4].

Kromě energie, která je získána z cukrů a polysacharidů, obsahuje vlákninu, vitamin C, polyfenoly a další zdroje antioxidantů. U komerčních dětských výživ je dobré se vyvarovat těch s přidaným cukrem, protože chuť a preference, které se vytvoří u kojenců, ovlivní preference potravin v dospělosti [4], [7].

Dětské výživy mohou být také označovány za dětské příkrmy nebo přesnídávky. Řadíme je do počáteční a pokračovací kojenecké výživy a do výživy malých dětí. Tyto kategorie spadají pod vyhlášku č. 54/2004 Sb. o potravinách určených pro zvláštní výživu a o způsobu jejich využití. Podle ní musí splňovat různé požadavky jako: maximální rezidua pesticidů, mikrobiologické požadavky, obsah pouze schválených aditiv a správné značení výrobku. V dětských výživách nejsou povoleny žádné chemické konzervační látky, umělá barviva a příchutě [3], [4].

Kojenci nedokážou trávit většinu jídla do 4.-6. měsíce. Ideální doba na začátek příkrmování pevnou stravou je proto okolo ukončeného 6. měsíce u plně kojených kojenců (u kojenců krmených umělým mlékem od ukončeného 4. měsíce). Jelikož některé příkrmy mají pevnou konzistenci, tak kromě věku dítěte se musí zohlednit i jeho dovednosti a dosažený vývoj. Dítě by mělo umět sedět na vysoké židli, otevřít ústa, když je krmíte a toto jídlo poté i spolknout. První příkrmy by měly být tekuté podobně jako mateřské mléko. Ovocné výživy se doporučuje zařazovat až po těch zeleninových kvůli tomu, aby dítěte neočekávalo, že každé jídlo bude chutnat sladce a poté zeleninu s méně výraznou chutí neodmítalo [7], [8].

Kojenci nemají schopnost účinně trávit fruktózu. Ovoce vhodná na začátek příkrmů jsou: jablko, banán, hruška, meruňka, broskev, bluma (švestka) a na později je třeba nechat jahody, maliny, citrusové plody a exotické ovoce. Ovoce s vysokým obsahem vlákniny je nutné dávkovat s rozvahou, protože může u dětí způsobovat průjem. Od jednoho roku věku mohou děti jíst čerstvé ovoce a také avokádo. [7], [8].

### 2.2 Ovoce vhodné pro výrobu dětských výživ

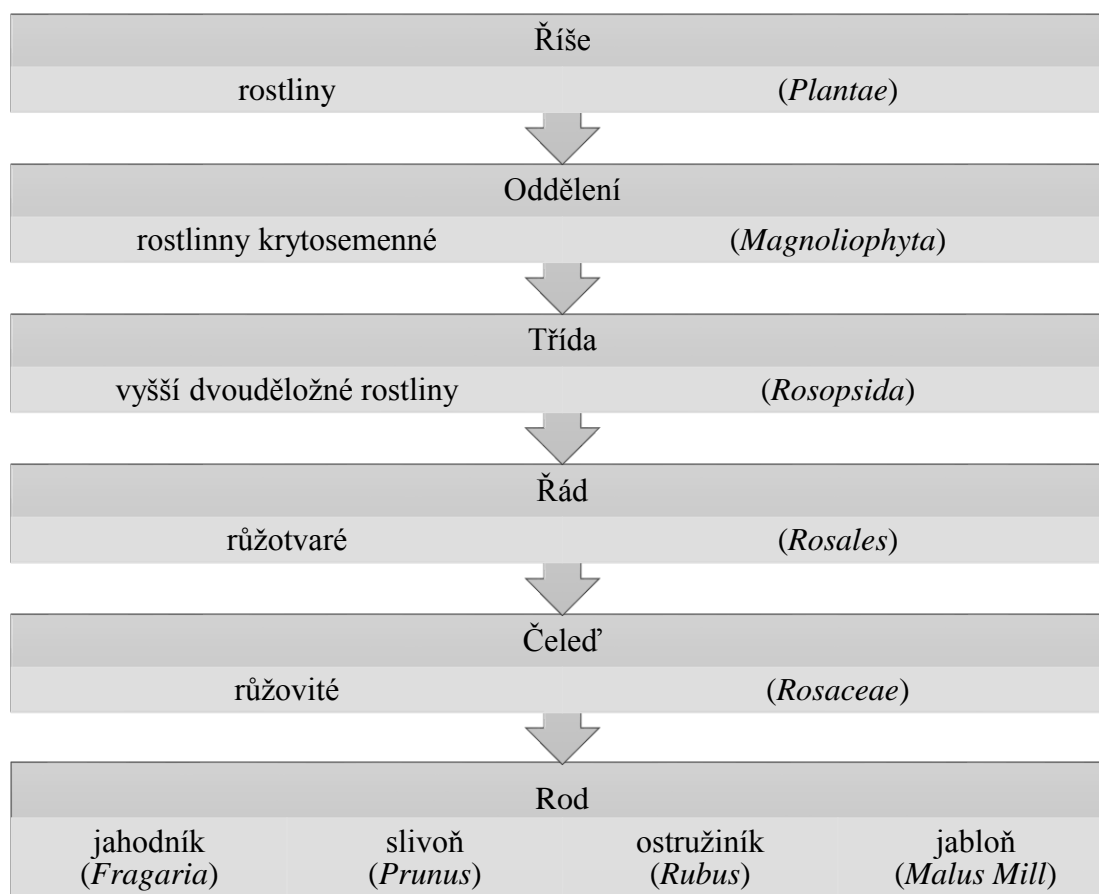
V předchozí kapitole bylo zmíněno ovoce, které je vhodné pro přípravu dětských výživ. Ovoce používané do dětských přesnídávek může být jablko, hruška, banán, meruňka, broskev, nektarinky, švestka, bluma, višně, třešeň, jahody, maliny, borůvky, mango, mandarinky, ostružina, černý rybíz, vinná réva, maracuja atd. Většina používaného ovoce, které roste u nás v mírném pásu, je řazena do čeledi růžovité, kterou si blíže rozebereme. Do této čeledi u nás rostoucího ovoce ale nezařazujeme brusnici borůvku, révu vinnou nebo rybíz černý.



Čeleď růžovité (*Rosaceae*) zahrnuje některé z nejznámějších okrasných a jedlých ovocných rostlin v mírném pásu. Obsahuje celkem čtyři podčeledi, a to: tavolníkové (*Spiraeoideae*), růžové (*Rosoideae*), mandloňovité (*Amygdaloideae*) a jabloňovité (*Maloideae*). Tyto podčeledi jsou složeny z více než 90 rodů a nachází se v nich asi 2500 druhů. Taxonomické rozdělení a čtyři blíže rozebrané rody jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 1). Zástupci z těchto uvedených rodů jsou blíže popsány v následujících podkapitolách [9], [10], [11].

Růžovité se vyskytují v severním mírném pásu, kam patří i Česká republika. Někteří zástupci této čeledi jsou potravinářské plodiny, kdy se využívají plody těchto rostlin. Patří sem např. hrušky, jablka, třešně, meruňky, jahody, maliny, mandle ale například i růže, které se pěstují jako okrasné rostliny. Jablka tvoří asi polovinu produkce ovocných stromů v mírném podnebí. [10], [11].

Tabulka 1 – Taxonomické rozdělení rostlin [9]



### 2.2.1 Jahodník velkoplodý (*Fragaria × ananassa*)

Jedná se o jeden z nepoužívanějších druhů ovoce na světě, ať už ve formě čerstvého ovoce, zpracovaného v produktech (dětská výživa) nebo jako potravinové doplňky. Nepravým plodem jahodníku je jahoda, což je souplodí nažek, nacházející se na zdužnatělém květním lůžku jahodníku [12], [13].

Moderně pěstovaná jahoda se velmi liší od divokých druhů například tím, že má mnohem větší ovoce. Jahodník velkoplodý je oktoploidní mezidruhový hybrid, který byl vyšlechtěn v 18. století a pravděpodobně vznikl přirozenou hybridizací mezi *F. virginiana L.* a *F. chiloensis Duch.* [11], [14].

Jahody obsahují velké množství vody a to až 90 %. Účinné látky jahodníku jsou třísloviny, kam patří ellagitaniny a oligomerní proanthokyanidiny, kyseliny jablečná a salicylová, deriváty kyseliny kávové, vitaminy (vitamin C, B3, B5), minerální látky (draslík, fosfor, vápník), stopy éterického oleje a flavonoidy. Mezi hlavní sloučeniny s antioxidačními vlastnostmi patří kyselina ellagová a některé flavonoidy (antokyany, proantokyany, katechin a isokatechin). Tyto sloučeniny dodávají plodům jahodníku typickou červenou barvu, chuť a slouží také jako antioxidant [15], [16], [17], [18].

### 2.2.2 Meruňka obecná (*Prunus armeniaca*)

Meruňka patří do rodu *Prunus* (slivoň), tento rod zahrnuje také třešně, broskve a švestky. Meruňky jsou dužnaté plody, které patří mezi jednoplodolistové peckovice. Pochází pravděpodobně z Číny a jsou pěstovány v mírnějším podnebí po celém světě. Většina světové produkce, což odpovídá více než 80 % je omezena na středomořské klima např. Turecko, Itálie, Irán, Španělsko atd. Meruňky vykazují antioxidační aktivitu žádoucí pro lidské zdraví, ale při jejich konzumaci je nutné brát v potaz, že semena meruňky obsahují kyanogenní glykosid amygdalin, u kterého hrozí otrava kyanovodíkem [13], [17], [19], [20].

Meruňková dužina obsahuje 72 až 92 % vody, je bohatá na polysacharidy (hlavně sacharosu), mastné kyseliny, deriváty sterolu, karotenoidy (karoteny), kyanogenní glykosidy, kyseliny, polyfenoly a těkavé látky. Dále je zdrojem vitaminů (provitamin A, vitaminy C a B) a minerálních látek (draslík, fosfor a vápník). Celkový obsah karotenoidů se pohybuje mezi 1,5 a 16,5 mg/100 g. Z fenolických látek jsou zastoupeny hlavně kyseliny chlorogenová, neochlorogenová, rutin, katechin a epikatechin [15], [19], [21], [20].

### 2.2.3 Ostružiník maliník (*Rubus idaeus*)

Maliny patří do rodu *Rubus*, kam jsou řazeny také ostružiny. Nepravým plodem ostružiníku jsou maliny a jedná se o souplodí peckovic [11], [13].

V listech maliníku se vyskytují jako účinné látky třísloviny, a to ellagitaniny a gallotaniny, vitamin C a flavonoidy. Maliny obsahují 84 % vody a další základní složky jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 2). Kromě toho se v plodech nachází vitaminy (vitaminy C, E a B3), minerální látky (draslík, fosfor), glykosidy barviv, ovocné kyseliny (např. jablečná, vinná, citrónová atd.) a asi 100 aromatických látek. Jsou také bohatým zdrojem fenolických sloučenin, kdy se celkový obsah fenolů v zralých malinách pohybuje od 1137 do 29 900 mg na kilogram čerstvých plodů vyjádřených jako ekvivalent kyseliny gallové. Nejvíce zastoupenými polyfenoly jsou antokyany, flavonoly a jejich konjugáty, ellagová kyselina a její deriváty [15], [17], [22].

Celkový obsah flavonoidů se pohybuje mezi 842 a 1034 mg na kilogram čerstvých plodů vyjádřené jako ekvivalent katechinu. Nejvíce zastoupenými flavonoidy jsou zde flavonoly a jejich konjugáty [22].

### 2.2.4 Jabloň (*Malus sp.*)

Jabloň patří do podčeledi jabloňovité (Maloideae) a rodu *Malus* (jabloň). Jablko je nepravým plodem (malvice) jabloně. Jedná se o jádrové ovoce, což znamená, že má jádřínek. Bylo pojmenováno více než 6 500 jablečných odrůd, ale jen velmi málo je jich dostupných v supermarketech. Původem jsou pravděpodobně ze západní Asie [11], [13].

Jablka jsou tvořena přibližně ze 79 % vodou a další základní složky jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 2). Účinnými látkami v jablkách jsou pektin, katechinové třísloviny, ovocné kyseliny (hlavně jablečná, citronová, octová), deriváty kyseliny kávové, minerální látky (za zmínku stojí draslík 1240 mg/kg), vitaminy (vitamin C). V semenech se nacházejí glykosidy, které obsahují kyanovodík [11], [13], [15].

Jablka jsou zdrojem fenolických látek, které jsou přírodními antioxidanty (především *in vitro*). Některé z nejdůležitějších flavonoidů jsou: kvercetiny přítomné v glykosylovaných formách (flavonoly), katechin a epikatechin a jejich oligomery (proanthocyanidiny), které jsou zodpovědné za trpkost a hořkost. Bezbarvé katechiny a leukoanthokyaniny reagují s kovovými ionty (např. železa), kdy se změní jejich barva na hnědou. Také bezbarvé chinony mohou vytvářet hnědý pigment, a to kondenzační reakcí s jinými fenoly, aminokyselinami nebo proteiny [16], [23], [24].

Celkový obsah fenolických látek zjišťovaný u jablek Folin-Ciocalteovou metodou byl dle studie Iacopini, 2010 [25] stanoven pro zelené jablko (green, delicious) na 68,29 mg GAE/100 g vlhké masy (WM), pro červené jablko (red, delicious) 73,96 mg GAE/100 g WM, pro růžovo-červené (rose red) 70,57 mg GAE/100 g WM a pro organické (organic) 58,12 mg GAE/100 g WM. Celkový obsah polyfenolů se lišil podle použité odrůdy, pohyboval se od 56 do 221 mg GAE/100 g vlhké masy, kdy komerční odrůdy měly nižší obsah polyfenolů [26], [25].

Celkový obsah fenolů ve většině jablečných odrůd se pohybuje mezi 100 až 600 mg na 100 g čerstvé hmotnosti, ale u některých odrůd jablek může být i vyšší [22].

## 2.2.5 Nutriční hodnoty ovoce

Celková koncentrace bioaktivních látek (fenolických látek a flavonoidů) v ovoci je ovlivněna kromě druhu a odrůdy také před sklizňovým vývojem (teplota, podnebí, roční období), stupněm zralosti, manipulací po sklizni, způsobem uskladnění sklizeného ovoce a jeho zpracováním [18].

Fenolické látky obsahují významnou skupinu flavonoidů, kam řadíme např. anthokyany, které ovlivňují kromě jiného i zbarvení ovoce. Anthokyany tvoří různě barevné varianty od oranžové, červené, purpurové, fialové až po modrou. Barva je ovlivněna teplotou, působením kyslíku nebo pH prostředí. Flavonoidy jsou dobře rozpustné ve vodě [16], [22], [27].

Tabulka 2 – Nutriční hodnoty běžně používaného ovoce v dětských výživách [15]

Plodina	jablka	meruňky	maliny	Jahody
Energie [kJ·kg <sup>-1</sup> ]	2550	2390	2300	1800
Základní složky [g·kg <sup>-1</sup> ]				
Voda	790	833	844	880
Sušina	210	167	156	120
Bílkoviny	4	10	10	9
Lipidy	3,7	3,0	8,0	6,0
Sacharidy	144	134	116	88
Popeloviny	3,7	6,50	4,6	5,70
Vláknina	18	10	52	13

## 2.2.6 Výroba dětské výživy

Kvalita dětské výživy, ať už z hlediska sensorického (chuť, barva, vůně) nebo z pohledu potravinářské bezpečnosti, je ovlivněna mnoha faktory v rámci výrobního řetězce. Patří sem například kvalita suroviny, předběžné zpracování a podmínky zpracování. Do předběžného zpracování ovoce je zařazeno loupání, krájení, blanšírování, zmrazení nebo využití mražených ovocných polotovarů [4], [5].

Na kvalitu surovin má vliv velikost, stáří a rozmanitost ovoce. Ovoce určené ke zpracování do dětské výživy by nemělo být zcela vyzrálé, ale mělo by být natolik zralé, aby bylo dostatečně velké. To je kvůli tomu, aby obsahovalo co nejvyšší obsah pektinů, mělo zdravou původní barvu a výrazné aroma [5], [28].

Sklizené ovoce podléhá posklizňovým změnám, které vedou ke ztrátě kvality (např. měknutí pletiv, snižování obsahu vody). Proto se co nejvíce zkracuje doba skladování před samotným zpracováním. Dalším krokem je čištění, při kterém se ze suroviny odstraňují kontaminanty. Typ čištění může být buď suchý nebo mokrý. Mokrý typ (praní) je účinnější při odstraňování zeminy, reziduí pesticidů a taky se při zpracování ovoce více využívá [29].

Dále následuje inspekční krok tedy třídění surovin podle měřitelných fyzikálních vlastností. Tato operace probíhá před vstupem ovoce ke zpracování. Existuje třídění podle jakosti, barvy, velikosti a může být mechanizované nebo ruční [29].

V následujícím kroku jsou odstraněny nepoživatelné části ovoce, které jsou pro finální produkt nežádoucí. Patří sem: odstopkování, odpeckování, loupání (mechanické, termické, chemické). Současně s odpeckováním nebo odjadřincováním se může ovoce nakrájet. Většinou se nepoživatelné části odstraňují až při pasírování. Velikostí částic zpracovávané suroviny se dá ovlivnit průběh technologických operací založených na sdílení hmoty či tepla [28], [29].

Vyprané a vytríděné ovoce se blanšíruje nebo se rozvaří (přímo nebo nepřímo) s malým přídavkem vody. Tento krok musí být proveden co nejrychleji po nakrájení suroviny. U rozvaření dochází k inaktivaci enzymů (oxidas i pektinas) ohrožující kvalitu vyráběného produktu a k odvodu vzdušné suroviny [28], [29].

Dalším krokem je protírání a pasírování ovoce, při něm se odstraní všechny nežádoucí částice. Protírání přes nerezová síta je pouze rozvařené měkké ovoce. Rozmělněný produkt je nutné stabilizovat konzervací (sterilizace teplem), provádí se aseptická výroba polotovarů, kdy se využije tepla dodávaného při rozvaření. Poté je horký ovocný protlak ochlazen na 15 °C a současně odvodu vzdušné suroviny. Odstraněním vzduchu z protlaku se zabrání nežádoucím změnám produktu během skladování. Mírně slazená ovocná pyré jsou skladována v tancích nebo jsou rovnou balena do obalů pro obchodníky [28], [29], [30].

## 2.3 Autenticita potravin

Globalizace světových potravinových trhů nabídla v posledních několika desetiletích spotřebitelům obrovskou škálu potravin, a díky tomu neustále roste poptávka po vysoce kvalitních potravinářských výrobcích. Jako ekonomicky motivovaný potravinový podvod je myšleno úmyslné falšování potravin za účelem finanční výhody. Autentičnost potravin je velkým problémem pro všechny, kteří jsou zapojeni do obchodování s potravinami, a to pro spotřebitele, orgány pro ochranu spotřebitele, výrobce a obchodníky [31].

Potravinové podvody jsou celosvětovým problémem. V boji proti těmto podvodům hrají klíčovou roli vhodné analytické metody, které je mohou odhalit. Při detekování falšování se vychází z toho, že autentický produkt obsahuje pro něj typické látky ve specifickém množství. Tento přístup je založen na tom, že produkt obsahuje určité množství těchto charakteristických

látek (markerů), které odpovídá použitým technologiím a surovinám. Nejvýznamnějšími markery jsou např. formolové číslo, hustota, kyseliny (citronová, jablečná, isocitronová), cukry, popel, draslík, fosfor, hořčík, vápník, sodík a prolin aj. Příkladem může být např. zjištění přítomnosti floridzinu, což je flavonoid přítomný ve všech částech jablka, ale v jiných druzích ovoce je zastoupen méně. Ačkoliv se výrobou jablečných produktů (pyré) snížilo množství floridzinu (fenolických sloučenin), byla jeho přítomnost stále detekovatelná [1], [6], [24], [32].

Markery typické pro určité druhy ovoce jsou kromě zmíněného floridzinu pro jablka např. sorbitol (jablka, meruňky, hrušky), karotenoidy (např. meruňky a pomeranče), kyselina isocitronová (např. jahody, meruňky, pomeranče), kyselina vinná (vinná réva), sacharóza, aminokyseliny, profil antokyanů a další. Dále existují markery pro detekci tzv. maskovacích látek, které maskují naředění či přislazení ovocných výrobků. Do těchto markerů řadíme sacharózu, profil oligosacharidů, poměr cukrů glukózy a fruktózy, kyselinu fumarovou, syntetická barviva a konzervační látky [32].

Druhý typ přístupu je založen na statistických analýzách vzorků, které jsou porovnávány s komerčními vzorky či vlastní databází. Aby byla statistická metoda průkazná, je potřeba větší množství vzorků. Můžou být analyzovány buď hlavní komponenty nebo je provedena shluková analýza [1], [33].

Mezi laboratorní metody detekce falšování patří senzorká analýza, izotopové metody, klasické metody a biologické metody. Senzorickou analýzou je myšleno hodnocení potravin pomocí lidských smyslů a výsledky jsou zpracovávány centrálním nervovým systémem.

Mezi klasické metody řadíme chromatografické, elektromigrační, mikroskopické a spektroskopické metody. Do izotopových metod jsou řazeny hmotnostní spektrofotometrie izotopových poměrů (IRMS) a místně specifická frakcionace přirozených izotopů (SNIF-NMR). Do biologických metod používaných k detekci falšování v potravinářství patří imunologické metody (ELISA) a molekulárně biologické metody, založené na PCR [1], [34].

Počet falšovaných potravin je závislý na nastavených podmínkách, především na ochranných opatřeních organizovaných státem, ale i na jiných nestátních mechanismech. Nejčastěji se setkáváme s těmito typy falšování potravin. Dražší potravina je zaměněna za levnější nebo se nastaví levnější složkou. Dalším typem falšování potravin je nedodržení deklarovaného technologického postupu, či přítomnost nedeklarovaných (nepovolených) složek. V neposlední řadě uvádění vyššího obsahu složky, než je ten skutečný, falšování nebo nastavení za účelem zlepšení vlastnosti potraviny atd. [1], [35].

## **2.4 Analýza potravin pomocí biologických metod založených na analýze DNA**

Technologie založené na analýze DNA, zejména s využitím PCR, RT-PCR, vysokorozlišovací analýzy křivek tání (HRM), DNA čipů a sekvenování nové generace, se osvědčily jako užitečné metody pro ověření autenticity potravin. K prokázání autenticity potravin se dá využívat strukturálních jedinečností DNA jako například detekcí jednonukleotidového polymorfismu (variace v jediném nukleotidu), polymorfismu v délce sekvence, polymorfismu délky restričních fragmentů nebo kvantitativní PCR. Tyto metody jsou považovány za spolehlivější ve srovnání s chemickou analýzou díky stabilitě DNA. Je považována za dobrý ověřovací marker, protože je stabilní při různých podmínkách, při odlišných typech zemědělství a taky při zpracování, kdy uchovává svou sekvenci. Je specifickou informací, díky které je možné pomocí metod založených na analýze DNA jednoznačně identifikovat druh nebo odrůdu a definovat, zda je přítomná ve zpracované potravine [31], [36].

Pro molekulárně diagnostické metody založené na analýze DNA je nezbytné izolovat DNA v dostačující kvalitě a kvantitě vhodné pro molekulárně biologické aplikace jako je např. qPCR. Potraviny rostlinného původu obsahují kromě DNA, také polysacharidy, polyfenoly a další sekundární metabolity, které nadhodnocují koncentraci DNA při jejím stanovení pomocí UV-VIS spektrofotometrie, protože mají absorpční maximum při podobné vlnové délce. Mohou také způsobovat degradaci DNA nebo ovlivňovat aktivitu reverzní transkriptázy [1], [36], [37].

DNA se u rostlin nachází v buněčném jádře, chloroplastech a mitochondriích. DNA může být izolována buď jako celková genomická, mitochondriální nebo plastidová DNA. Postup izolace rostlinné DNA se skládá z homogenizace vzorku, lýze buněk, extrakce a purifikace DNA, stanovení její koncentrace a čistoty a ověření amplifikovatelnosti pomocí PCR. K izolaci rostlinné DNA se používá řada postupů, ale existují i komerčně dostupné izolační soupravy (kity). Volba vhodného postupu závisí na požadované čistotě a množství izolované DNA. Čím čistší DNA je izolována, tím spolehlivější výsledek je získán, protože kontaminovaná DNA neposkytne přesné, spolehlivé a reprodukovatelné výsledky [36], [38], [39].

Stáří a druh rostlinné tkáně výrazně ovlivňuje kvalitu výtěžku izolované DNA. Taktéž správnou manipulací a skladováním sklizené rostlinné tkáně se dá předejít degradaci DNA např. vznikem nukleáz. Nejvhodnější je ihned z čerstvě sklizeného rostlinného materiálu izolovat DNA, pokud to nelze, tak je možné skladování při nízkých teplotách a to při  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  nebo v kapalném dusíku. Při zmrazení se v buňkách tvoří krystalky ledů a v důsledku dehydratace mohou být buňky porušeny (např. prasknutím membrány), rychlým procesem zmrazení lze tomuto jevu zabránit. Další možností skladování je vysušení tkáně pomocí lyofilizace, která zabraňuje kontaminaci tkáně v důsledku vlhkosti a v této úpravě může být uchovávána i několik let s nízkou ztrátou kvality DNA [39], [40].

#### **2.4.1 Homogenizace vzorku**

Metoda izolace rostlinné DNA je volena podle toho, ze které části rostliny bude DNA izolována, jestli se jedná o čerstvý, sušený nebo zpracovaný rostlinný materiál. Rostlinná buňka je relativně obtížným zdrojem k izolaci DNA, protože má tuhou polysacharidovou buněčnou stěnu. Na začátku izolace DNA je mechanicky narušeno rostlinné pletivo a buněčná stěna, čehož může být dosaženo zmrazením vzorku v tekutém dusíku a poté mechanickým rozmělněním tloučkem, skleněnými kuličkami, zrnky písku nebo pomocí mlecího mlýnku. Kromě mechanického rozrušení tkáně může být použito také chemické rozložení buněčné stěny. Toho může být docíleno pomocí hydrolyzujících enzymů jako jsou celulasy a pektinasy. I když je tento přístup dražší než mechanická homogenizace, nedochází při něm ke štěpení DNA [39], [41].

Homogenizace je nezbytná i proto, že snižuje viskozitu vzorku způsobenou přítomností sloučenin s vysokou molekulární hmotností, kam řadíme např. komplexní uhlovodíky. Fyzikální síly, které umožňují narušení buněk a uvolnění DNA mohou taktéž naštěpit DNA s vysokou molekulovou hmotností [39].

#### **2.4.2 Lýze buněk**

Nukleové kyseliny se nachází v jádrech buněk, které je proto nutné lýzovat. Prvním krokem je tedy vznik lyzátu, tedy rozrušení cytoplazmatické a jaderné membrány za uvolnění DNA. Buněčné membrány mohou být porušeny pomocí detergentů (CTAB, SDS, Triton X100), chaotropních solí nebo alkalickou denaturací. Obsah buňky se včetně DNA uvolní do extrakčního pufru, který musí obsahovat chelatační činidlo EDTA blokující dvojmocné ionty kovů (např.  $\text{Ca}^{2+}$  nebo  $\text{Mg}^{2+}$ ). Přítomnost těchto iontů fungují jako kofaktory nukleáz, které by mohly izolovanou DNA rozštěpit. Tris-hydroxymethylaminomethan slouží k udržování

fyziologického pH, aby nedošlo k poškození DNA. Rozpustné složky buněčného lyzátu musí být odděleny od buněčných zbytků a dalších nerozpustných materiálů [41], [42].

### 2.4.3 Extrakce a purifikace DNA

Přidáním solí se uvolňují proteiny (histony) z DNA a polysacharidy se udržují v rozpustné formě. Proteinázy se přidávají do extrakčního pudru, aby se odstranily histony, které by mohly reagovat s DNA a tím by se ovlivnila čistota izolované DNA. K dosažení separace buněčného lyzátu od buněčných zbytků se často používá odstředění, vakuová filtrace, ale i čištění pomocí magnetických částic. Dalším krokem je odstranění ostatních rozpustných materiálů (včetně proteinů a polysacharidů) přítomných v lyzátu od DNA. To se může udělat přidáním octanu draselného nebo fenol-chloroformovou extrakcí. Z vodné fáze se DNA vysráží absolutním ethanolem [41], [42].

Důležitým krokem je přečištění (purifikace) izolované DNA (např. ethanolem), kdy jsou ze vzorku odstraněny veškeré nežádoucí kontaminanty. Kromě nukleových kyselin mohou být ve vzorku přítomny proteiny (pokud nebyla účinnost extrakce DNA dostatečná) nechtěné příměsi jako jsou soli nebo produkty enzymatických reakcí. Kontaminace DNA může inhibovat některé enzymy a restriční endonukleázy (viz kapitola 2.4.5.3), tedy může komplikovat další práci s izolovanou DNA, ať jde o sekvenování, PCR nebo o další metody. Proto je vhodné zkontrolovat čistotu izolované DNA spektrofotometricky (viz kapitola 2.4.4) a na agarosovém gelu (viz kapitola 2.4.6) [43], [38].

### 2.4.4 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Koncentrace a čistota izolované DNA může být zjištěna spektrofotometricky. Ke kvantifikaci nukleových kyselin se využívá Lambert-Beerův zákon:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l, \quad (2.1)$$

kde  $\varepsilon$  je molární extinkční koeficient,  $A$  je hodnota absorbance a  $l$  je délka optické dráhy. Hodnota absorbance je kromě koncentrace závislá na chemickém složení, tedy zastoupení GC párů bází. Dvouřetězcová DNA má absorbanci přibližně o 40 % nižší než jednořetězcová DNA [36], [44].

Nukleové kyseliny, proteiny a různé skupiny fenolických látek mají absorpční maxima v ultrafialové oblasti spektra. Nukleové kyseliny absorbují ultrafialové záření a absorpční maximum je při 260 nm, zatímco proteiny mají své maximum při 280 nm. U jednoduchých fenolů se maximální absorbance pohybuje v intervalu mezi 220 až 280 nm [22], [36].

Vzorky nukleových kyselin mohou být kontaminovány jinými molekulami, které mohou působit jako inhibitory PCR. Výpočtem poměru absorbancí lze stanovit čistotu vzorků. Za čistou DNA lze považovat vzorek s hodnotou  $\sim 1,8$  poměru absorbancí 260/280. Pokud je hodnota poměru výrazně nižší než 1,8 indikuje to znečištění vzorku např. bílkovinami, fenolem nebo jinými látkami, které silně absorbují okolo 280 nm [36], [44].

Pro zjištění sekundární míry čistoty se využívá poměru absorbancí 260/230, kdy má čistá DNA hodnotu mezi 1,8 a 2,2. Pokud je poměr výrazně nižší, tak to může indikovat přítomnost kopurifikovaných kontaminantů. Absorbance při 230 nm značí přítomnost nečistot jako jsou fenolické sloučeniny, aromatické složky a karbohydráty [43], [44].

## 2.4.5 Amplifikace DNA in vitro pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR)

Jednou ze základních technik založených na molekulárně biologických metodách pro zajištění kvality a bezpečnosti potravin je polymerázová řetězová reakce (PCR z anglického Polymerase Chain Reaction). Jedná se o rychlou a přesnou laboratorní techniku používanou k zmožení určitého segmentu DNA. Tuto metodu vynalezl v roce 1983 americký biochemik K. B. Mullis, který deset let poté získal za svůj vynález Nobelovu cenu za chemii [1], [45].

Polymerázová řetězová reakce umožňuje vědcům získat velká množství DNA, která jsou potřebná pro různé experimenty a postupy v molekulární biologii, forenzní analýze, evoluční biologii a lékařské diagnostice. Při využití ovocných vzorků může být problémem pro tuto techniku nedostatečné množství DNA izolované z ovocných plodů [2].

Jelikož vyšetřovatelé nemusí předem vědět o jaký typ falšování jde, je proto mnohdy screening užitečnější než individuální test. K tomuto účelu je vhodná multiplex PCR, kdy je možné v jedné reakci zároveň amplifikovat dvě a více cílových míst. Díky tomu je možné při paralelním zpracování více testů PCR detekovat více různodruhových DNA [6], [43].

### 2.4.5.1 Komponenty PCR

DNA templát (matrice) je makromolekula DNA, podle které se syntetizují nové řetězce dle komplementarity bází. Jedná se o izolovanou DNA zahrnující známou sekvenci vymezenou oběma primery. Množství templátové DNA, přidávané do PCR reakce je mezi 1–500 ng [36], [38], [46].

Deoxynukleotidy (3'-deoxynukleosid-5'-trifosfáty, zkráceně dNTP) jsou základními stavebními jednotkami pro syntézu nového řetězce DNA. Pro PCR se používá ekvimolární směs všech čtyř oligonukleotidů (dCTP, dATP, dGTP, a dTTP). Koncentrace se může pohybovat od 20–400  $\mu\text{mol/l}$ , kdy optimální koncentrace je většinou 200  $\mu\text{mol/l}$ . Pokud je koncentrace nukleotidů vyšší než 4  $\mu\text{mol/l}$ , nukleotidy vyvazují hořčnaté ionty a tímto způsobem je inaktivují, tedy dochází k inhibici syntézy [36], [38].

Primery jsou krátké sekvenčně specifické fragmenty jednovláknové DNA tvořené 18–30 nukleotidy, které bývají synteticky připravené. Výběr vhodné sekvence primerů komplementární k cílené DNA je důležitý pro úspěšnou amplifikaci PCR produktů. Tyto oligonukleotidy by neměly obsahovat falešně vazebná místa na templátu a neměly by být k sobě komplementární, aby nevznikaly dimery primerů. Vhodnou koncentrací (od 0,1–0,5  $\mu\text{mol/l}$ ) lze ovlivnit vznik nespecifických produktů a dimerů primerů. Teplota tání primerů se obvykle pohybuje mezi 50–80 °C a je ovlivněna množstvím G–C bází [36], [38].

Termostabilní DNA polymerasa je využívána pro opakovanou syntézu obou vláken. Existuje více druhů DNA polymeras, které se získávají především z rodů *Thermus* a *Pyrococcus*. Přehled nejčastěji používaných DNA polymeras používaných u PCR je uveden v následující tabulce (Tabulka 3). Přímý vliv na výběr polymerasy má původ DNA, použitý primer, délka produktu, jakož i obsah G-C bází. Taq polymeráza je enzym, který má pouze 5' → 3' polymerasovou aktivitu, což znamená, že není schopen opravovat chyby vzniklé při replikaci (kvůli chybějící 3' → 5' exonukleasové aktivitě). Teplotní optimum má při 75 °C. Podobné teplotní optimum má Tth DNA polymerasa, ale může působit také jako reversní transkriptáza (příprava cDNA). Pfu a Pwo DNA polymerasy mají 3' → 5' exonukleasovou aktivitu, což umožňuje opravu chybně inkorporovaných dNTP. Tyto polymerasy dokážou desetkrát přesněji syntetizovat PCR produkty [38], [47].



Tabulka 3 – Přehled termostabilních DNA polymeráz a jejich exonukleasových aktivit [46], [47]

polymerasa	optimální teplota extenze [°C]	5' → 3' exonukleasova aktivita	3' → 5' exonukleasova aktivita	původní druh
Taq	68–80 (75)	ano	ne	<i>Thermus aquaticus</i>
Tfl	70–74	ano	ne	<i>Thermus flavus</i>
Tbr	72	ano	ne	<i>Thermus brockianus</i>
Tth	70–74	ano	ne	<i>Thermus thermophilus</i>
Tli	72–80	ne	ano	<i>Thermococcus litoralis</i>
Pfu	72–80	ne	ano	<i>Pyrococcus furiosus</i>
Pwo	72	ne	ano	<i>Pyrococcus woesei</i>

Hořčnaté ionty jsou nezbytné kvůli aktivitě DNA-polymerasy. Jejich koncentrace se pohybuje od 0,5–8 mmol/l, ale musí být vždy optimalizována pro každý pár primerů a DNA templátu, bere se v úvahu i metoda izolace DNA. U primerů obsahující více G–C bázi je použití vyšší koncentrace iontů žádoucí. Obvykle se používá koncentrace 1,5 nebo 4 mmol/l. Specificitu PCR reakce snižuje vyšší koncentrace hořčnatých iontů než 8 mmol/l [36], [46].

Další důležitou složkou je reakční pufr vytvářející ideální prostředí pro DNA-polymerásu. Pufr obsahuje obvykle 10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> a 50 mM KCl, dále může obsahovat Tween 20, acetamid atd [36].

Ultra čistá voda slouží k ředění primerů a k doplnění vzorků na požadovaný objem [36].

Master mix dodávána výrobcem už obsahuje všechny důležité komponenty (včetně DNA polymerázy) pro průběh PCR reakce. Stačí k ní přidat pouze vodu, primery a templátovou DNA, čímž se minimalizuje množství pipetování a také možné zdroje chyb.

#### 2.4.5.2 Princip PCR

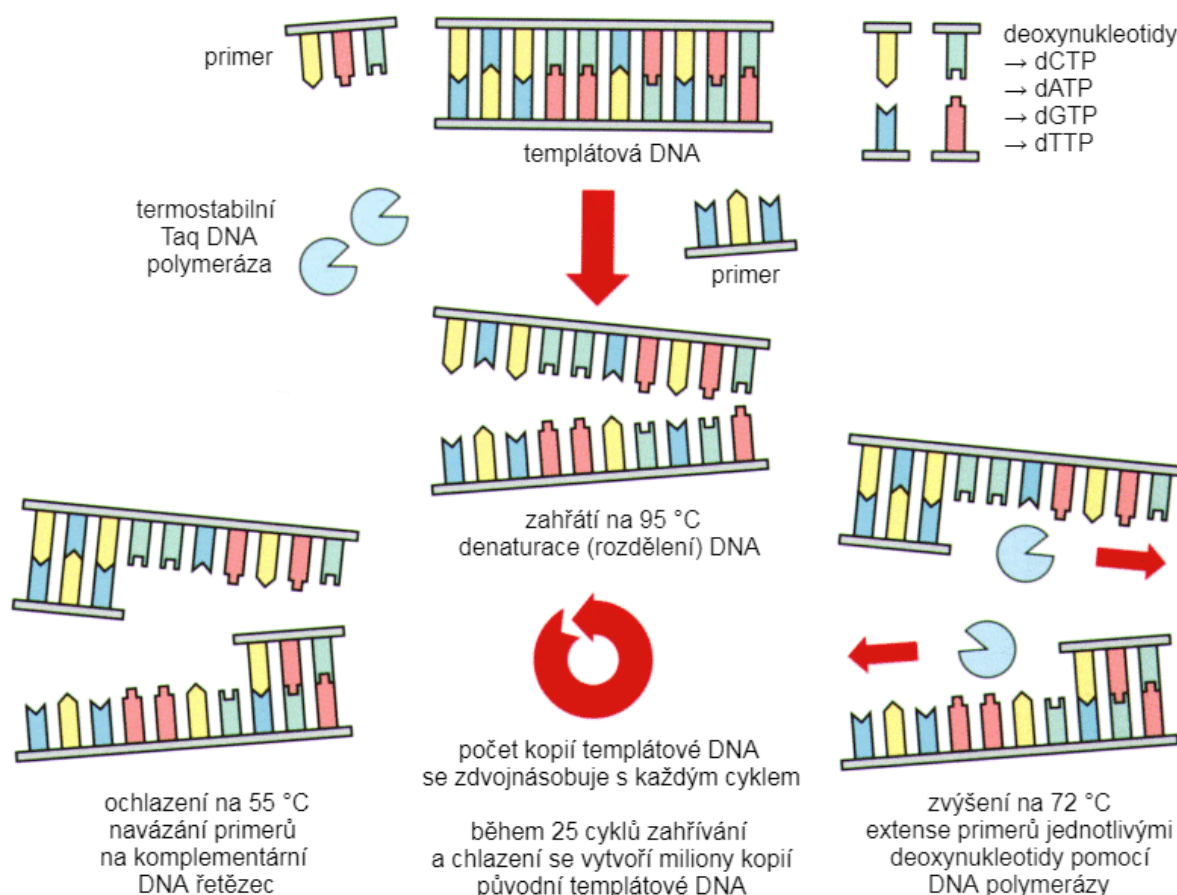
Polymerasová řetězová reakce probíhá v termocyklu, což je přístroj, který zvládá rychlý a přesný přechod mezi teplotami. PCR se skládá ze třech kroků: denaturace templátu, připojení primerů a samotné syntézy. Tyto kroky se cyklicky opakují, což vede k syntéze části DNA vymezené primery. Na následujícím obrázku (Obrázek 1) můžete vidět grafické schéma znázorňující jeden opakující se cyklus polymerasové řetězové reakce (PCR) [38].

Prvním krokem je denaturace dvouvláknové templátové DNA, kdy je vzorek zahřát na takovou teplotu (většinou 94–96 °C), aby došlo k rozvolnění na dvě jednovláknové molekuly DNA. Nutné je úplné oddělení vláken od sebe, jinak hrozí renaturace DNA, což by zabránilo pozdějšímu nasednutí primerů [38], [46], [48].

Druhým krokem je nasednutí primerů (annealing), při kterém dochází k ochlazení vzorku na teplotu specifickou pro použitý pár primerů (okolo 55 °C). Teplota je závislá na délce primerů a na zastoupení G–C a A–T párů. Mezi guaninem a cytosinem jsou tři vodíkové můstky, které zvyšují stabilitu i denaturační teplotu. Tyto primery řídí syntézu nových vláken a jsou komplementární ke koncovým oblastem vybrané amplifikované oblasti, a na tyto oblasti nasednou [38], [46], [48].

Třetím krokem je syntetická fáze, kdy dochází k syntéze nových řetězců DNA. Tato fáze je katalyzovaná Taq DNA polymerasou a jedná se o extenzi připojených primerů. Na oblast ležící za navázanými primery jsou dNTP připojovány ve směru od 5' konce ke 3' konci. Při použití Taq polymerasy je teplota zvýšena na 75 °C, což je její teplotní optimum [36], [38], [46].

Po skončení klasické PCR může být specifický amplifikační produkt detekován pomocí gelové elektroforézy. Použitím kvantitativní PCR (qPCR) je možné se tomuto kroku vyhnout, protože tato technologie kombinuje amplifikaci DNA s okamžitou detekcí produktů. Výhodou qPCR je také to, že se odstraňuje riziko kontaminace PCR produktu při manipulaci a je také méně časově náročná než gelová elektroforéza a může poskytnout kvantitativní výsledek [49].



Obrázek 1 - Schéma PCR (obrázek převzat a upraven z multimediální učebnice DNA diagnostiky [46])

### 2.4.5.3 Inhibitory a enhancery PCR

Ovoce obsahuje kromě DNA i další látky, které se při izolaci DNA do vzorku uvolňují a mohou poté stimulovat (enhancery) nebo inhibovat (inhibitory) probíhající PCR reakci. Hlavními kontaminanty jsou polysacharidy, které jsou nedetekovatelné a špatně odstranitelné ze vzorku. Při jejich vysoké koncentraci je homogenát velmi viskózní, což nepravdivě značí vysoké množství DNA. Nadhodnocení obsahu úseku DNA ve vzorku způsobují enhancery, které bývají méně často přítomny než inhibitory PCR reakce, zatímco inhibitory zase podhodnocují obsah určitého úseku DNA. Přítomnost inhibitorů při PCR reakci jí částečně nebo zcela zabraňuje, což se může projevit falešně negativním výsledkem nebo sníženou citlivostí. Při qPCR se to projeví sníženou intenzitou fluorescence nebo u elektroforézy chybějícím bandem na gelu [39], [50].

Inhibitory se vyskytují ve vyšším množství v potravinářských vzorcích, tudíž je nutné pro správnou interpretaci výsledků identifikovat a určit míru inhibice. Patří sem proteiny, polysacharidy, fenolické látky, endogenní nukleasy, proteinázy, vápenaté ionty a huminové kyseliny. Při homogenizaci tyto látky tvoří chemické vazby s proteiny a nukleovými kyselinami. Měřením fluorescence nebo spektrofotometricky lze stanovit čistotu DNA (viz kapitola 2.4.4) [2], [36], [50].

#### **2.4.5.4 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)**

Kvantitativní PCR má zkratku qPCR, která pochází z angličtiny (Quantitative Polymerase Chain Reaction). Tato metoda se používá k detekci, charakterizaci a kvantifikaci nukleových kyselin. Stejně jako ve standardní PCR je složena ze tří opakujících se kroků (viz kapitola 2.4.5.2). Průběhu PCR reakce a množství PCR produktu je sledováno pomocí fluorescenčních sond nebo barviv [51].

U qPCR založené na detekování produktu pomocí interkalačního barviva je součástí master mix kromě ostatních komponent i fluorescenční barvivo (např. SYBR Green). Tento fluorofor se váže na amplifikované dvouvláknové molekuly DNA a během každého cyklu se měří fluorescence. Během počátečních cyklů je signál slabý a nelze jej rozlišit od pozadí, ale jak se hromadí množství DNA produktu, tak se vyvíjí i signál, který poté exponenciálně roste až dojde k saturaci systému, což je fáze plató. Intenzita fluorescence může být přímo nebo nepřímo úměrná množství amplifikovaného produktu přítomného ve vzorku [49], [52].

Díky fluorescenčnímu značení je možné shromažďovat údaje v reálném čase u právě probíhající PCR reakce. Nevýhodou této metody je, že je možné najednou zkoumat pouze jeden cíl a že barvivo se váže na jakoukoliv přítomnou dvouvláknovou DNA ve vzorku, tedy i na nespecifické produkty amplifikace. Druhým typem je qPCR na bázi sondy, kdy lze v každém vzorku detekovat současně mnoho cílů [51], [52], [53].

#### **2.4.5.5 Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM)**

Zkratka HRM vychází z anglického High Resolution Melting. Jedná se o jednoduchou, rychlou metodu detekce teplot tání PCR produktů v reálném čase. HRM analýzou mohou být od sebe rozlišeny sekvence DNA na základě jejich složení, délky, obsahu GC nebo komplementarity vláken [52], [53].

Po skončení qPCR reakce následuje analýza křivky tání, která se používá ke zjištění povahy PCR amplifikátu a eliminaci nespecifických produktů. Zvyšováním teploty dochází k tání DNA, kdy se separují komplementární řetězce dvouvláknové DNA (dsDNA). Analýza křivek tání začíná při nižší teplotě, než je očekávaná teplota tání ( $T_m$ ), poté se pomalu zvyšuje teplota až na teplotu vyšší, než je očekávaná  $T_m$  specifického produktu. Během tání fluoreskuje pouze barvivo vázané na dsDNA a tato fluorescence je nepřetržitě monitorována optickým systémem. Použité barvivo musí mít vysokou hodnotu fluorescence při navázání na dvouvláknovou DNA, a naopak nízkou hodnotu fluorescence, když se nachází v roztoku (snižuje se až 1000×). Obecně software k analýze křivek tání definuje teplotu tání produktu jako inflexní bod křivky tání a rovnou vykresluje derivované křivky tání, kde teplota tání specifického produktu je ve vrcholu píku. Nespecifické produkty jsou také vykresleny na derivované křivce tání, ale předpokládá se, že mají odlišnou teplotu tání než specifické produkty a jsou kratší, a díky tomu mají nižší teplotu tání [52], [53].

## 2.4.6 Horizontální gelová elektroforéza

Horizontální gelová elektroforéza může být použita k vizualizaci, identifikaci, separaci a purifikaci PCR. Elektroforéza je separační technika, která je založena na migraci elektricky nabitých částic v elektrickém poli. K rozdělení fragmentů DNA dochází podle velikosti (pohyblivosti) látek nesoucí elektrický náboj (ionty). Mezi dvě elektrody je vloženo konstantní stejnosměrné napětí, které vytváří elektrické pole. Na nabitou částici v elektrickém poli působí dvě síly, a to elektrostatická síla, která uvádí částici do pohybu a pak odpor viskózního prostředí, který ji brzdí [43], [38], [48].

Horizontální elektroforéza může probíhat na agarosovém gelu. Agarosa, což je lineární polysacharid, který je získáván z mořských řas rodů *Gracilaria* nebo *Gelidium*. Základní strukturní jednotkou je disacharid agarobiosa, který je složen z D-galaktosy a 3,6-anhydro-L-galaktosy [54], [55].

Gelifikací agarosy vzniká agarosový gel, agarosa taje při 80-95 °C a při snížení teploty na teplotu přechodu 32–45 °C se tvoří gel. Dlouhé cukernaté polymery tvořící síť gelu jsou vázány nekovalentními vodíkovými můstky a hydrofobními vazbami. Methylace, alkylace a hydroxyalkylace polymerního řetězce mohou změnit teplotu tání a gelovatění. Nejčastěji se používá 1–2% agarosový gel. Koncentrace agarosy ovlivňuje velikost pórů, kdy např. více procentní gel vytváří menší póry (např. 2% agarosový gel dokáže separovat 0,1–2 kb). Z toho plyne, že vhodnou volbou koncentrace a typu gelu lze vytvořit vhodné podmínky pro dělení fragmentů v rozličném rozmezí molekulových hmotností. Touto metodou je možné detekovat až 1 ng DNA [38], [48], [56].

## 2.5 Analýza potravin pomocí instrumentálních technik

Do instrumentálních technik k analýze autenticity potravin jsou běžně používané chromatografické metody, kam patří LC-MS, GC-MS, které analyzují konkrétní markery podle způsobu falšování. Např. HPLC-PAD se používá k analýze polyfenolů [1].

### 2.5.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

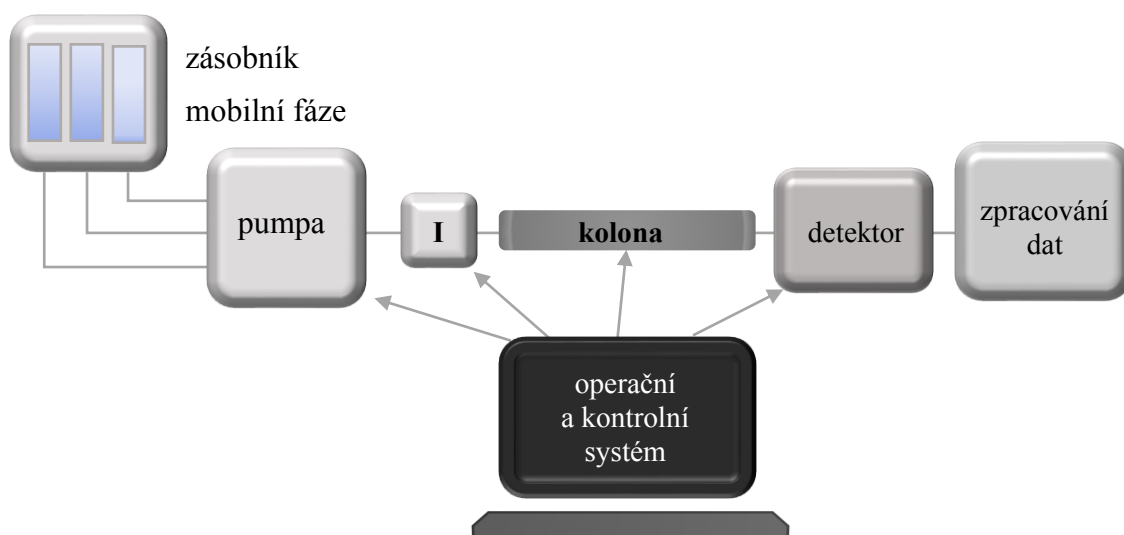
Chromatografie je separační nebo analytická metoda sloužící k zjištění kvantitativních a kvalitativních informací o analyzovaném vzorku. Při ní dochází k dělení směsi látek vlivem rozdílné afinity ke stacionární a mobilní fázi. V pohybující se mobilní fázi je rozpuštěná směs látek a ty jsou unášeny kolonou nepohyblivé stacionární fáze. Jelikož jednotlivé látky ze směsi rozdílně interagují se stacionární fází, tak jsou různou měrou zadržovány v koloně. Nejrychleji prochází kolonou látky, které jsou ke stacionární fázi poutány slabě nebo vůbec a nejvíce zadržovanými jsou ty, které jsou nejsilněji poutány ke stacionární fázi [57], [58].

HPLC („High-Performance Liquid Chromatography“) je separační technika využívající kolon se sorbentem, kde je náplň tvořena malými částicemi pravidelného tvaru jednotné velikosti, které homogenně vyplňují kolonu. Díky tomu se dosahuje vysoké účinnosti kolon. Jelikož kolony kladou vysoký odpor průtoku mobilní fáze, je nutné použití vysokotlakých čerpadel k vytvoření konstantního toku mobilní fáze. Pokud je použita polární stacionární fáze a nepolární mobilní fáze jedná se o chromatografii s normálními fázemi, a naopak pokud je použita nepolární stacionární fáze a polární mobilní fáze jedná se o chromatografii s obrácenými fázemi. V současnosti je běžněji využívaná chromatografie s reverzními fázemi, protože má širší použití na více analytů [59], [58], [60].

Změnit selektivitu na analytické koloně se dá pomocí gradientové eluce. Při ní se mění složení mobilní fáze v průběhu separace, kdy dochází ke zvyšování její eluční síly. Díky tomu se mohou i silně zadržované složky směsi rychleji pohybovat. Pro tyto látky se dá zvýšit citlivost detekce, a díky tomu se i podstatně zkrátí doba analýzy [58], [60], [61].

Eluát opouštějící kolonu protéká měrnou celou detektoru, kde je sledována určitá jeho vlastnost, která je převáděna na elektrický signál zpracováváný počítačem. Využívají se citlivé detektory, které umožňují kontinuální monitorování látek. Příslušný program vytvoří chromatogram, na kterém je znázorněna časová závislost odezvy detektoru. Na chromatogramu jsou píky charakterizované retenčním časem, který slouží k identifikaci dané látky, a plochou nebo výškou píku, která slouží ke kvantifikaci za použití kalibrační přímky [59].

Jedná se o rychlou, do značné míry automatizovanou (autosampler), vysoce přesnou metodu stanovení určitých chemických molekul ve vzorku. Pomocí HPLC lze analyzovat široké spektrum látek, ať už se jedná o látky polární, nepolární, ionty, látky tepelně nestabilní, vysokomolekulární nebo málo těkavé. Tato metoda není vhodná k detekci některých látek (těkavé látky), protože mohou být např. nevratně absorbovány. Taktéž se jedná o nákladnou a komplexní metodu, kdy samotná instrumentace i její provoz (nutnost čistých chemikálií) je docela drahý [60], [62].



Obrázek 2 – Schématické znázornění HPLC instrumentace, I – injektor

### 2.5.2 Folin-Ciocalteuova metoda (FCM)

Tato kolometrická metoda je vhodná k detekci fenolických sloučenin ve vzorcích. Jedná se o poměrně snadnou metodu, která nepotřebuje speciální laboratorní vybavení. Využívá se zde referenční látky kyseliny gallové, díky které je možné stanovit celkovou koncentraci fenolických hydroxylových skupin v rostlinném vzorku [63].

Tato reakce probíhá v alkalickém prostředí, kde polyfenoly reagují s Folin-Ciocalteuovým činidlem. Dochází zde k sekvenci redukčních reakcí, tedy k přenosu elektronů z fenolických látek na kyseliny fosfomolybdenovou ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) a fosfowolframovou ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ), které jsou součástí činidla. Při této reakci vznikají modré oxidy molybdenu ( $Mo_8O_{23}$ ) a wolframu ( $W_8O_{23}$ ). Intenzita modrého zbarvení je závislá na množství fenolů v roztoku. Tento modře zbarvený komplex je stanoven spektrofotometricky na základě měření absorbance při vlnové délce 750 nm. Podle aplikace je tato metoda různě modifikována, kdy mohou být vzorky proměřeny i při jiných vlnových délkách 725 nm, 760 nm a 765 nm, [63], [64], [65].

### **3 CÍLE PRÁCE**

V rámci této diplomové práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) izolace a charakterizace DNA
- 2) amplifikace rostlinné DNA s využitím specifických primerů
- 3) identifikace druhu rostlinné DNA
- 4) srovnání identifikace pomocí jiných metod

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Rostlinný materiál

K izolaci rostlinné DNA bylo použito ovoce zakoupené v běžných komerčních sítích. Izolace byla provedena z plodu jahody (*Fragaria ananassa*), meruňky (*Prunus armeniaca*), maliny (*Rubus idaeus*) a jablka (*Mallus domestica*).

K izolaci DNA z komerčních výrobků byly použity šest ovocných výrobků pro děti, které jsou běžně dostupné ke koupi v obchodních řetězcích. Základní informace o těchto výrobcích jsou shrnuty v následující tabulce (Tabulka 4). Ve výsledcích budou komerční dětské výživy označovány číslicemi od 1 do 6.

Tabulka 4 – Základní údaje o zvolených komerčních ovocných výživách

č.	název	společnost	složení	určeno pro děti od	energetická hodnota na 100 g výrobku
1	Ovocná přesnídávka s jahodami s vitamínem C	Hello	65 % hm. jablečná dřeň, 20 % hm. jahodová dřeň, voda, cukr, modifikovaný škrob, barvící ovocné a rostlinné extrakty (koncentrát z karotky a granátového jablka), kyselina askorbová	ukončeného 6. měsíce	322 kJ 76 kcal
2	Sunárek 100 % ovoce do ručičky s jahodami	Hero	80 % jablečné pyré, 20 % jahodové pyré, koncentrát citronové šťávy, kyselina askorbová	ukončeného 4. měsíce	239 kJ 57 kcal
3	Erdbeere mit Himbeere in Apfel	HiPP	77 % jablka, 10 % jahody, 8 % banán, 4% maliny, mrkvová šťáva z koncentrátu	ukončeného 4. měsíce	219 kJ 52 kcal
4	Ovocná přesnídávka s malinami s vitamínem C	Hello	75 % hm. jablečná dřeň, 10 % hm. malinová, voda, cukr, modifikovaný škrob, barvící ovocné a rostlinné extrakty (koncentrát z karotky a granátového jablka), kyselina askorbová	ukončeného 4. měsíce	342 kJ 81 kcal
5	Ovocná kapsička jablko-meruňka	Nestlé	70 % jablečné pyré, 30 % meruňkové pyré, vitamin C	ukončeného 6. měsíce	203 kJ 48 kcal
6	Cvrček kojenecká výživa s meruňkami	Hamé	40 % hm. meruňková dřeň, voda, 20 % hm. jablečná dřeň, cukr, fruktózový sirup (fruktóza, dextróza, maltóza), kukuřičný modifikovaný škrob, kyselina citronová, kyselina askorbová	ukončeného 4. měsíce	344 kJ 81 kcal

#### 4.1.2 Chemikálie

Standardy a chemikálie použité při HPLC:

- Acetonitril CHROMASOLV™ Plus  $\geq 99,9\%$ , Honeywell Riedel-de Haën™
- Kyselina trifluorooctová 99%, ACROS Organics™, Belgie
- Methylalkohol p.a., PENTA, ČR
- n-Hexan 99% p.a., PENTA, ČR
- Aloenin  $\geq 95,0\%$ , Supelco, Německo
- Apigenin 7-glukosid, Sigma-Aldrich, Německo
- Daidzein  $\geq 97\%$ , Supelco, Německo
- Epikatechin  $\geq 97\%$ , Supelco, Německo
- Floridzin dihydrát  $\geq 98,5\%$ , Supelco, Německo
- Genistein  $\geq 97\%$ , Supelco, Německo
- Hesperidin 80%, Sigma-Aldrich, Švýcarsko
- Katechin hydrát  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich, Německo
- Kvercetin-3-glukosid  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich, Německo
- Kyselina gallová 97,5–102,5%, Sigma-Aldrich, Čína
- Kyselina chlorogenová  $\geq 95\%$ , Sigma-Aldrich, USA
- Kyselina kávová  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich, Německo
- Kyselina p-kumarová  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich, Velká Británie
- Kyselina vanilínová 97%, Sigma-Aldrich, Čína
- Naringenin  $\geq 95\%$ , Sigma-Aldrich, Německo
- Pelargonidin-3-glukosid chlorid  $\geq 95\%$ , Německo
- Resveratrol  $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich, Německo

Chemikálie použité při stanovení celkových fenolických látek a flavonoidů:

- Folin-Ciocalteuovo činidlo, Penta, ČR
- Dusitan sodný p.a, LachNer, ČR
- Hydroxid sodný, LachNer, ČR
- Chlorid hlinitý p.a, LachNer, ČR
- Katechin, Sigma-Aldrich, Německo
- Kyselina gallová, Sigma-Aldrich, Německo
- Uhličitan sodný bezvodný p.a, LachNer, ČR

Chemikálie použité při PCR a elektroforéze:

- Agarosa pro rutinní použití, Sigma-Aldrich, USA
- DNA standard 100 bp žebříček, Malamité, ČR
- Eligene Plant DNA isolation kit, Elisabeth Pharmacon, ČR
- Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA), Serva, Německo
- GelRed Nucleic Acid Stain, Biotium
- Kyselina boritá, Penta, ČR
- Nanášecí pufr Yellow load, Top-Bio, ČR
- PCR ultra H<sub>2</sub>O, Top-Bio, ČR
- Primery o určitých sekvencích (viz Tabulka 5), Elisabeth Pharmacon spol., ČR
- qPCR 2x SYTO-9, Master Mix, Top-Bio
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris-báze), Serva, Německo



Tabulka 5 – Primery použité v této diplomové práci

	Primery		Sekvence (5' → 3')	T <sub>anneal</sub> (°C)	T <sub>m</sub> (°C)	produkt (bp)
uni.	ITS-S2F ITS-S3R [66]	F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	49	54	387– 547
		R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT		57	
Jahoda	ABP1A [67]	F	TATCTGAGGCTTCCAAATGC	50	55	300
		R	CACTGATATTCCTCACCACAGG		58	
	APX1B [67]	F	CTGGAGTTGTTGCTGTTGAGG	54	59	673 + 12
		R	CTTTCCAGCATCAGGAAGACG		59	
	APX1E [67]	F	GCATATCTGGTCTCGATTCTGC	54	59	334
		R	CCCATAGAAACAACACCTACTGC		59	
	GAST1 [67]	F	GACAACATGCTTCACTTCTTGC	52	58	212
		R	TTAAGGACACTTGC GTTGC		57	
	DFR1A [67]	F	GGCTCGTCATGAGACTCCTC	55	61	100 + 196
		R	TGTGGTAACTCCAGCAGATGTC		60	
Meruňka	AGS6 [68]	F	GAGTGGCCGATACCTGTTCT	51	60	222
		R	AATGATGGGTTTTGGGTGTG		56	
	AGS9 [68]	F	AGGCATGTGTGTTTGACACC	52	59	214
		R	AATGTGGACATGAAGCACCA		57	
	AGS18 [68]	F	CAATGGACGAGTAGGGGTGT	51	60	373
		R	TTGGGTTTGAGAGGTTTTG		56	
	AGS33 [68]	F	CACCCCTCCCTCTCTTTTA	52	59	186
		R	CATGTTGGTCGATTTGTAGCC		57	
	AGS38 [68]	F	CATCATGTACGGAAGCACCA	50	58	208
		R	CCGTTGGACATTCCTTTTTC		55	
jablko	FT MDP [69]	F	GCCAGCGAGGTTTCAACTTCTT	55	60,3	234
		R	TGCCGCAGTAGTTGCTGAATA		60,3	
	MdFKBP42 [70]	F	TCGTCTCTTCAGGCTCGAAA	54	57,3	143
		R	CATCTAAACTCCCTCCCGCA		59,4	
	MdFKBP53 [70]	F	GTTGGGGTTAACGGTATGCG	55	59,4	182
		R	ACTCAAAGTCGGAAGCGGA		57,3	
	MdFKBP65 [70]	F	GATGACCATCGACAGCAAGG	54	59,4	110
		R	TGACAGATCCCAGGCTTTACA		57,9	
	MDP [71]	F	CCTCAGTTCTTCGGAATCCA	52	57,3	194
		R	CCAACTCCATCTTGACACCA		57,3	
malina	Ri1 [72]	F	CGAGTACGGTAACATGTCGAGTGC	56	64,4	216
		R	TACTGAGGAGATACCCAAGTGAAC		63,0	
	EPpCU1830 [73]	F	TGATGCAATTGGCACAAAGC	53	55,3	231
		R	CCTATCACCCTTACTTCACTGC		60,6	
	Ri18S [74]	F	CTACCTATTGTAAGGAATGGTGCCT	53	61,3	164
		R	TTCTGCATCCGAGATATCAAGTAGT		59,7	
	RiACO1 [74]	F	AATTGTTTGGAGCAGAGATTCAAGG	53	59,7	177
		R	AAACTCCTTCATCACCTTCTGTAG		61,3	

### Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TATCTGAGGCTTCCAAATGC	20	55.49	45.00	4.00	2.00
Reverse primer	CACTGATATTCCTCACCACAGG	22	58.20	50.00	4.00	1.00

#### Products on target templates

>[X91839.1](#) Fragaria x Ananassa DNA encoding for auxin-binding protein

```
product length = 300
Forward primer 1  TATCTGAGGCTTCCAAATGC  20
Template        305  ..... 324

Reverse primer 1  CACTGATATTCCTCACCACAGG  22
Template        604  ..... 583
```

>[XM\\_004290641.2](#) PREDICTED: Fragaria vesca subsp. vesca auxin-binding protein T85 (LOC101300303), mRNA

```
product length = 57
Forward primer 1  TAICTGAGGCTTCCAAATGC  20
Template        89  ..... 108

Reverse primer 1  CACTGATATTCCTCACCACAGG  22
Template       145  .....T..... 124
```

Obrázek 3 - Výsledek vyhledávání páru primerů *ABP1A* pomocí programu Primer Blast [84]

### 4.1.3 Pomůcky

- $\alpha$ Plastic™ SAMPLE qPCR 8-well strip tube LP 0,1C, Optical Caps, Elisabeth Pharmacon, spol. s r. o., Česká republika
- Azure Imager c400-600, Azure biosystem
- Biosan DNA/RNA UV-CLEANER UVC/T-AR
- Centrifuga Z216 MK, Hermle, Německo
- Combi-spin FVL-2400N, Biosan
- Exsikátor s vývěvou membránovou, KNF Lab, USA
- formy na elektroforézu D2 a B2, Owl Separation systems, Inc., USA
- LightCycler Nano Real-Time PCR System, Roche, vyhodnocovací software: LightCycler® Nano Software 1.1
- Lyofilizátor, Labconco (USA)
- Mikropipety Finnpiquette F2, Thermo Fisher Scientific, USA
- Mikrovlnná trouba SMW 5020, Sencor
- Mini inkubátor 230 V, Labnet, USA
- NanoDrop Spectrophotometer 2000, Thermo Scientific, USA
- Realtime PCR machine RotorGene 6000, Corbett Research, Austrálie
- Stolní mixér Blendic team ETA4011/10, ETA, Česká republika
- Sušárna Binder FD 53, Binder
- Váhy KERN 440-33N, 200 digitální
- Váhy analytické HR-120-EC, Helago, Česká republika
- Vortex MS2 Minishaker, IKA, Works, NNC, USA
- Zdroj Enduro Power Supplies 300V, Labnet International, USA
- HPLC/PDA sestava:
  - Sestava HPLC Dionex UltiMate 3000 series, Thermo Scientific (USA)
  - PDA detektor Vanquish, Thermo Scientific (USA)
  - Autosampler Dionex UltiMate 3000, Thermo Scientific (USA)
  - Pump UltiMate, Thermo Scientific (USA)
  - Kolona Kinetex F5, 2,6  $\mu$ m, 4,6 x 150 mm, Phenomenex (USA)

Uživatelský a vyhodnocovací systém Chromeleon

- Lednice a mrazák k uchování vzorků DNA
- Mikrozkmavky Eppendorf
- Homogenizační kuličky
- Laboratorní sklo
- Chladicí stojánek
- Pipety a špičky
- Další laboratorní pomůcky (sterilní buničina, pinzeta...)

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Příprava vzorků pro analýzu

Rostlinný materiál (jahody, meruňky, maliny, jablka) byl po nakoupení před samotnou přípravou vzorků uchovávan v mrazáku při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , aby se zamezilo hnilobě. U jablka se objevilo hnědnutí dužiny a změknutí pletiva po uchovávaní v mrazáku tzv. moučnatost.

Poté bylo ovoce rozmrazeno a nakrájeno na malé kousky skalpelem, který byl předtím ořen sterilní buničinou s ethanolem. Tyto malé kousky byly buď rozmixovány na pyré nebo byly uchovávány pro další práci ve sterilních falkonkách v mrazáku. Totéž skladování platilo i pro ovocné pyré.



Obrázek 4 – Použité druhy ovoce

Pro izolaci ovocné DNA byly využity malé kousky ovoce. Pro přípravu modelových směsí ovocných přesnídávek byla využita ovocná pyré. Bylo připraveno sedm modelových směsí meruňkovo-jablečného pyré, u kterých byly poměry meruňkového pyré ku jablečnému pyré: 0:100, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50 a 100:0. Obdobně byly připraveny modelové směsi jahodovo-malinového pyré. Do centrifugačních falkonek byly vždy připraveny 4 gramy modelové směsi, což znamenalo např. u poměru 50:50 2 g meruňkového pyré a 2 g jablečného pyré.

Z komerčních promíchaných vzorků bylo odebráno sterilní lžící po 4 g do centrifugačních zkumavek (k analýze TPC, TFC), dále po 1 g pro analýzu pomocí DNA. Pro HPLC analýzu fenolických látek bylo odebráno 15 ml vzorků. Komerční vzorky byly po otevření uchovávány v lednici při  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 4.2.2 „Brief protocol“ z kitu

K izolaci rostlinné DNA z plodů ovoce byl použit EliGene Plant DNA Isolation Kit. Postup, množství vzorku a použité objemy pufrů byly dodržovány dle návodu, který byl přiložen k tomuto kitu. Vzorky jednotlivého ovoce byly izolovány v tripletech a vzorky modelových směsí a komerčních produktů byly izolovány pouze jednou, kvůli vyšší pořizovací ceně izolačního kitu. U komerčních vzorků a některých meruňkovo-jablečných směsích byla izolace DNA zopakována. Při tom byl pro izolaci DNA použit sediment zbavený tekuté složky. Pokud by totiž komerční vzorky byly naředěné vodou, získali bychom tak vyšší koncentraci rostlinné hmoty, a díky tomu by i koncentrace izolované DNA mohla být vyšší.

K homogenizaci 0,05 g předem připraveného rostlinného materiálu bylo použito 0,2 g homogenizačních kuliček a dále také kopist (součást kitu) a homogenizační pufr, který sloužil k rozmělnění vzorku. Homogenizační pufr zabraňoval degradaci nukleových kyselin a také pomáhal odstranit proteiny a fenolické látky [75].

Dále následovala kompletní lýze buněk, které bylo docíleno pomocí pufru obsahující mimo jiné dodecylsírán sodný (SDS). Vzorky s pufrem byly dány do vyhřátého inkubátoru (65 °C), aby SDS netvořil bílý precipitát [75].

Vzorky byly centrifugovány a k odebranému supernatantu byl přidán pufr sloužící k odstranění inhibitorů. Docházelo zde k vysrážení organických non-DNA a anorganických složek (polysacharidy, fenolické látky a proteiny), které byly odstraněny ze vzorků centrifugací, protože zůstaly součástí peletu [75].

Supernatant byl odebrán a k němu byl přidán vázací pufr obsahující chaotropní soli, které umožňují zároveň vytvářet vazby se záporně nabitou DNA i se záporně nabitou silikátovou membránou. Do mikrokolony byl dávkován supernatant, který byl poté centrifugován. Během centrifugace rostlinná DNA přilnula k silikátové membráně a odstředěný roztok procházející skrz membránu byl vylit [75].

Spin filtr byl přemístěn do nové mikrozkušavky a na membránu byl nanesen promývací roztok na bázi ethanolu, který pročistil navázanou DNA od nečistot. Promývání DNA navázané na silikátové membráně ve spin filtru se uskutečnilo celkem dvakrát.

Vysušení membrány spin filtru od ethanolového zbytku se dosáhlo dvouminutovou centrifugací při vysokých otáčkách. Vysušením membrány se zvýšila výtěžnost DNA v následujícím kroku [75].

K uvolnění navázané DNA na membráně spin filtru sloužil eluční pufr obsahující 10 mM Tris, která uvolnila navázanou DNA a ta přešla spolu s pufrem do čisté zkumavky. DNA byla uvolněna díky tomu, že už nebyly přítomny soli nebo ethanol [75].

### **4.2.3 Spektrofotometrické stanovení rostlinné DNA**

Koncentrace a čistota izolované DNA byly zjištěny spektrofotometrickou metodou pomocí přístroje nanospektrofotometru Nanodrop 2000. Jako blank byl použit eluční pufr (10 mM Tris), který byl součástí izolačního kitu. Objem nanášeného vzorku nebo blanku na spodní rameno přístroje byl vždy 1,5  $\mu$ l.

Z programu Nanodrop 2000 byly zjištěny hodnoty koncentrace DNA a hodnoty poměrů absorpance  $A_{260}/A_{280}$  a  $A_{260}/A_{230}$ , které vypovídají o čistotě vzorků.

### **4.2.4 Příprava směsi pro qPCR a multiplex qPCR**

Ve sterilním boxu byla připravena PCR směs bez přidání DNA podle následující tabulky (Tabulka 6). Všechny PCR reakce byly prováděny s MasterMix SYTO-9 obsahující interkalační barvivo. Celkový objem vzorků pro qPCR byl 25  $\mu$ l a vzorky byly pipetovány do speciálních 0,2 ml mikrozkušavek určených pro PCR. Rozpipetovaná PCR směs před přidáním DNA byla chlazená v kovovém stojánku, aby se zamezilo vzniku dimerů primerů. Ve druhém sterilním boxu určeném pro práci s DNA byla napipetována DNA do všech mikrozkušavek obsahující PCR směs kromě negativní kontroly.

Tabulka 6 – Použité komponenty a objemy pro namíchání PCR směsi

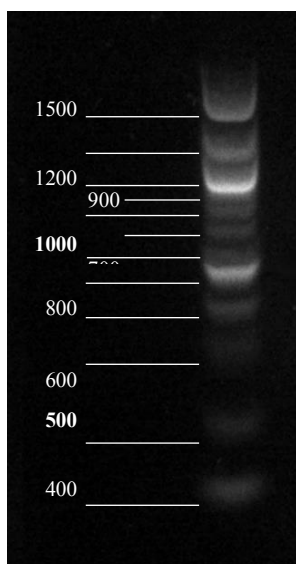
Komponenty	Objem použitých komponent pro PCR směs (μl)	
	PCR	Multiplex PCR
PCR voda	9,5	6,5
qPCR 2x SYTO-9	12,5	12,5
primer F1 (10 pmol/μl)	1	1
primer R1 (10 pmol/μl)	1	1
primer F2 (10 pmol/μl)	-	1
primer R2 (10 pmol/μl)	-	1
matrice DNA	1	2 (1 + 1)

#### 4.2.5 Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR

Byl připraven 1,2% agarosový gel podle velikosti formy (0,84 g agarosy a 70 ml 0,5× TBE pufru nebo 1,2 g agarosy a 100 ml 0,5× TBE pufru). V mikrovlnné troubě byla suspenze agarosy zahřáta k varu celkem pětkrát, dokud nebyla agarosa zcela rozpuštěna. Po ochladnutí roztoku na teplotu mezi 60-70 °C bylo přidáno interkalační barvivo GelRed v množství odpovídajícím desetitisícině objemu gelu. Gel byl pomalu nalit do formy. Poté byl vložen hřebínek, gel byl ponechán na rovné podložce do zatuhnutí (cca 20 minut).

Z gelu byl opatrně vyjmut hřebínek a za sucha byly do jamek nanášeny vzorky a DNA standard. Amplikony (produkty PCR reakce) byly smíchány s nanášecím pufrům v poměru 5:1 (25 μl PCR produktu a 5 μl nanášecího pufru). Z takto připravených vzorků bylo pro elektroforézu použito 15 μl. Délkového standardu bylo naneseno vždy 5 μl.

Ke zjištění velikosti amplifikovaného produktu sloužil velikostní DNA standard 100 bp od firmy Malamate (ČR). Tento žebříček obsahoval fragmenty DNA o velikosti: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 a 1500 bp, při tom fragmenty o velikosti 500 a 1000 bp jsou výraznější než ostatní (viz Obrázek 5). Do jamky bylo vždy naneseno 5 μl velikostního standardu.



Obrázek 5 – Velikostní standard 100 bp, Malamate

V dalším kroku byl gel s nanesenými vzorky vložen do elektroforetické vany a byl zalit 0,5× TBE pufrům tak, aby hladina dosahovala alespoň půl centimetru nad samotný gel.

Na zdroji bylo nastaveno napětí 60–80 V a elektroforéza trvala přibližně 2 hodiny podle velikosti formy. Po ukončení elektroforézy byl gel vložen do transluminátoru (Azure c600) a fluorescence byla detekována v UV oblasti při 302 nm. Gel byl vyfocen a vyhodnocen pomocí programu AutoCad. V tomto programu byla změřena vzdálenost, kterou daný fragment DNA urazil od místa nanesení. Vzdálenost byla odečítána ke spodní hranici bandu. Pomocí programu Excel byla vypočítána délka produktu z lineární rovnice sestavené pro dva body žebříčku.

#### 4.2.6 Ověření amplifikovatelnosti izolované DNA pomocí primerů specifických pro ITS2 region rostlin

Jako pozitivní kontrola byla použita DNA z plodu meruňky, jahody a evropské borůvky. Amplifikace DNA trvala 35 cyklů pro jahodovou a meruňkovou DNA a 40 cyklů pro malinovou a jablkovou DNA podle následující tabulky (Tabulka 7). Pro modelové směsi a komerční vzorky byla amplifikace provedena také ve 40 cyklech. Po ukončení PCR reakce následovala analýza křivek tání. Teplota byla postupně zvyšována od 50–99 °C s krokem 1 °C.

Tabulka 7 – PCR program pro univerzální primery ITS2

Krok	Program	podmínky jahoda + meruňka		podmínky malina + jablko	
		Teplota (°C)	Čas (s)	Teplota (°C)	Čas (s)
1.	úvodní denaturace	95	300	95	300
2.	Denaturace	95	30	95	30
3.	hybridizace primeru	56–46	30	56 – 61	30
4.	syntéza řetězce DNA	72	30	72	30
5.	závěrečná elongace	72	300	72	300

Velikost produktů PCR byla ověřena pomocí gelové elektroforézy na 1,2% agarosovém gelu. Na gel byl společně s amplifikovanou DNA nanesen i velikostní standard 100 bp (Obrázek 5).

#### 4.2.7 Výběr vhodných primerů specifických pro jahodu

Sekvence primerů specifických pro jahodu i teplotní profil qPCR byl převzat z publikace Sargent, 2006 [67] uvedených v tabulce použitých primerů (Tabulka 5). Směs pro PCR byla namíchána podle následující tabulky (Tabulka 6), kdy koncentrace primerů byla 400 nM. Amplifikace byla provedena v 40 cyklech podle následující tabulky (Tabulka 8).

Tabulka 8 – PCR program pro specifické jahodové primery

krok	Program	podmínky	
		Teplota (°C)	Čas (s)
1.	úvodní denaturace	94	120
2.	Denaturace	94	30
3.	hybridizace primeru	50–45	45
4.	syntéza řetězce DNA	72	60
5.	závěrečná elongace	72	300

Po ukončení amplifikace byla provedena analýza křivek tání, při níž byla postupně zvyšována teplota od 50 °C do 99 °C s krokem 1 °C. Poté byly vzorky analyzovány pomocí elektroforézy na 1,2% agarosovém gelu a jako velikostní standard byl použit 100 bp žebříček.

#### 4.2.8 Výběr vhodného jahodového primeru a optimalizace amplifikace DNA

Komponenty byly namíchány podle předchozí tabulky (Tabulka 6) za použití primerů ABP1A a APX1B o koncentraci 400 nmol/l. Amplifikace byla uskutečněna ve 40 cyklech a teplotní profil je uveden v následující tabulce (Tabulka 9). Po ukončení amplifikace byla provedena analýza křivek tání, při které byla postupně zvyšována teplota od 50 °C do 99 °C s krokem 1 °C. Pro ověření velikosti byla amplifikovaná DNA nanesena na 1,2% agarosový gel.

Tabulka 9 – Optimalizace PCR programu pro jahodové primery ABP1A a APX1B

Krok	Program	A) podmínky		B) podmínky	
		Teplota (°C)	Čas (s)	Teplota (°C)	Čas (s)
1.	úvodní denaturace	94	120	94	120
2.	Denaturace	94	30	94	30
3.	hybridizace primeru	65–60	45	65-55	45
4.	syntéza řetězce DNA	72	60	72	60
5.	závěrečná elongace	72	300	72	300

#### 4.2.9 Výběr vhodných specifických primerů pro meruňkovou DNA

Sekvence primerů specifických pro meruňku i teplotní profil qPCR byl převzat z publikace Muñoz Sanz, 2016 [68].

Komponenty byly namíchány podle tabulky (Tabulka 6) a koncentrace primerů byla 400 nmol/l. Amplifikace byla provedena ve 40 cyklech podle následující tabulky (Tabulka 10). Po ukončení zmožení DNA následovala analýza křivek tání, při které byla postupně zvyšována teplota od 50 °C do 99 °C po 1 °C. Poté byly vzorky analyzovány pomocí elektroforézy.

Tabulka 10 – PCR program pro specifické meruňkové primery

krok	program	podmínky	
		teplota (°C)	čas (s)
1.	úvodní denaturace	94	120
2.	denaturace	94	30
3.	hybridizace primeru	60–55 °C	45
4.	syntéza řetězce DNA	72	60
5.	závěrečná elongace	72	300

#### 4.2.10 Výběr vhodné koncentrace meruňkového primeru AGS6

Komponenty byly namíchány podle Tabulka 6, kdy koncentrace primerů byla 400, 300, 200 a 100 nmol/l. Nastavení programu PCR bylo totožné jako v předchozí kapitole 0.

#### 4.2.11 Výběr vhodných specifických primerů pro malinovou DNA

Sekvence primerů specifických pro malinu i teplotní profily qPCR byly převzaty z publikací Zheng, 2008; Vilanova, 2008; Fuentes, 2015 [72], [73], [74].

Komponenty byly namíchány podle tabulky (Tabulka 6) a koncentrace primerů byla 400 nmol/l.

Amplifikace PCR směsi pro malinové primery Ri18S a RiACO1 byla provedena ve 35 cyklech podle následující tabulky a pro primery Ri1 a EPp CU1830 byla provedena ve 37 cyklech. Poté následovala analýza křivek tání, při níž byla vzorkům postupně zvyšována teplota od 50 °C do 99 °C s krokem 1 °C. Amplifikovaná DNA byla nanášena na 1,2% agarosový gel.

*Tabulka 11 – Program PCR pro specifické malinové primery*

Krok	Program	Ri18S a RiACO1		Ri1 a EPp CU1830	
		teplota (°C)	čas (s)	teplota (°C)	čas (s)
1.	úvodní denaturace	95	600	94	300
2.	Denaturace	95	2	94	30
3.	hybridizace primeru	65	15	58	30
4.	syntéza řetězce DNA	72	25	72	30
5.	závěrečná elongace	-	-	72	420

#### 4.2.12 Výběr vhodných specifických primerů pro jablokovou DNA

Sekvence primerů specifických pro jablko i teplotní profily qPCR byly převzaty z publikací (Zhang, 2016; Dong, 2018; Ma, 2018) [69], [70], [71].

Komponenty byly namíchaný podle tabulky (Tabulka 6) a koncentrace primerů byla 400 nmol/l. Amplifikace DNA s FT MDP a MDP byla provedena ve 38 cyklech a pro jablečné primery MD FKBP42, MD FKBP53 a MD FKBP65 byla provedena ve 40 cyklech podle následující tabulky (Tabulka 12). Po ukončení amplifikace byla provedena analýza křivek tání postupným zvyšováním teploty od 50 °C do 99 °C po 1 °C.

U amplifikované DNA byla zjištěna jejich délka elektroforeticky nanášením na 1,2% agarosový gel.

*Tabulka 12 – Program PCR pro specifické jablečné primery*

Krok	Program	FT MDP a MDP		MD FKB(42/53/65)	
		teplota (°C)	čas (s)	teplota (°C)	čas (s)
1.	úvodní denaturace	94	120	95	180
2.	denaturace	94	30	95	10
3.	hybridizace primeru	55	30	58	30
4.	syntéza řetězce DNA	72	30	72	15
5.	závěrečná elongace	72	60	72	180

#### 4.2.13 Test specifity zvolených specifických primerů - APX1B a AGS6

Koncentrace jahodového primerů APX1B byla 200 nM (což je dostatečná koncentrace primeru). Byly připraveny vzorky s meruňkovou, jablokovou a malinovou DNA, pozitivní kontrola a negativní kontrola. Teplotní profil qPCR a počet cyklů byl totožný jako v předchozí kapitole 4.2.8.

Koncentrace meruňkového primeru AGS6 a teplotní profil qPCR byl totožný jako i pro test specifity pro jahodový primer APX1B (viz kapitola 4.2.12). K PCR směsi byla přidána jahodová, malinová a jabloková DNA a do pozitivní kontroly byla přidána meruňková DNA.

Po ukončení amplifikace byla provedena analýza křivek tání, při které byla teplota postupně zvyšována od 50 °C do 99 °C po 1 °C. Poté byly vzorky elektroforeticky analyzovány.



#### 4.2.14 Test specificity zvolených specifických primerů - Ri1 a RiACO1

Koncentrace primerů v PCR směsi byla 400nM. Amplifikace PCR směsi s primerem Ri1 byla provedena ve 37 cyklech a s primerem RiACO1 proběhla ve 35 cyklech podle následující tabulky (Tabulka 13). Poté byly zjištěny u amplikonů teploty tání postupným zvyšováním teploty o 1 °C od 50–99 °C. U PCR produktů byla pomocí agarosové elektroforézy zjištěna jejich délka.

Tabulka 13 – Teplotní profil amplifikace DNA s malinovými primery

krok	Program	Podmínky pro Ri1		Podmínky pro RiACO1	
		teplota (°C)	čas (s)	teplota (°C)	čas (s)
1.	úvodní denaturace	94	300	95	600
2.	Denaturace	94	30	95	2
3.	hybridizace primeru	60–55	45	60	15
4.	syntéza řetězce DNA	72	60	72	25
5.	závěrečná elongace	72	420	-	-

#### 4.2.15 Test specificity zvoleného specifického primerů FT MDP

Koncentrace jablečného primerů FT MDP v master mix byla 400 nM. Teplotní profil qPCR, počet cyklů amplifikace a analýza křivek tání byly totožné jako v kapitole 4.2.12. Po amplifikaci byly vzorky nanášeny na 1,2% agarosový gel.

#### 4.2.16 Multiplex PCR

Byly připraveny celkem dva typy master mix se dvěma páry primerů. PCR směs obsahovala celkem 4 µl primerů a 2 µl DNA a celkový objem použitých komponentů byl 25 µl (viz Tabulka 6). Postup přípravy směsi je uveden v kapitole 4.2.4.

Spolu byly použity jahodový primer APX1B a malinový primer RiACO1. Pro multiplex (duplex) PCR byly otestovány dva různé teplotní profily (viz kapitola 4.2.8 a 4.2.11).

U teplotního profilu optimalizovaného pro jahodový primer APX1B bylo nasedání primeru při teplotě 60–55 °C (touchdown) oproti teplotnímu profilu, který je uveden v kapitole 4.2.8. U teplotního profilu z kapitoly 4.2.11 byla proti předchozímu teplotnímu programu snížena teplota nasedání primeru na 55 °C.

Dohromady byly použity meruňkový primer AGS6 a jablečkový primer FT MDP. Pro duplex PCR byly otestovány dva odlišné teplotní profily (viz kapitola 4.2.9 a 4.2.12).

Pro multiplex PCR, kde byly amplifikovány modelové směsi a komerčních vzorky byl vybrán teplotní profil uvedený v kapitole 4.2.9.

#### 4.2.17 Vysokorozlišovací analýza křivek tání (PCR-HRM)

Vysokorozlišovací analýza křivek tání byla provedena s vícedruhovými vzorky ovocné DNA, u kterých nebylo možné rozeznat teplotu tání amplifikovaného specifického produktu při analýze křivek tání s krokem po 1 °C. Tyto vzorky byly opatrně přepipetovány do speciálních zkumavek (detekce přes víčko) určených pro tuto analýzu.

Program pro analýzu křivek tání (HRM) byl nastaven podle následující tabulky (Tabulka 14).

Tabulka 14 – Program pro vysokorozlišovací analýzu křivek tání

Program HRM	
Počáteční teplota	50 °C/ 1 min
Krok	0,01 °C/ 1 s
Konečná teplota	99 °C

Vyhodnocení výsledků HRM analýzy bylo provedeno pomocí softwaru LightCycler® Nano Software 1.1. Analýza křivek tání probíhala tak, že po skončení analýzy byly v daném programu ručně označeny oblasti píků pro jednodruhové ovocné DNA (vzorky 0:100 a 100:0). Pomocí analýzy teplot tání byla nalezena ve zvoleném teplotním intervalu nejvyšší teplota příslušné křivky tání. Analyzovány byly zkušební duplex PCR s rozdílnými teplotními profily a dále také modelové směsi a komerční vzorky.

#### 4.2.18 Charakterizace modelových směsí a komerčních vzorků

##### 4.2.18.1 Stanovení obsahu sušiny

Centrifugační zkumavky (15 ml) a víčka byly předem vysušeny v exsikátoru a přesně zváženy pomocí analytických vah. Do těchto zkumavek byly připraveny 4 gramy modelových směsí nebo komerčních vzorků. Vzorky byly zváženy a centrifugovány při 10 000 rpm po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. U modelových vzorků obsahující jablko bylo nutné dobu centrifugace prodloužit o dalších 5 minut, aby došlo k rozdělení pevného a kapalného podílu.

Supernatant byl opatrně odebrán pomocí pipet pro další analýzy uvedené v následujících kapitolách. Zkumavky se sedimentem byly umístěny do vyhřáté sušárny na 60 °C. Po 66 hodinách byly vzorky zcela vysušené do konstantní hmotnosti a byly umístěny do exsikátoru a následovalo vážení na analytických vahách. Hmotnost sušiny byla vypočítána z rozdílů hmotnosti.

##### 4.2.18.2 Analýza celkových fenolických látek

Množství celkových fenolických látek v modelových ovocných směsích bylo stanoveno spektrofotometrickou metodou, která je založena na reakci vzorku s Folin-Ciocaltauovým činidlem. Tuto reakci lze spektrofotometricky sledovat díky modrému zabarvení, které vzniká v zásaditém prostředí. Jako standard byla zvolena kyselina gallová. Kalibrační křivka byla připravena ze zásobního vodného roztoku o koncentraci 1 mg·ml<sup>-1</sup>. K sestavení kalibrační křivky byly připraveny roztoky kyseliny gallové v rozmezí koncentrací 0,1 až 0,7 mg·ml<sup>-1</sup>.

Postup práce byl následovný: do zkumavek byly naváženy 4 gramy ovocných pyré, které byly poté centrifugovány při 10 000 rpm po dobu 30 minut při laboratorní teplotě.

Supernatant byl odebrán do čisté zkumavky a dále byl analyzován. Pro samotnou analýzu byly jahodovo-malinové vzorky zředěny pětkrát, meruňkovo-jablečné vzorky nebyly ředěny a komerční vzorky byly zředěny dvakrát.

Do zkumavky byl napipetován 1 ml destilované vody, 1 ml naředěného roztoku Folin-Ciocaltauova činidla (1:9) a 50 µl vzorku (supernatantu). Obsah zkumavek byl promíchán a inkubován 5 minut.

Poté byl k obsahu zkumavek přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Obsah zkumavek byl pořádně promíchán a 15 minut byl inkubován.

Po čtvrt hodině byla proměřena absorbance vzorků při vlnové délce 750 nm, kdy jako blank sloužil vzorek, kde bylo použito 50 µl destilované vody místo 50 µl vzorku.

#### 4.2.18.3 Analýza celkových flavonoidů

Celkového množství flavonoidů v ovocných směsích bylo stanoveno spektrofotometricky. Tato metoda je založena na reakci vzorku s dusitanem a hlinitou solí. Změnu zbarvení roztoku dusitanu sodného s hlinitou solí lze sledovat spektrofotometricky. Jako standard byl zvolen katechin, u kterého byl připraven zásobní vodný roztok o koncentraci  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Kalibrační křivka katechinu se pohybovala v koncentračním rozmezí mezi  $0,05\text{--}3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

K analýze celkových flavonoidů ve vzorcích byly použity totožné supernatanty i ředění jako v předchozí kapitole (viz 4.2.18.2).

Do zkumavky bylo napipetováno  $100 \mu\text{l}$  vzorku (supernatantu),  $300 \mu\text{l}$  destilované vody a  $40 \mu\text{l}$  5% roztoku dusitanu sodného. Obsah zkumavky byl promíchán a 5 minut inkubován.

Poté bylo do zkumavky přidáno  $40 \mu\text{l}$  10% roztoku chloridu hlinitého. Zkumavka byla znovu promíchána a po 5 minutách bylo do ní přidáno  $300 \mu\text{l}$  5% roztoku hydroxidu sodného a  $200 \mu\text{l}$  destilované vody. Zkumavka byla pořádně promíchána a 15 minut byla inkubována.

Absorbance u takto připraveného roztoku byla proměřena proti slepému vzorku při vlnové délce  $510 \text{ nm}$ . Slepý vzorek byl připraven obdobně jako ostatní vzorky, jen  $100 \mu\text{l}$  vzorku bylo nahrazeno destilovanou vodou.

#### 4.2.19 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vzorky pro HPLC byly připraveny stočením modelových a komerčních pyré při  $10\,000 \text{ rpm}$  po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Po stočení vzorků byly ze vzniklého supernatantu odebrány 3 ml, které můžete vidět na obrázku (Obrázek 6). Před samotnou přípravou methanolových extraktů byly tyto vzorky (supernatanty) během dvou dnů vysušeny pomocí lyofilizátoru. Tento krok měl zajistit vyšší koncentraci fenolických látek.



Obrázek 6 – Supernatanty meruňkovo-jablečné, uprostřed jahodovo-malinové a komerční směsi

Do 15 ml zkumavky s lyofilizovaným vzorkem byly napipetovány 2 ml n-hexanu. Tato směs byla důkladně promíchána a protřepávána po dobu 5 minut. Dále byl přidán 1 ml methanolu, vzorky byly krátce protřepány a inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí 5 minut byly vzorky zcentrifugovány  $4400 \times g$  po dobu 3 minut. Dolní methanolová fáze byla opatrně odpipetována do čisté vialky, která byla vložena k analýze do autosampleru.

K zjištění přítomnosti fenolických látek v ovocných výživách byla využita HPLC sestava Dionex UltiMate 3000 od firmy Thermo Fischer Scientific s PDA detektorem. Látky byly detekovány při vlnových délkách  $260 \text{ nm}$ ,  $280 \text{ nm}$ ,  $300 \text{ nm}$  a  $680 \text{ nm}$ . Analýza probíhala na koloně Kinetex F5 o rozměrech  $150 \times 4,6 \text{ mm}$ , která byla umístěna v termostatu nastaveném na  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . Pro lepší separaci byla využita gradientová eluce s průtokem mobilní fáze  $0,4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Jako mobilní fáze v HPLC kvalitě byly použity: fáze A skládající se z  $0,1\%$  vodného roztoku (miliQ) kyseliny trifluoroctové a fáze B skládající se z acetonitrilu.

Gradientová eluce pro dávkování mobilních fází byla uskutečněna s následujícím časovým harmonogramem: 10 % B, 0-5 min; 12-25 % B, 5-10 min; 25-40 % B, 10-15 min; 40-55 % B, 15-20 min; 55-70 % B, 20-22 min a nakonec 70-10 % B, 22-30 min.

Pomocí autosampleru bylo dávkováno 20  $\mu$ l vzorku. Termostat byl vyhřát na teplotu 35 °C a doba analýzy trvala 30 minut. Výsledná data byla zpracována a vyhodnocena pomocí programu Chromeleon. Identifikace a kvantifikace jednotlivých fenolických látek byla provedena s využitím komerčně zakoupených standardů.

### 4.3 Výsledky a diskuze

Předložená diplomová práce byla zaměřena na výběr vhodných specifických primerů pro detekci jahodové, meruňkové, jablečné a malinové DNA. V této práci byla snaha o výběr a případnou optimalizaci programu PCR, aby vybrané specifické primery mohly být použity ve dvojicích pro duplex PCR.

Dále byly připraveny dvousložkové ovocné směsi, které měly sloužit jako modelová pyré. Bylo vytvořeno celkem sedm jahodovo-malinových pyré a sedm meruňkovo-jablečných pyré. Tyto modelové směsi sloužili k zjištění funkčnosti metody a k porovnání s komerčními dětskými výživami. Celkem bylo vybráno šest komerčních dětských výživ s různým podílem ovocné složky.

Pro charakteristiku modelových a komerčních vzorků sloužilo stanovení obsahu sušiny, celkový obsah fenolických látek a celkový obsah flavonoidů. Dále byly pomocí HPLC detekovány vybrané fenolické látky ve vzorcích. Tyto metody sloužily jako srovnávací metody k navržené duplex PCR.

#### 4.3.1 Koncentrace a čistota izolované rostlinné DNA

Koncentrace izolované ovocné DNA byly naměřené pomocí NanoDropu. Postup měření je uveden v kapitole 4.2.3.

Tabulka 15 – Naměřené koncentrace a čistota ovocné DNA

DNA	Vzorek	koncentrace c (ng/μl)	260/280	260/230
jahoda	1.	3,80	2,19	0,88
	2.	4,90	2,06	1,18
	3.	4,40	2,29	1,35
	průměr	4,37 ± 0,55	2,18 ± 0,12	1,14 ± 0,24
meruňka	1.	1,20	1,51	0,43
	2.	0,60	1,26	0,26
	3.	0,90	1,52	0,40
	průměr	0,90 ± 0,30	1,43 ± 0,15	0,36 ± 0,09
malina	1.	18,60	10,15	0,41
	2.	8,50	2,09	1,31
	3.	9,50	2,35	1,10
	průměr	12,20 ± 5,57	4,86 ± 4,58	0,94 ± 0,47
jablko	1.	2,60	1,91	0,54
	2.	1,00	-	0,31
	3.	0,80	10,15	0,41
	průměr	1,47 ± 0,99	4,02 ± 5,39	0,42 ± 0,12

Jak je patrné z tabulky (Tabulka 15), tak koncentrace ovocné DNA se pohybují v řádu jednotek nanogramů na mikrolitr. I když se jednalo o triplikáty, tak naměřené koncentrace se od sebe lišily především u malinové DNA. Tento rozdíl byl pravděpodobně způsoben tím, že součástí rostlinného vzorku byla kromě dužniny i slupka a semena (jahoda, malina). Díky tomu nebylo dosaženo úplné homogenizace vzorku.

Abnormální poměry (jiné než 1,8 pro DNA) absorbancí 260/280 indikují většinou kontaminaci vzorku proteinem nebo nějakým činidlem použitým při izolaci DNA.

U meruňkové DNA je poměr absorbcí 260/280 nižší než 1,8, což indikuje případné znečištění např. bílkovinami nebo jinými látkami absorbujícími okolo 280 nm. Pravděpodobným vysvětlením je velmi nízká koncentrace nukleových kyselin, která je nižší než 10 ng/μl. Pokud by byla hodnota poměru 260/280 nižší pouze o 0,2–0,3, tak by to mohlo být způsobeno kyselým pH vzorku [76].

Ostatní vzorky malinové, jahodové a jablečné DNA mají vyšší hodnotu poměru absorbcí 260/280 než 1,8. Vysoké hodnoty tohoto poměru 260/280 by neměly naznačovat takový problém jako když jsou detekovány nižší hodnoty. Jestliže je poměr absorbcí vyšší než 1,8 pouze o 0,2–0,3, tak to může být způsobeno zásaditým pH vzorku [76].

Pro další práci se jeví jako vhodné vzorky: 2. vzorek jahodové DNA., 1. a 3. vzorek meruňkové DNA, 2. vzorek malinové DNA 1. vzorek jablečné DNA.

Následující tabulka obsahuje naměřené hodnoty koncentrací DNA u modelových směsí a u komerčních ovocných výživ U vzorků, u kterých nebyla potvrzena amplifikovatelnost izolované DNA pomocí primerů specifických pro ITS2 region rostlin, byla izolace zopakována. DNA byla izolována ze sedimentu, který vznikl centrifugací vzorku (10 000 rpm, 30 minut, při pokojové teplotě). Z něho bylo odebráno 50 mg pro izolaci. Naměřené koncentrace s poměry absorbcí jsou uvedeny pro tyto vzorky v závorce. A tato izolovaná DNA ze sedimentu byla použita pro další analýzy.

Jak lze vidět v následující tabulce (Tabulka 16), tak izolace ovocné DNA ze sedimentu pomohla především komerčním vzorkům, u kterých se zvýšila naměřená koncentrace, ale ovlivnilo to i čistotu izolované DNA.

*Tabulka 16 – Naměřené koncentrace a čistota izolované DNA*

DNA	Vzorek	koncentrace c (ng/μl)	260/280	260/230
meruňka a jablko	100:0	1,8	2,43	0,30
	50:50	1,6	1,68	0,40
	40:60	2,5 (1,3)	1,71 (2,49)	0,35 (0,34)
	30:70	2,6 (0,7)	1,15 (2,31)	0,41 (0,3)
	20:80	2,2 (3,5)	1,97 (3,73)	0,51 (0,33)
	10:90	2,2 (1,7)	1,86 (2,6)	0,35 (0,29)
	0:100	1,3	1,70	0,33
jahoda a malina	100:0	10,3	1,88	0,90
	50:50	8,2	2,21	0,70
	40:60	11,0	2,08	0,96
	30:70	7,2	1,80	0,67
	20:80	8,5	2,00	0,81
	10:90	7,0	1,83	0,86
	0:100	10,5	1,86	0,95
komerční vzorky	1	1,8 (3,6)	2,61 (1,85)	0,54 (0,37)
	2	3,6	2,02	0,51
	3	2,1 (2,5)	1,52 (2,19)	0,32 (0,34)
	4	1,3 (3,2)	1,83 (1,66)	0,34 (0,49)
	5	1,2 (2,1)	1,87 (2,24)	0,28 (0,47)
	6	1,0 (2,7)	2,82 (2,33)	0,33 (0,43)

Modelové směsi meruňkovo-jablečné DNA se pohybovaly od 1,3 do 2,6 ng/μl, což odpovídá přibližně i koncentracím DNA zjištěné u čisté meruňky a jablka. Většina vzorků se dá považovat za čisté podle poměru A260/A280.

U 100% meruňky je poměr absorbancí vyšší než 1,8, což může indikovat znečištění RNA, to může být způsobeno nízkou koncentrací vzorku, při které se vyskytuje vyšší chybovost. Pro meruňku s jablkem 30:70 byl poměr stanoven na 1,15, což je nižší hodnota než 1,8, což svědčí např. o přítomnosti proteinů ve vzorku.

Modelové jahodovo-malinové směsi měly celkově vyšší koncentrace než předchozí meruňkovo-jablečné směsi, což taktéž přibližně odpovídá naměřeným koncentracím pro jahodovou a malinovou DNA. Z poměru absorbancí 260/280 se dá usuzovat, že se jedná o čisté vzorky, kromě vzorku 50:50, který by mohl obsahovat např. RNA.

Komerční vzorek 3 – Hipp (jablko, jahoda, banán, malina) měl index 260/280, což svědčí o kontaminaci proteiny. Vzorky 1 – Hello (jablko, jahoda), 2. – Sunárek (jablko, jahoda) a 6 – Cvrček (meruňka, jablko) měly poměr absorbancí A260/A280 vyšší než 1,8, z čehož lze usuzovat buď chybu měření přístrojem z důvodu nízké koncentrace, přítomnost RNA nebo přítomností jiných sloučenin absorbujících při 260 nm.

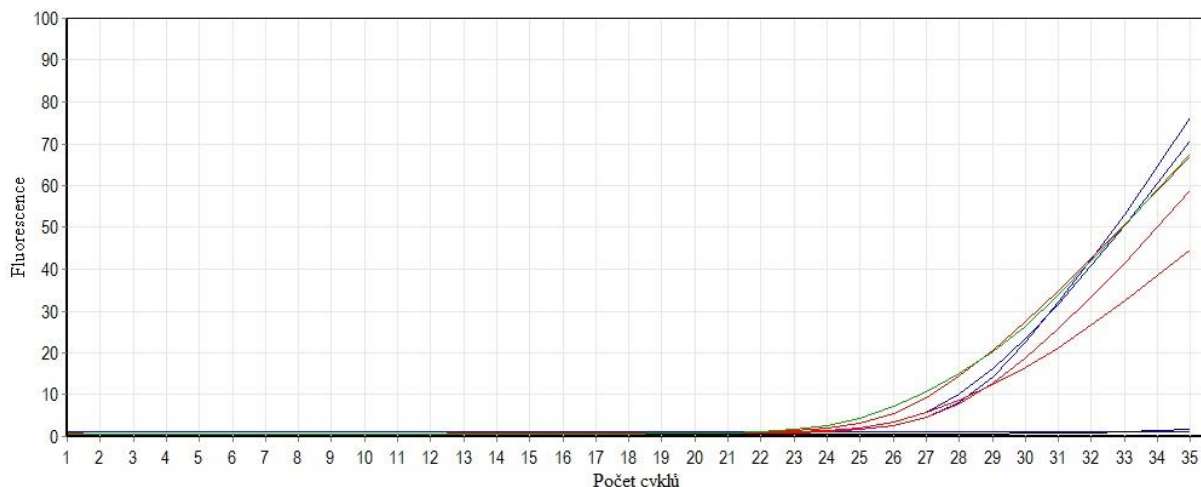
Všechny modelové směsi i komerční vzorky měly poměr absorbancí A260/A230 nižší než 1,8 což svědčí o kontaminaci solemi nebo rozpouštědly.

### 4.3.2 Ověření amplifikovatelnosti izolované DNA pomocí primerů specifických pro ITS2 region rostlin

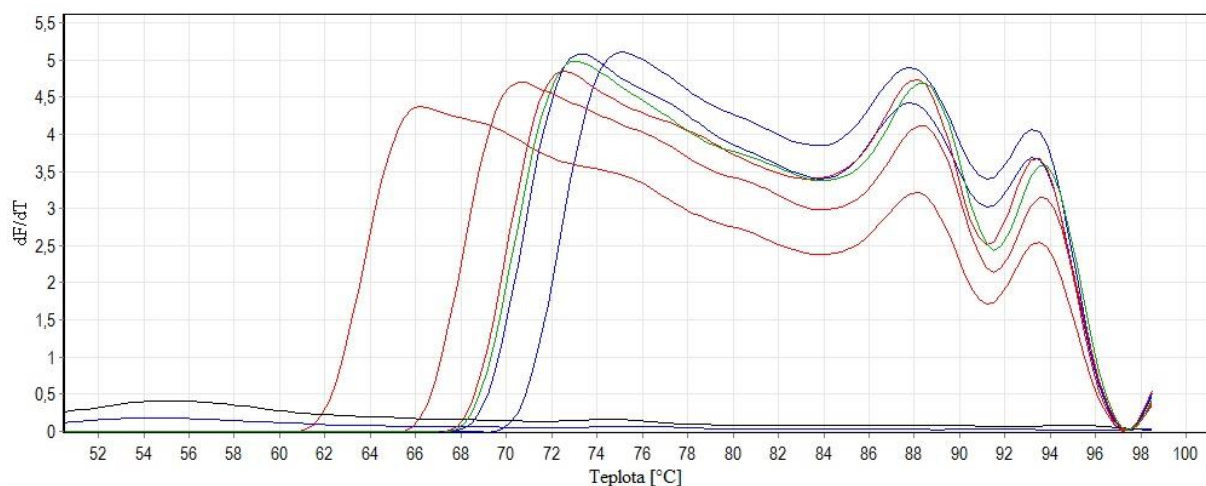
#### 4.3.2.1 Ověření amplifikovatelnosti izolované DNA z ovoce

Výsledky amplifikace čisté ovocné DNA a postup amplifikace je uveden v kapitole 4.2.6.

Z tvaru amplifikačních křivek je patrné, že obě negativní kontroly byly čisté, a specifické PCR produkty byly detekovány v obou pozitivních kontrolách, i ve všech vzorcích izolované DNA. Fluorescence byla nejvyšší u malinové DNA, kdy amplifikační křivka došla až do fáze plató. Účinnost amplifikace jahodové DNA byla skoro 75 %, u meruňkové DNA byla o něco málo nižší a nejmenší byla u jablečné DNA (20 %). Z uvedených výsledků lze usoudit, že DNA izolovaná z jahod, meruňek a jablek obsahovala látky, které částečně inhibují PCR, přičemž při amplifikaci DNA izolované z jablek se inhibice projevila nejvýrazněji.

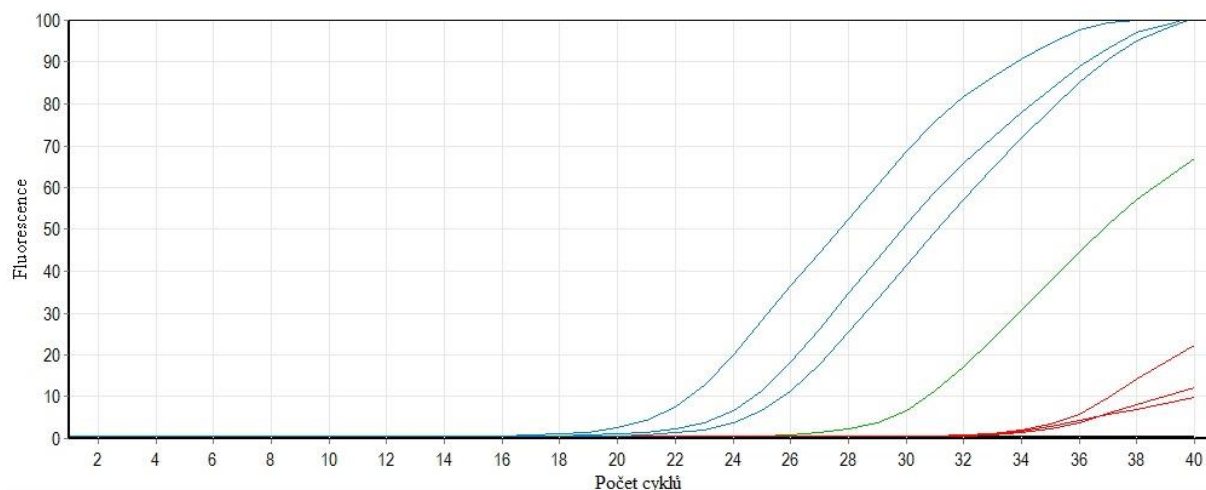


Obrázek 7 – Amplifikační křivky jahodové a meruňkové DNA; NK – černá, PK – zelená, jahoda – modrá, meruňka – červená

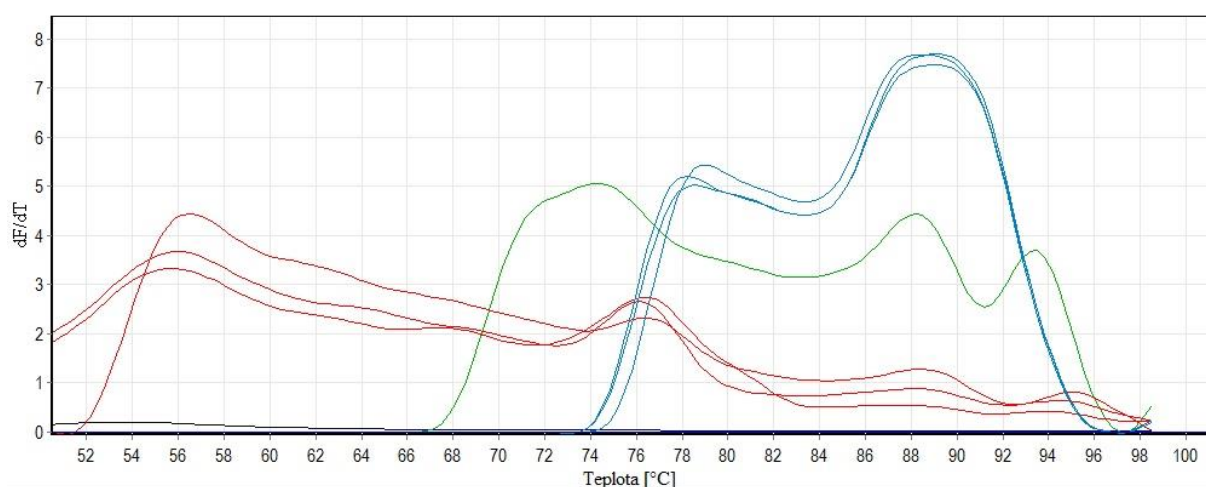


Obrázek 8– Křivka tání jahodové a meruňkové DNA; NK – černá, PK – zelená, jahoda – modrá, meruňka – červená

Z tvaru křivky tání vzorku 3 (jeden z izolátů DNA z jahody) a z výsledků elektroforézy (Obrázek 11) vyplývá, že vzorek 3 buď neobsahoval DNA, nebo byl natolik kontaminován, že došlo k úplné inhibici amplifikace.



Obrázek 9 – Amplifikační křivka malinové a jablečné DNA; NK – černá, PK – zelená, malina – modrá, jablko – červená



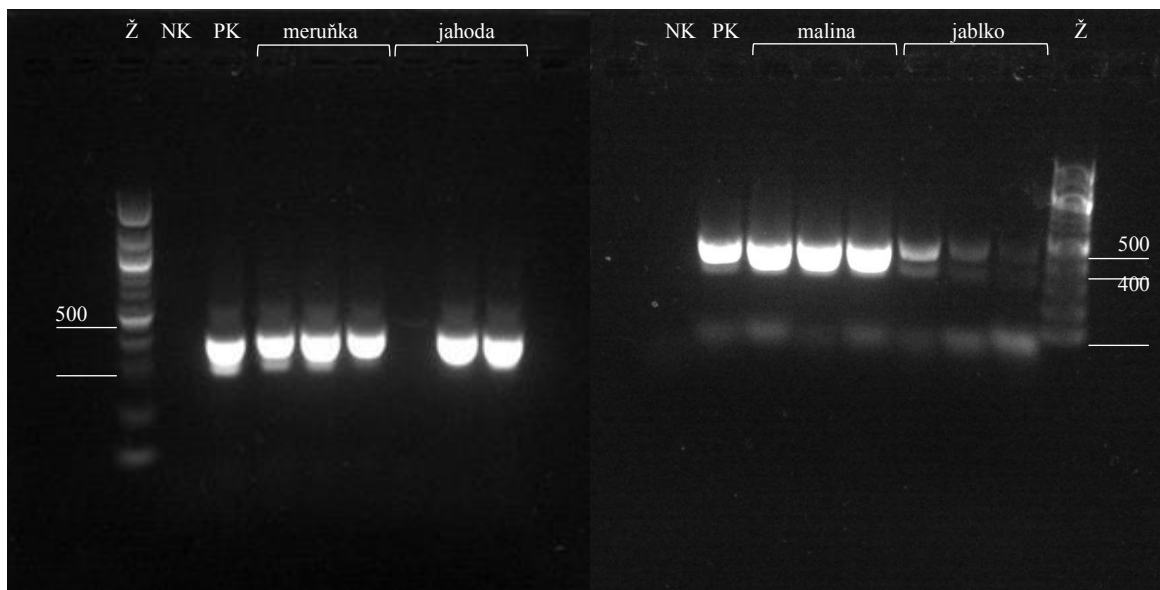
Obrázek 10– Křivka tání malinové a jablečné DNA; NK – černá, PK – zelená, malina – modrá, jablko – červená



Z gelu je patrné, že meruňková a jablková DNA tvořila dvojband, optimalizací teplotního profilu by se dalo ovlivnit to, aby vznikal pouze jeden specifický produkt. V negativní kontrole byly detekovány pouze dimery primerů. Všechny amplifikované vzorky DNA měly délku fragmentu od 315 do 485 bp a přesnější hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 17). Tyto délky fragmentů přibližně odpovídají hodnotám uváděným v literatuře.

Tabulka 17 – Délka fragmentů amplifikované DNA pomocí primerů specifických pro ITS2 region

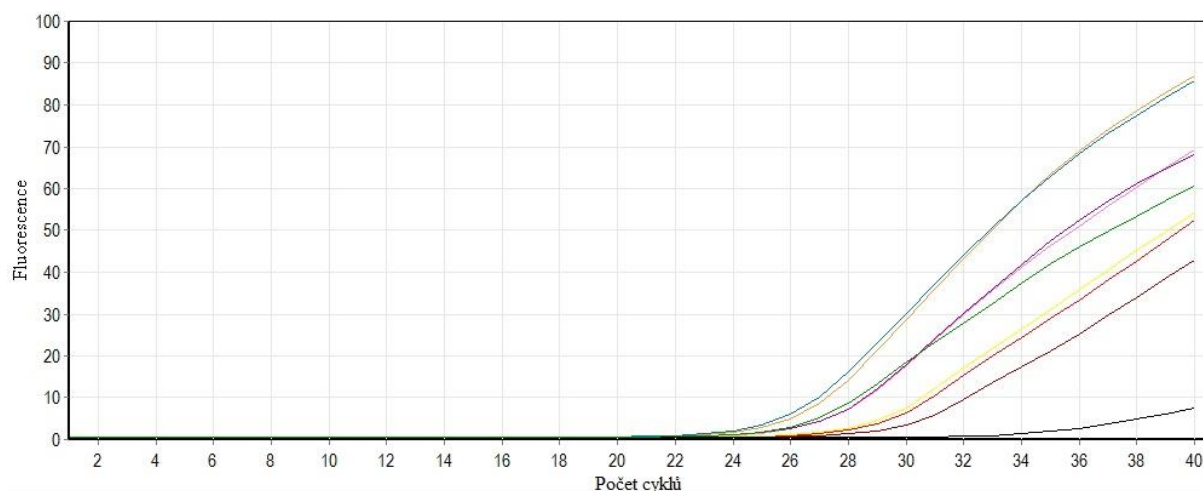
ovocná DNA	meruňka	Jahoda	malina	jablko
délka fragmentu [bp]	<b>349</b> (315)	329	426	<b>485</b> (400)



Obrázek 11 – Elektroforéza ITS2 primery s meruňkovou, jahodovou, malinovou a jablkovou DNA

#### 4.3.2.2 Ověření amplifikovatelnosti izolované DNA z modelových a komerčních vzorků

Ověření amplifikovatelnosti izolované DNA z modelových jahodovo-malinových směsí. Postup amplifikace je uveden v kapitole 4.2.6.

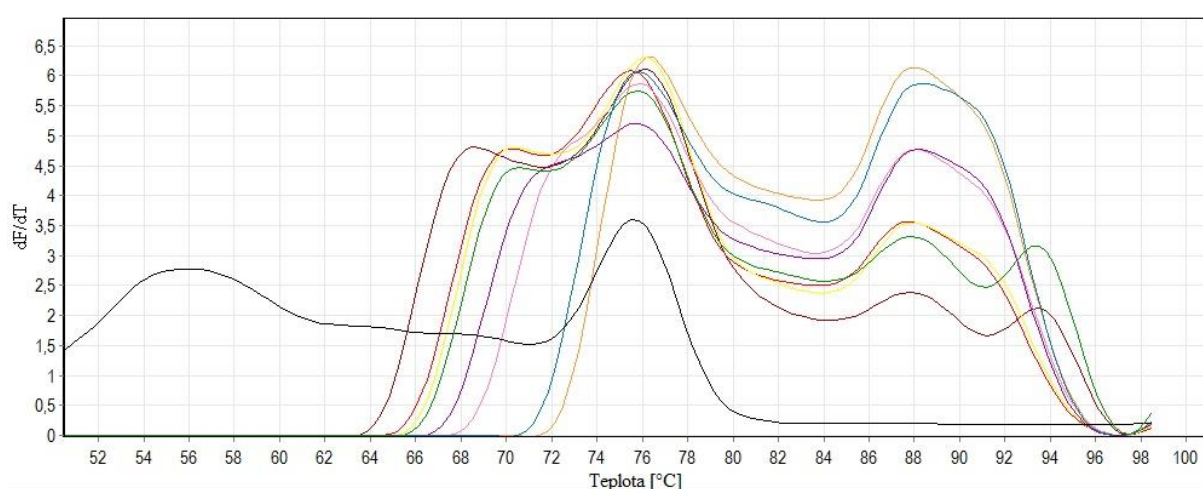


Obrázek 12 – Amplifikační křivky jahodovo-malinových modelových směsí; NK – černá, PK, jahoda – zelená, 100:0 – tm. červená, 50:50 – červená, 40:60 – oranžová, 30:70 – žlutá, 20:80 – růžová, 10:90 – fialová, 0:100 – modrá

Všech sedm modelových jahodovo-malinových vzorků se úspěšně amplifikovalo. U amplifikačních křivek lze vidět zvyšující se účinnost amplifikace od čisté jahodové DNA (100:0) až k čisté malinové DNA (0:100). Modelová směs s koncentrací 40:60 (oranžová křivka) se jako jediná vymyká tomuto trendu. To bylo pravděpodobně způsobeno vyšší koncentrací, než měly ostatní modelové vzorky obsahující vyšší procentuální zastoupení malinové DNA.

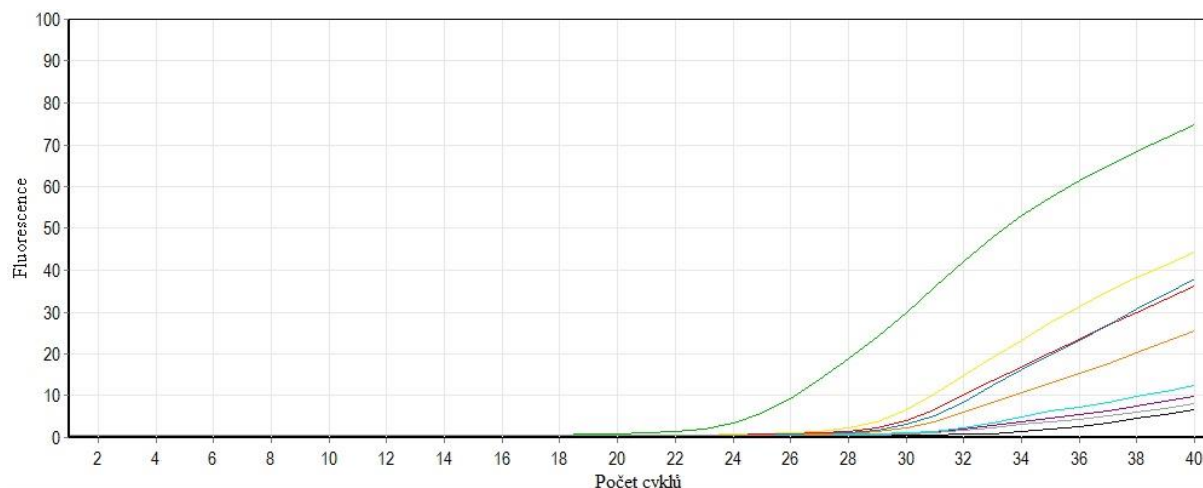
Dále lze pozorovat u jahodové DNA, tedy v pozitivní kontrole (zelená) i ve vzorku 100:0, vznik specifického produktu při teplotě 93,4 °C. Tento pík se se zvyšujícím zastoupením malinové DNA (už od poměru 50:50) ztrácí a křivka tání se více podobá křivce tání pro malinový amplikon.

V negativní kontrole vznikly pravděpodobně dimery primerů a nějaký nespecifický produkt, který měl teplotu tání okolo 75,5 °C.



Obrázek 13– Křivky tání jahodovo-malinových modelových směsí; NK – černá, PK, jahoda – zelená, 100:0 – tm. červená, 50:50 – červená, 40:60 – oranžová, 30:70 – žlutá, 20:80 – růžová, 10:90 – fialová, 0:100 – modrá

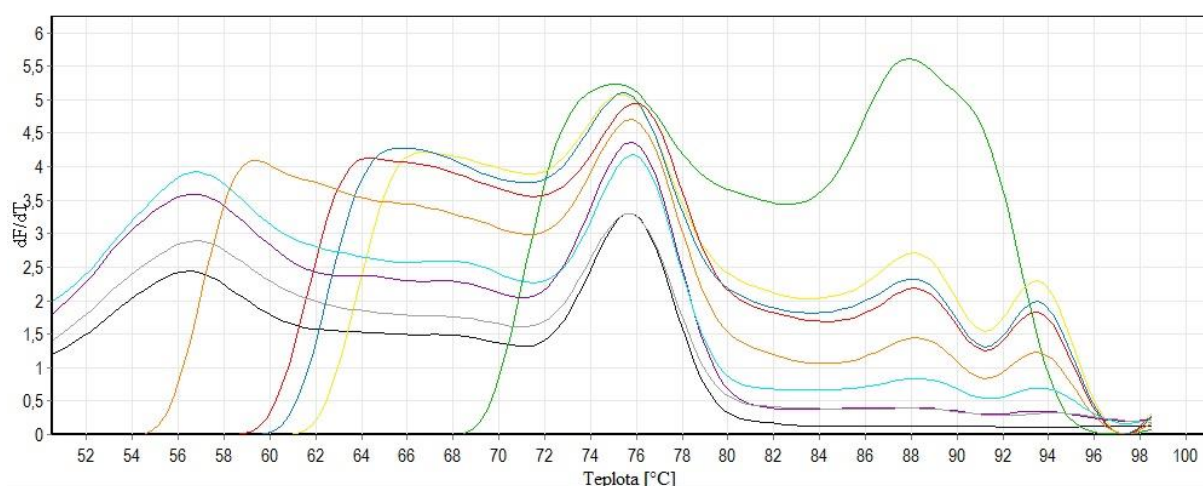
Ověření amplifikovatelnosti izolované DNA z meruňkovo-jablečných modelových směsí:



Obrázek 14 – Amplifikační křivky meruňkovo-jablečných modelových směsí; NK – černá, PK, evropská borůvka – zelená, 100:0 – tm. žlutá, 50:50 – červená, 40:60 – modrá, 30:70 – fialová, 20:80 – oranžová, 10:90 – tyrkysová, 0:100 – šedá

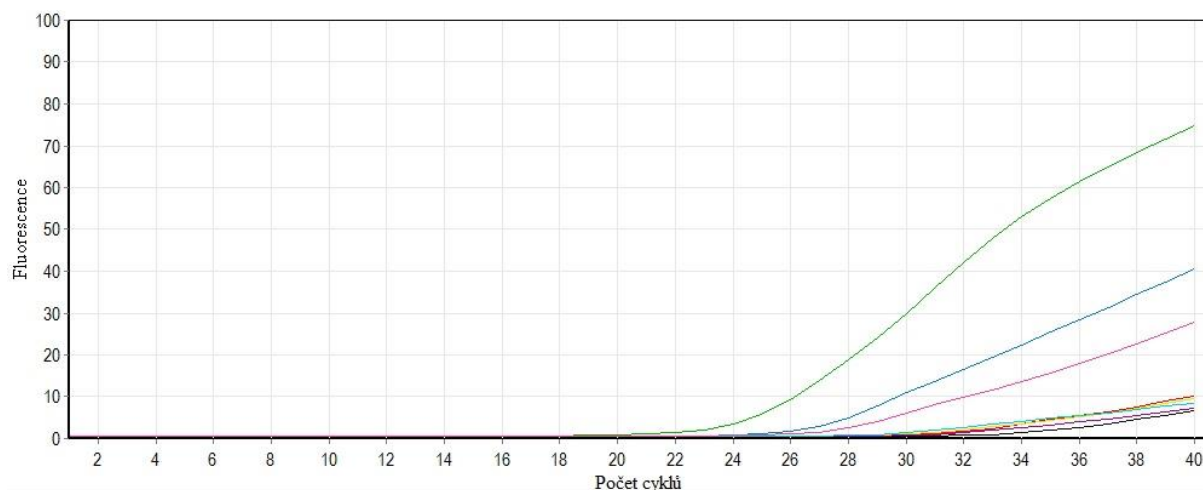
Všechny modelové směsi se úspěšně amplifikovaly. Izolovaná DNA pro čisté jablko (0:100, šedá) a vzorek s poměrem 30:70 měly velmi podobnou fluorescenci i křivky tání. PCR směs obsahovala vždy 1  $\mu$ l izolované DNA, kdy její koncentrace se pohybovala od 0,78 do 6,18 ng/ $\mu$ l. I přes amplifikaci DNA bylo kvůli nízké koncentraci a přítomnosti kontaminantů inhibující PCR reakci problematické detekovat danou DNA při qPCR i poté na gelu po ukončení elektroforézy.

Pozitivní kontrola obsahovala izolovanou DNA z evropské borůvky. Zajímavostí je, že se její teplotní křivka podobá malinové DNA. U NK pravděpodobně vznikly dimery primerů.

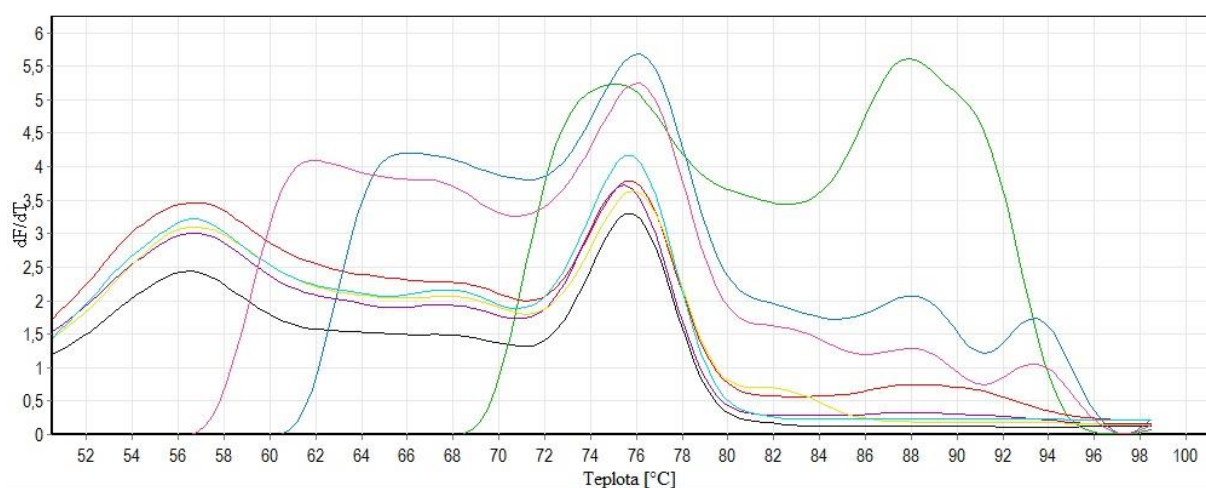


Obrázek 15 – Křivky tání meruňkovo-jablečných modelových směsí; NK – černá, PK, evropská borůvka – zelená, 100:0 – tm. žlutá, 50:50 – červená, 40:60 – modrá, 30:70 – fialová, 20:80 – oranžová, 10:90 – tyrkysová, 0:100 – šedá

Ověření amplifikovatelnosti izolované DNA z komerčních směsí, kde vzorky 1, 3, 4, 5 a 6 byly izolovány ze sedimentu po centrifugaci a u vzorku 2 byla dostatečná koncentrace už po první izolaci přímo z ovocného pyré.



Obrázek 16 – Amplifikační křivky komerčních výživ; NK – černá, PK, evropská borůvka – zelená, vzorek 1 (Hello, jablko+jahoda) – červená, vzorek 2 (Sunárek, jablko+jahoda) – modrá, vzorek 3 (HiPP, jablko+jahoda+banán+malina) – fialová, vzorek 4 (Hello, jablko+malina) – žlutá, vzorek 5 (Nestlé, jablko+meruňka) – růžová, vzorek 6 (Cvrček, meruňka+jablko) – tyrkysová



Obrázek 17 – Amplifikační křivky komerčních výživ; NK – černá, PK, evropská borůvka – zelená, vzorek 1 (Hello, jablko+jahoda) – červená, vzorek 2 (Sunárek, jablko+jahoda) – modrá, vzorek 3 (HiPP, jablko+jahoda+banán+malina) – fialová, vzorek 4 (Hello, jablko+malina) – žlutá, vzorek 5 (Nestlé, jablko+meruňka) – růžová, vzorek 6 (Cvrček, meruňka+jablko) – tyrkysová

Všechny komerční vzorky se amplifikovaly. Nejlépe se amplifikoval vzorek 2, poté vzorek 5 a vzorek 1. Komerční vzorky 3, 4 a 6 měly jen o něco málo vyšší fluorescenci než NK, dokonce měly nižší fluorescenci než čisté jablko (modelová směs meruňka:jablko, 0:100). Co se týče jejich křivek tání, tak hodnoty byly jen o něco málo vyšší než NK. Největším překvapením byl vzorek 3, který se nejhůře amplifikoval ze všech komerčních vzorků, i když měl obsahovat 100 % ovoce. Mohlo to být způsobeno izolací nedostatečně čisté DNA nebo přítomností sloučenin inhibující amplifikaci DNA nebo jen chybou při přípravě PCR směsi.

Pro další analýzu se specifickými primery při multiplex PCR bylo vhodné používat vyšší koncentraci izolované DNA k analýze, a proto byly použity 2  $\mu$ l izolované DNA, kdy celkový objem PCR směsi byl 25  $\mu$ l.

V následující tabulce jsou uvedeny naměřené hodnoty délky amplifikovaných fragmentů. Pomocí symbolu plus (+) je označena detekce produktu. Pokud vzorky nebyly vůbec detekovány, tak je v tabulce uveden symbol minus (-).

U modelových jahodovo-malinových směsí byly detekovány dva bandy, u nichž ten více výrazný byl pravděpodobně specifický produkt a je označen v tabulce tučně. Ten méně výrazný byl vždy kratší a objevoval se u všech sedmi vzorků i u pozitivní kontroly (jahodové DNA). Vzorek s poměrem 40:60 byl velmi podobný se vzorkem čisté maliny (0:100). Kromě tohoto vybočujícího vzorku šlo pozorovat trend, kdy se zvyšující se koncentrací malinové DNA se snižovala délka fragmentu. Velikost fragmentů se pohybovala od 357-431 bp pro specifický ampikon. Velikost menšího fragmentu se pohybovala od 308-320 bp.

U modelových meruňkovo-jablečných směsí byly detekovány také dva bandy, velikost těchto fragmentů DNA byla o něco větší než u jahodovo-malinových směsí. Také byly méně výrazné na gelu díky nižší koncentraci DNA. Označení je totožné jako u předchozí modelové směsi. U těchto modelových směsí byl sledován trend snižující se fluorescence v závislosti na snižující se koncentrací meruňkové DNA. Délka většího z fragmentů se pohybovala od 412-443 bp a toho menšího od 341-383 bp.

U komerčních směsí se nepodařilo vůbec detekovat komerční vzorky 4 a 6. Velmi slabě se daly detekovat vzorky 1, 3 a 5. U těchto vzorků byly také přítomny dva bandy, i když ten menší produkt amplifikace byl pravděpodobně přítomen ve velmi malé koncentraci. Největší fluorescenci měl vzorek 2, což korelovalo s amplifikační křivkou tohoto vzorku.

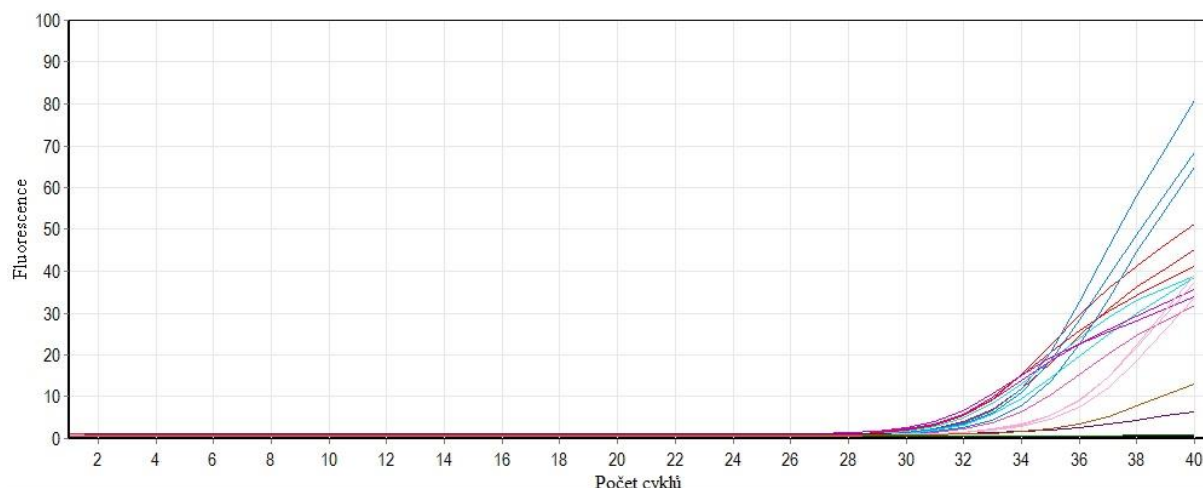
Jakou ovocnou DNA obsahovaly komerční vzorky nelze pomocí tohoto páru primerů určit a je nutné použít specifické primery pouze pro jeden druh ovoce.

Tabulka 18 – Výsledky elektroforézy na 1,2% agarosovém gelu;  
+, ++, +++ detekce produktu PCR o různé intenzitě fluorescence; – produkt nebyl detekován

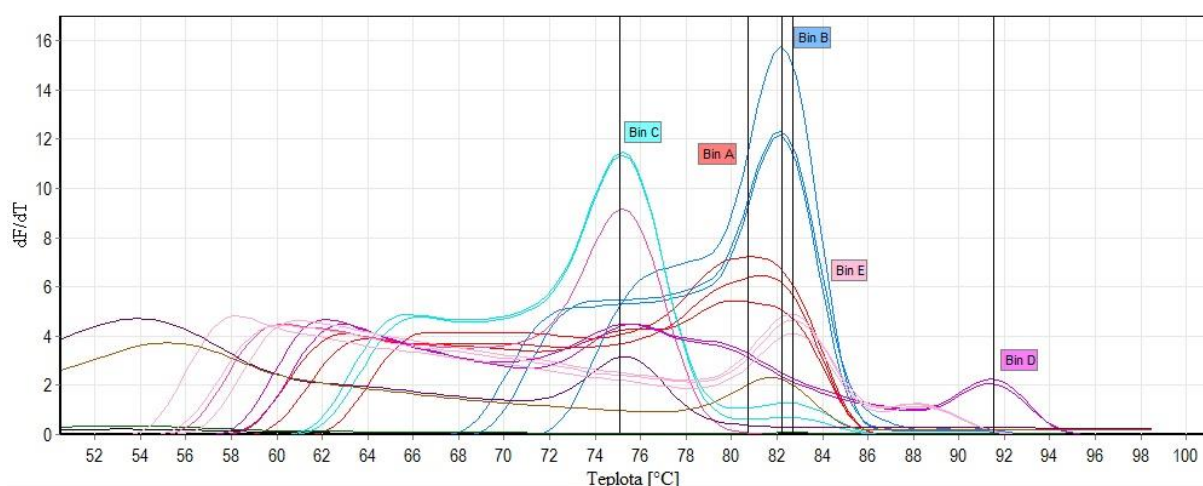
	vzorek	délka fragmentu [bp]	fluorescence
jahoda : malina	100:0	<b>431</b> (320)	++ (+)
	50:50	<b>421</b> (320)	+++ (+)
	40:60	<b>357</b> (308)	+++ (+)
	30:70	<b>394</b> (316)	+++ (+)
	20:80	<b>380</b> (320)	+++ (+)
	10:90	<b>374</b> (317)	+++ (+)
	0:100	<b>357</b> (313)	+++ (+)
meruňka : jablko	100:0	<b>434</b> (354)	++ (+)
	50:50	<b>412</b> (347)	++ (+)
	40:60	<b>419</b> (354)	++ (+)
	30:70	<b>425</b> (341)	+ (+)
	20:80	<b>443</b> (383)	+ (+)
	10:90	<b>430</b> (379)	+ (+)
	0:100	<b>430</b> (379)	+ (+)
komerční vzorky	1	<b>493</b> (397)	+ (+)
	2	<b>429</b> (360)	++ (+)
	3	<b>498</b> (387)	+ (+)
	4	–	–
	5	<b>479</b> (332)	+
	6	–	–

### 4.3.3 Výběr vhodných specifických primerů pro jahodovou DNA

Postup výběru vhodných specifických primerů pro jahodovou DNA je uveden v kapitole 4.2.7.



Obrázek 18 – Amplifikační křivka pro specifické primery jahody;  
APX1B NK – tm. zelená, APX1B – modrá, APX1E NK – růžová, APX1E – tyrkysová,  
GAST1 NK – tm. fialová, GAST1 – fialová, DFR1A NK – hnědá, DFR1A – sv. růžová



Obrázek 19 – Křivka tání specifických primerů jahody; ABP1A NK – černá, ABP1A – červená, APX1B NK – tm. zelená, APX1B – modrá, APX1E NK – růžová, APX1E – tyrkysová, GAST1 NK – tm. fialová, GAST1 – fialová, DFR1A NK – hnědá, DFR1A – sv. růžová

Z amplifikačních křivek je patrné, že účinnost reakce byla nejvyšší u primerů APX1B (80%), a ze tvaru křivek tání je patrné, že při amplifikaci DNA z jahod s využitím těchto primerů vznikalo nejméně nespecifických produktů. Křivka tání má maximum při 82,2 °C.

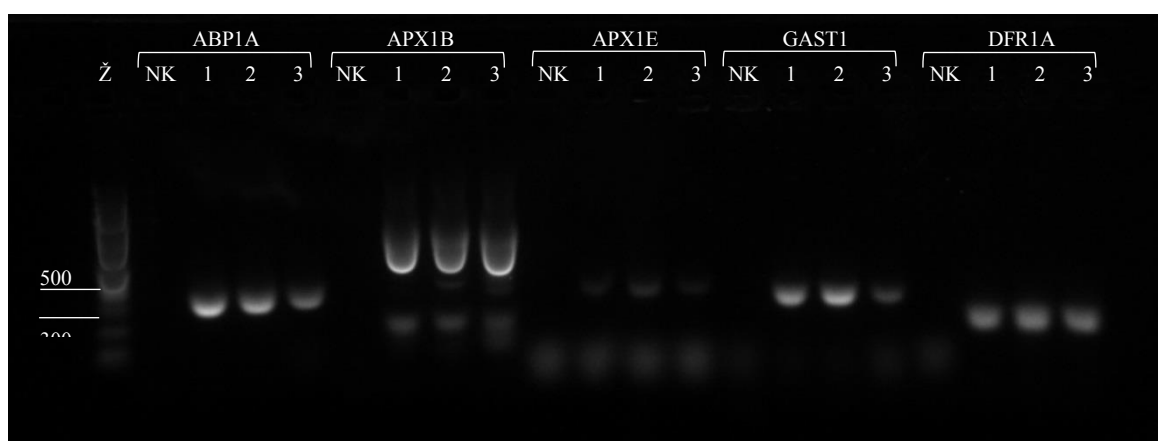
Druhým vhodným kandidátem byl primer ABP1A, u kterého fluorescence vystoupala pouze k 50 % a křivka tání měla širší náběh na pík a detekovaný PCR produkt měl  $T_m$  80,7 °C.

U ostatních třech primerů docházelo na konci ke zvednutí negativní kontroly. Křivky tání u primerů DFR1A a GAST1 jsou neuspokojivé a vypadá, že vznikaly nespecifické produkty a ani účinnost amplifikace nebyla příliš vysoká.

Dalším vhodným primerem se zdá APX1B, který má hezkou křivku tání s malým náběhem, ale zase obsahuje více dimerů primerů.

Tabulka 19 – Naměřené hodnoty pro specifické produkty

	ABP1A	APX1B	APX1E	GAST1	DFR1A
teplota tání $T_m$ [°C]	80,7	82,2	75,2	91,4	82,7
délka fragmentu [bp]	301	568 (492)	411	335	210



Obrázek 20 – Elektroforéza na 1,2% agarosovém gelu se specifickými primery pro jahodovou DNA

Z obrázku vyplývá, že nejlépe vyšel primer ABP1A, kde vznikl jeden specifický produkt a u negativní kontroly nebyly přítomny žádné dimery primerů. Průměrná velikost fragmentu DNA se pohybovala kolem 301 bp, což odpovídá velikosti fragmentu uvedeného v publikaci.

U primeru APX1B vypadá, že vzniklo více produktů reakce a taky dimerů primerů. Proto je nutná optimalizace programu pro amplifikaci DNA. Délka fragmentu DNA je přes 568 bp (až k 800 bp) a délka kratšího fragmentu je okolo 492 bp. Délka fragmentu se liší od hodnoty nalezené pomocí programu Primer-Blast.

U primeru APX1E byla nejmenší fluorescence a světlá oblast na gelu odpovídala velikosti fragmentu od 200 bp níže. Pravděpodobně se jedná o dimery primerů. Velikost fragmentu DNA se pohybovala okolo 411 bp, což je vyšší hodnota o 77 bp než je uvedena v literatuře.

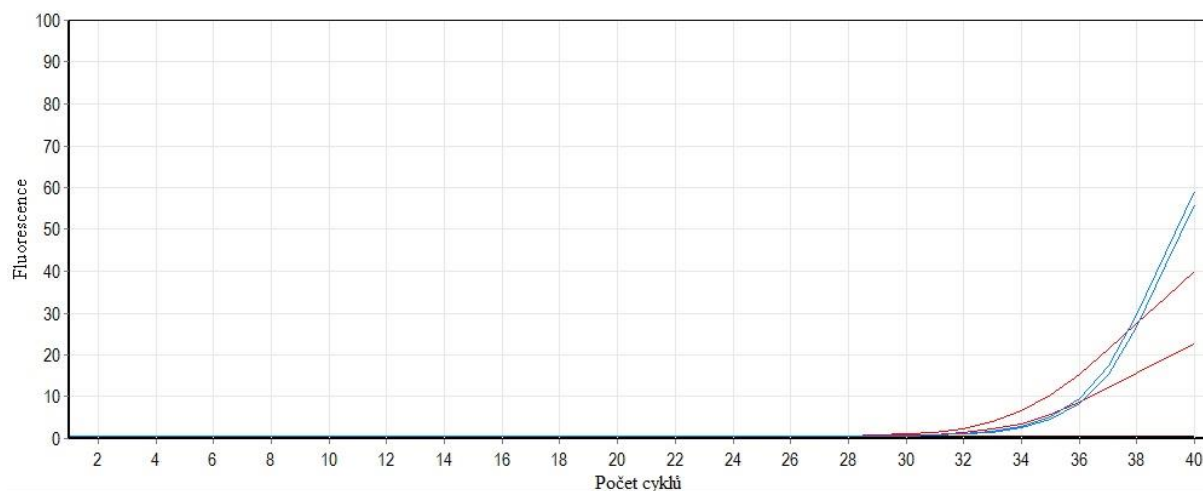
Pro primer GAST1 byly u negativní kontroly i vzorků patrné opět dimery primerů jako u primeru APX1B ale v menší míře. Vzorky obsahují jeden specifický produkt okolo 335 bp a negativní kontrola byla čistá.

Primer DFR1A má negativní kontrolu čistou jen s přítomnými dimery primerů. Jedná se o nejkratší specifický produkt ze všech použitých specifických primerů pro jahodovou DNA. Jeho velikost se pohybovala okolo 210 bp.

Při porovnání dat z amplifikačních křivek, křivek tání a bandů, detekovaných na gelu po elektroforéze, se zdály primery GAST1 a APX1E nevhodné pro další práci. Důvodem je to, že primer GAST1 nemá hezkou křivku tání a že vznikají nespecifické produkty a dimery primerů. U primeru APX1E byly přítomny v negativní kontrole i u vzorků dimery primerů. Specifický produkt byl u vzorků velmi špatně detekovatelný kvůli slabé fluorescenci bandů.

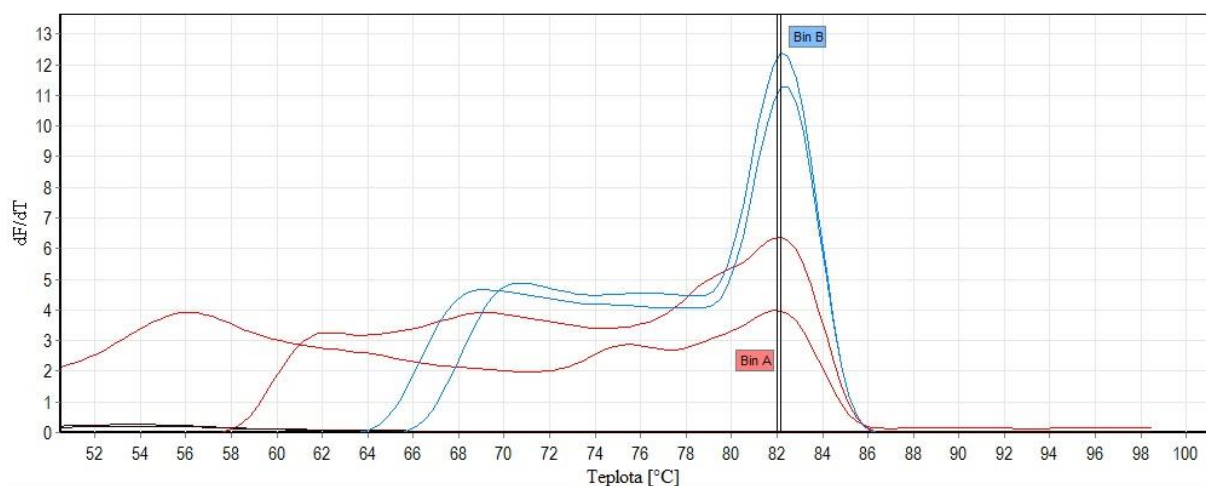
#### 4.3.4 Výběr vhodného jahodového primeru a optimalizace amplifikace DNA

A) Teplotní profil viz kapitola 4.2.8



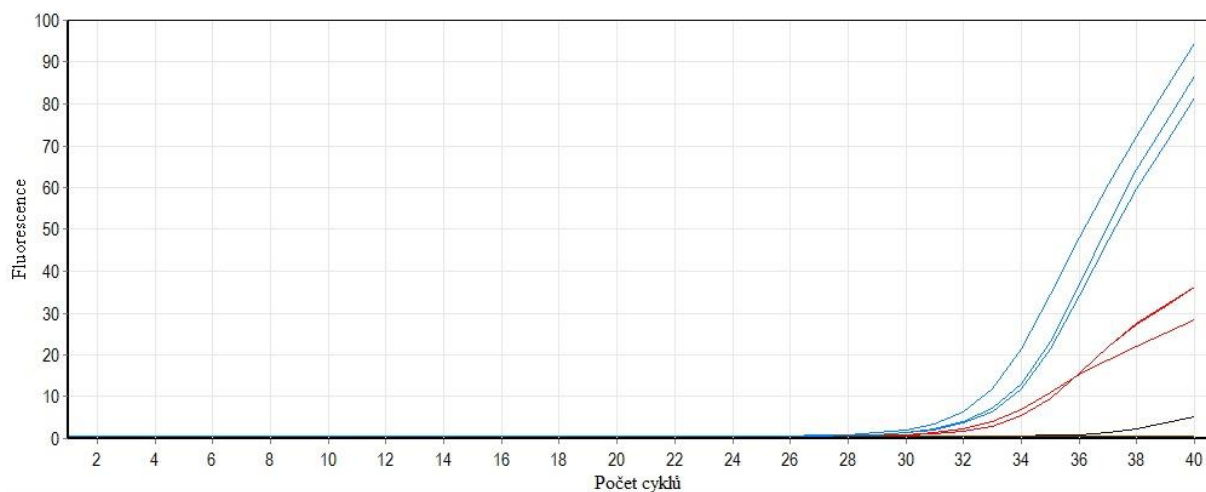
Obrázek 21 – Amplifikační křivka pro specifické jahodové primery ABP1A a APX1B  
ABP1A NK – černá, ABP1A – červená, APX1B NK – hnědá, APX1B – modrá

Negativní kontroly vyšly hezky bez přítomnosti dimerů primerů. Primer APX1B dosáhl vyšší intenzity fluorescence (58 %) než primer ABP1A (40 %). Z křivek tání lze také usoudit, že vhodnější pro další práci je primer APX1B, protože má štihlejší a užší specifický pík s kratším náběhem. Tento primer má větší fragment a tvoří dvojník, což může být problematické pro další práci, proto bude brán v potaz i druhý primer a budou upraveny podmínky PCR. Detekovaný PCR produkt primeru ABP1A měl teplotu tání při 82 °C a primer APX1B ji měl trochu vyšší při 82,3 °C.

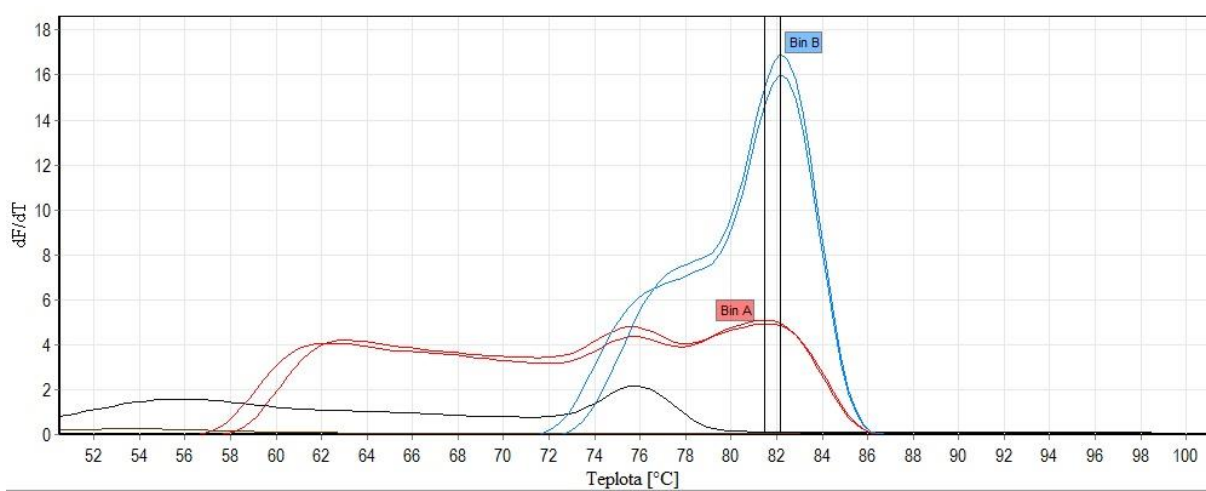


Obrázek 22 – Křivka tání pro specifické jahodové primery ABPIA a APXIB  
 ABPIA NK – černá, ABPIA – červená, APXIB NK – hnědá, APXIB – modrá

B) Teplotní profil viz kapitola 4.2.8



Obrázek 23 – Amplifikační křivka specifických jahodových primerů ABPIA a APXIB  
 ABPIA NK – černá, ABPIA – červená, APXIB NK – hnědá, APXIB – modrá



Obrázek 24 – Křivka tání specifických primerů ABPIA a APXIB  
 ABPIA NK – černá, ABPIA – červená, APXIB NK – hnědá, APXIB – modrá

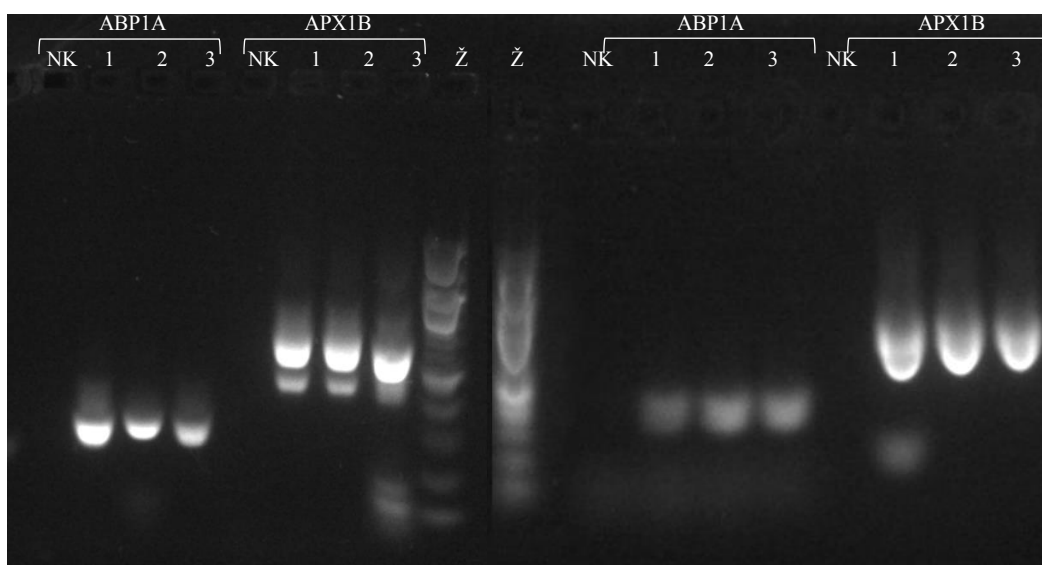


Negativní kontrola byla čistá u primeru APX1B. Na obrázku (Obrázek 23) vystoupala intenzita fluorescence primeru až k 95 %. Při analýze křivek tání amplifikované jahodové DNA byl detekován ideální vysoký a štíhlý pík, jehož maximum bylo při 82,2 °C.

Tabulka 20 – Výsledky teplot tání a délky fragmentů pro vybrané jahodové primery

jahodové primery	ABP1A		APX1B	
	65-60 °C	65-55 °C	65-60 °C	65-55 °C
Účinnost reakce [%]	40	58	37	95
Teplota tání Tm [°C]	82,0	81,5	82,3	82,2
Délka fragmentu [bp]	333	408	<b>620 (508)</b>	655

Negativní kontrola se lehce zvedla při nižších teplotách a vznikl nespecifický produkt, který měl teplotu tání 75,8 °C, ale jednalo se pouze o malé fragmenty pravděpodobně dimery primerů nebo nějaké oligomery. Fluorescence byla nižší než u předchozího primeru a to kolem 35 %. Detekovaný PCR produkt měl teplotu tání při 81,5 °C.

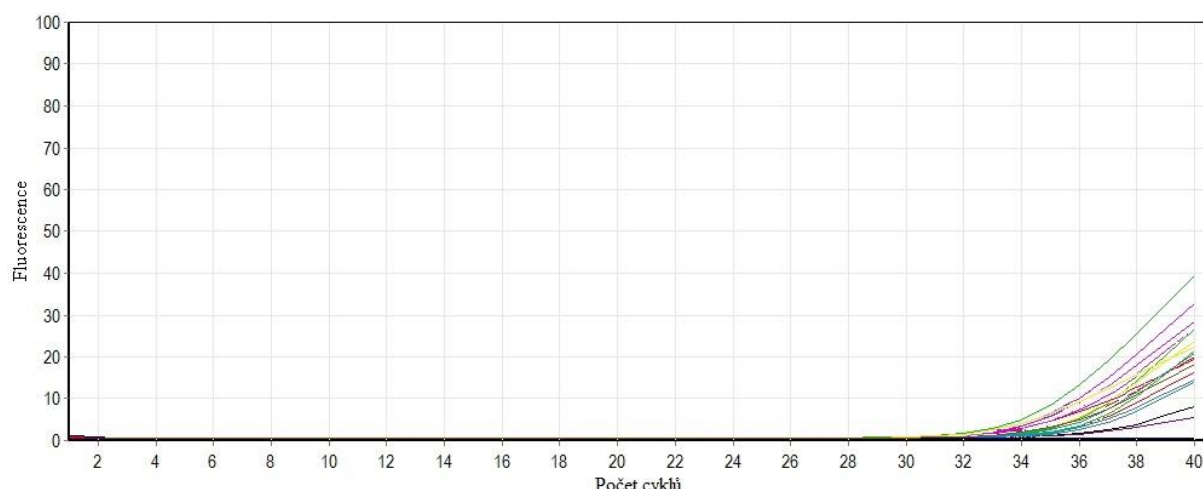


Obrázek 25 – Elektroforéza primerů ABP1A a APX1B

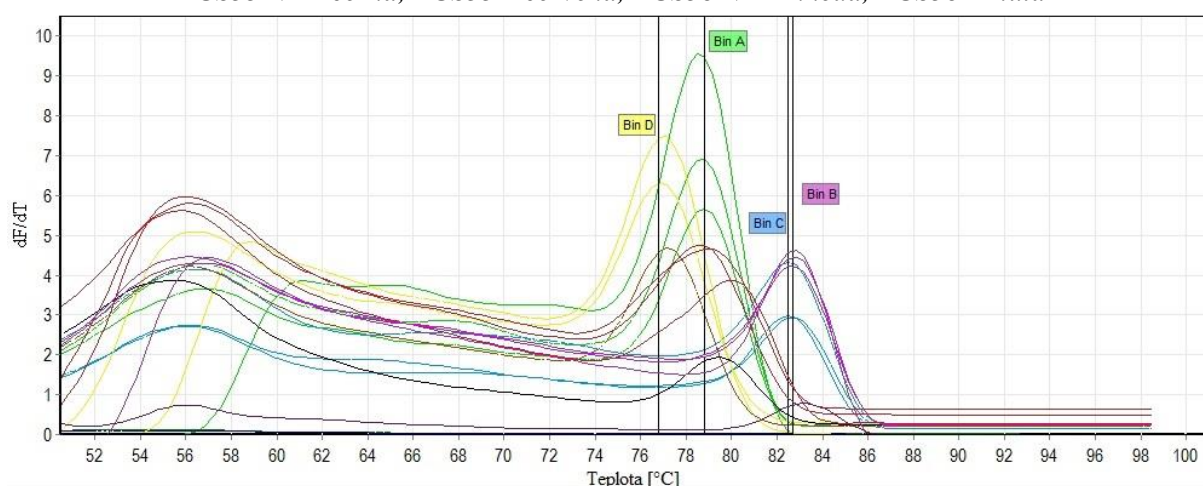
Na obrázku (Obrázek 25) vpravo jsou vzorky, u kterých byla teplota nasedání primeru postupně snížena z 65 °C na 60 °C a vlevo byla teplota snížena z 65 °C na 55 °C. Lze tedy předpokládat, že první program je vhodnější spíše pro primer ABP1A a druhý program je vhodný spíše pro primer APX1B. Jelikož u obou programů má primer APX1B vyšší intenzitu fluorescence a také ideálnější křivku tání, tak byl vybrán pro další práci.

### 4.3.5 Výběr vhodných specifických primerů pro meruňkovou DNA

Postup výběru vhodného specifického primeru pro meruňkovou DNA je uveden v kapitole 4.2.9.



Obrázek 26 - Amplifikační křivka specifické meruňkové primery, AGS6 NK – tm. zelená, AGS6 – zelená, AGS9 NK – tm. fialová, AGS9 – fialová, AGS18 NK – tm. modrá, AGS18 – modrá, AGS33 NK - černá, AGS33 – červená, AGS38 NK – hnědá, AGS38 – žlutá



Obrázek 27 - Křivka tání specifických meruňkových primerů, AGS6 NK – tm. zelená, AGS6 – zelená, AGS9 NK – tm. fialová, AGS9 – fialová, AGS18 NK – tm. modrá, AGS18 – modrá, AGS33 NK - černá, AGS33 – červená, AGS38 NK – hnědá, AGS38 – žlutá

Z tvaru amplifikačních křivek můžeme vidět, že účinnost amplifikace meruňkové DNA nebyla příliš vysoká. Nejlépe se amplifikovala meruňková DNA při použití primeru AGS6 (40 %). Z tvaru křivek tání je patrné, že při amplifikaci DNA z meruňek s využitím těchto primerů vznikalo nejméně nespecifických produktů. Detekovaný PCR amplikon měl teplotu tání 78,8 °C.

Primer AGS9 měl u vzorků nižší fluorescenci než předchozí primer a to 20 %. Jelikož teploty tání vznikajících PCR produktů se mezi třemi opakováními lišily, a zároveň byly jejich teploty tání nízké, nedošlo zřejmě k amplifikaci specifického produktu. Z tohoto důvodu nebyl tento pár primerů využit pro další práci.

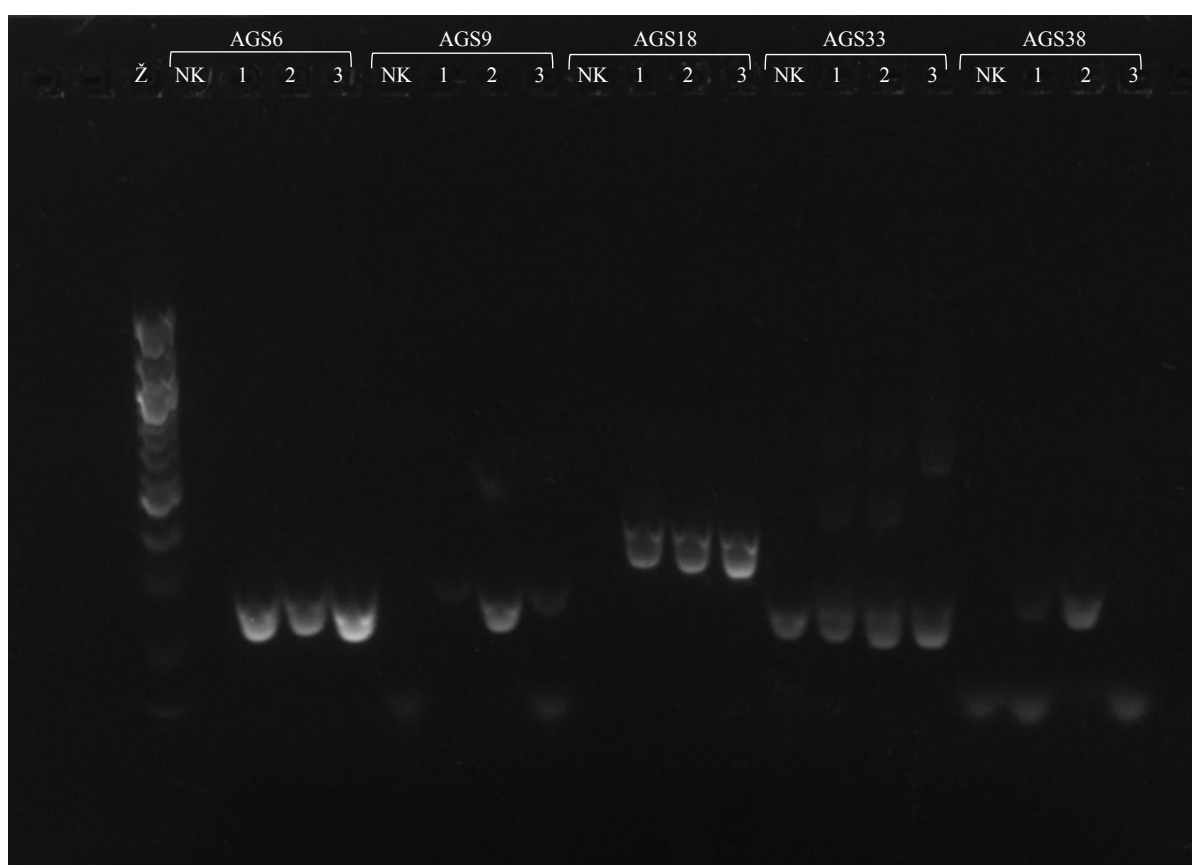
U primeru AGS18 dosáhla intenzita fluorescence 20 %. Negativní kontrola vyšla dobře. Detekovaný PCR produkt měl teplotu tání 82,5 °C.

Intenzita fluorescence vzorků s primerem AGS33 vystoupala k 30 %. Detekovaný PCR amplikon měl teplotu tání 82,7 °C, což bylo mírně posunuté od píku nacházejícího se v NK, který měl maximum při 83,2 °C. Na gelu byl ale patrný band o stejné velikosti jako specifický produkt. Z tohoto důvodu nebyl tento pár primerů využit pro další práci.

Amplikon vzniklý při použití primeru AGS38 dosáhl fluorescence 24 %. U negativní kontroly vznikl nespecifický produkt, který měl teplotu tání 77,2 °C, což bylo velmi blízko teplotě tání specifického produktu, která byla 76,8 °C.

Tabulka 21 – Naměřené hodnoty pro specifické produkty

	AGS6	AGS9	AGS18	AGS33	AGS38
Účinnost reakce [%]	40	20	20	30	24
teplota tání T <sub>m</sub> [°C]	78,8	79,0	82,5	82,7	76,8
délka fragmentu [bp]	244	274	358	233	266



Obrázek 28 – Gelová elektroforéza specifických meruňkových primerů

Pro primer AGS6 byla negativní kontrola čistá a produkt amplifikace měl velikost okolo 244 bp, což je mírně vyšší než předpokládaná délka (222 bp). Produkty amplifikace byly dobře detekovatelné na gelu. Tento primer se zdá vhodný pro další práci.

U primeru AGS9 a AGS38 byly v negativní kontrole přítomny dimery primerů a jejich velikost se pohybovala okolo 100 bp. Délka specifických produktů pro tyto primery vyšla odlišně v triplicátech, ale pohybovala se v intervalu mezi 250-270 bp.

Primer AGS18 měl čistou NK a délka specifických produktů vyšla okolo 358 bp. Z gelu je patrné, že došlo pravděpodobně k tzv. „smiling efektu“. Tento primer se zdá použitelný pro další práci, pokud by se upravil teplotní profil amplifikace.

U primeru AGS33 byla kontaminovaná negativní kontrolu, a to i při opakování pokusu. Velikost produktu amplifikace se pohybovala okolo 233 bp.

#### 4.3.6 Výběr vhodných specifických primerů pro malinovou DNA

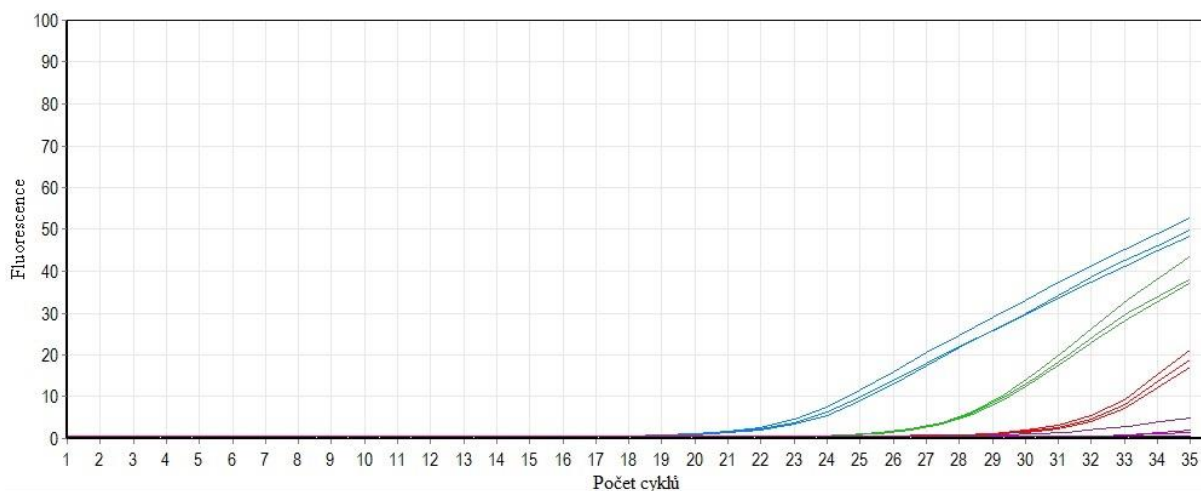
Postup výběru specifických primerů pro malinovou DNA je uveden v kapitole 4.2.11.

Negativní kontroly byly čisté a z křivek tání lze usuzovat, že mohly vzniknout dimery primerů. Z tvaru amplifikačních křivek je patrné, že účinnost reakce byla nejvyšší u primerů Ri18S (52%), a z tvaru křivek tání je patrné, že při amplifikaci malinové DNA s využitím těchto primerů, vznikaly pravděpodobně nespecifické produkty. Detekovaný PCR amplikon měl teplotu tání 87,0 °C.

U primeru RiACO1 byla účinnost amplifikace DNA nižší a to okolo 19 %. Z křivky tání je patrné, že specifický produkt má podobnou teplotu tání (87,2 °C) jako primer Ri18S. I přes nižší účinnost amplifikace se primer RiACO1, kvůli vhodnější křivce tání, zdá jako lepší volba pro další práci.

Negativní kontrola byla u primeru Ri1 čistá. Fluorescence amplifikačních křivek se pohybovala kolem 40 %. Detekovaný PCR amplikon měl teplotu tání 88,0 °C, což je nejvyšší teplota z použitých malinových primerů.

U primeru EPpCU1830 měly NK i vzorky velmi nízkou fluorescenci a ani křivka tání nevypadala vhodně, protože pík byl nízký se širokou základnou. Specifický PCR produkt měl teplotu tání 74,7 °C, což odpovídalo i teplotě maximálního zvednutí negativní kontroly, a proto nebude s tímto primerem nadále pracováno.

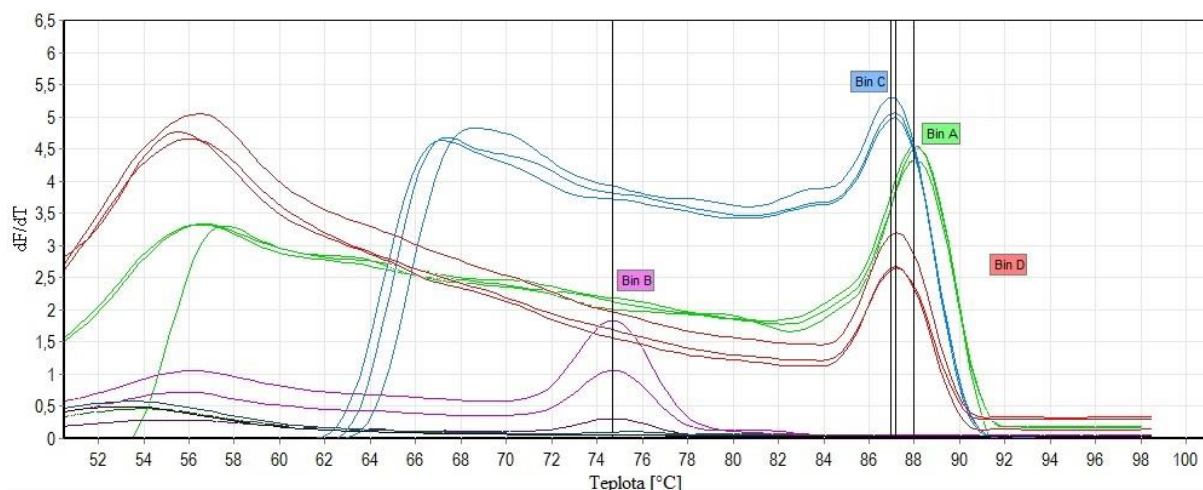


Obrázek 29 – Amplifikační křivky malinových primerů, Ri1 NK – tm. zelená, Ri1 – zelená, EPpCU1830 NK – tm. fialová, EPpCU1830 – fialová, Ri18S NK – tmavě modrá, Ri18S – modrá, RiACO1 NK – černá, RiACO1 – červená

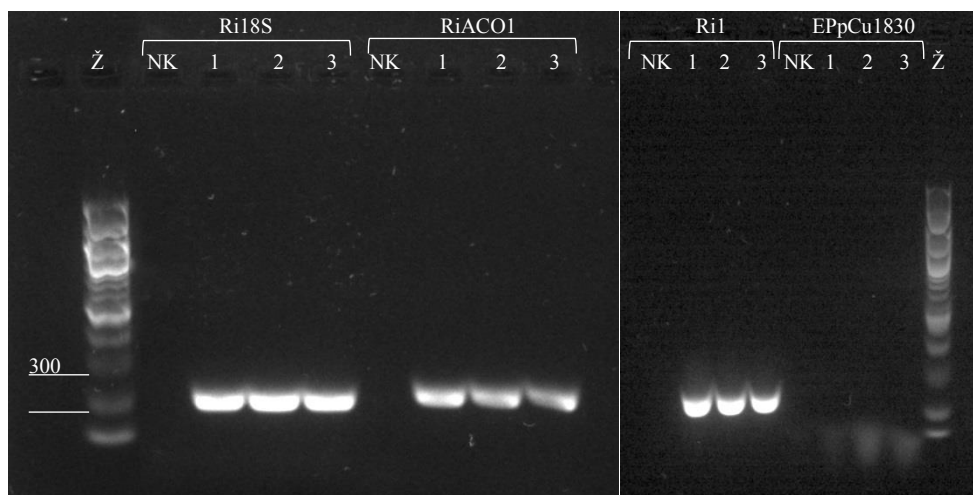
Souhrn zjištěných parametrů pro malinové primery je uveden v tabulce (Tabulka 22) Tabulka 22.

Tabulka 22 – Naměřené hodnoty pro specifické produkty

	Ri1	EPpCU1830	Ri18S	RiACO1
Účinnost reakce [%]	40	20	52	5
teplota tání Tm [°C]	88,0	74,7	87,0	87,2
délka fragmentu [bp]	211	-	209	218



Obrázek 30 – Křivka tání specifických malinových primerů, Ri1 NK – tm. zelená, Ri1 – zelená, EPPCU1830 NK – tm. fialová, EPPCU1830 – fialová, Ri18S NK – tmavě modrá, Ri18S – modrá, RiACO1 NK – černá, RiACO1 – červená



Obrázek 31 – Elektroforéza specifické malinové primery

Elektroforéza potvrzuje výsledky z PCR, že negativní kontroly byly čisté až na NK u primeru EPPCU1830, kde lze vidět pouze vznik dimerů primerů (menší než 142 bp), které jsou indikovány světlou oblastí na gelu. Celkově vypadá, že u tohoto páru primerů vůbec nevznikl žádný specifický produkt.

Z elektroforézy je patrné, že velikost specifických malinových fragmentů byla velmi podobná (kromě EPPCU1830) a pohybovala se mezi 209-218 bp. U primerů Ri18S a RiACO1 vznikly o něco delší fragmenty, než bylo odhadováno (viz Tabulka 5). Velikost specifického produktu při použití primeru Ri1 byla velmi podobná zjištěné hodnotě délky fragmentu pomocí vyhledávače Primer-Blastu.

### 4.3.7 Výběr vhodných specifických primerů pro jablkovou DNA

Postup výběru specifických primerů pro jablkovou DNA je uveden v kapitole 4.2.12.

Negativní kontrola u primeru FT MDP byla čistá, při nižších teplotách vznikaly asi dimery primerů. Křivka tání měla maximum při 82,7 °C.

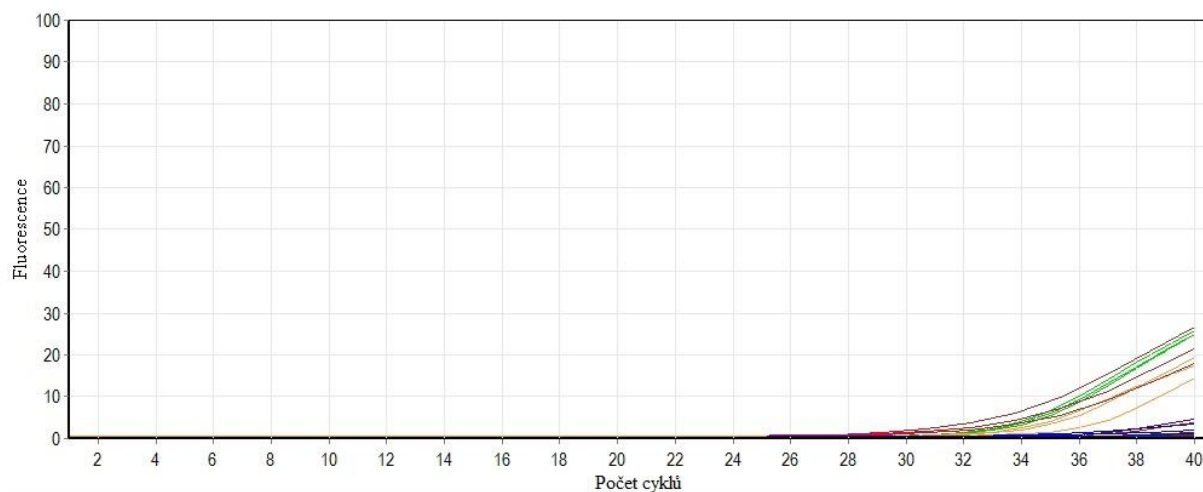
Pro primer MDP tento teplotní profil nebyl vhodný, protože se jablková DNA skoro vůbec neamplifikovala a specifický produkt vznikl pouze u jednoho vzorku a jeho teplota tání byla 78,5 °C. Negativní kontrola byla čistá.

U primeru MD FKBP42 byla detekována nejvyšší účinnost amplifikace a dostoupala až k 25 %. Amplifikační křivka negativní kontroly se na konci jen lehce zvedla. Teplota tání specifického produktu je 83,3 °C.

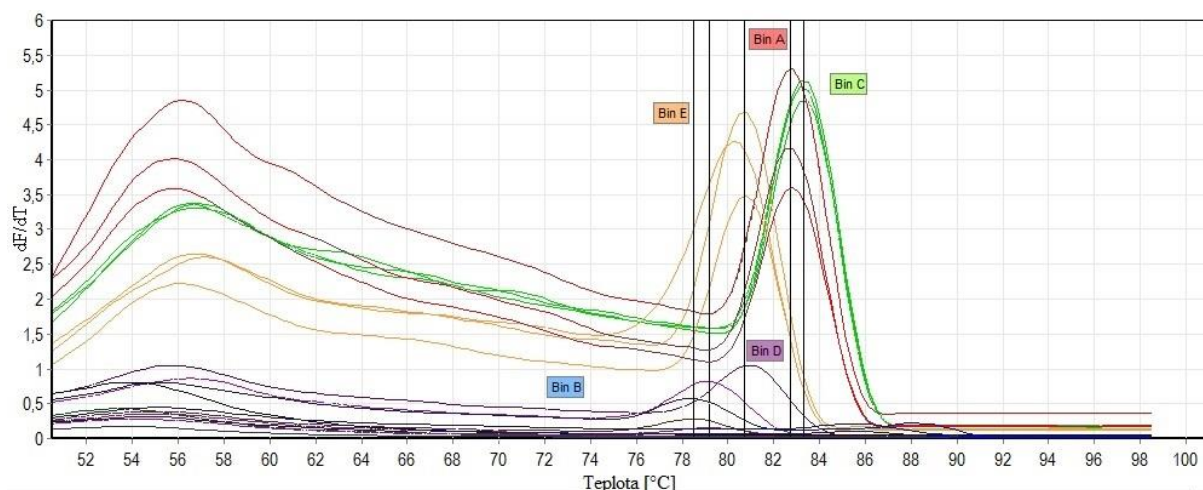
U primeru MD FKBP53 byla nejnižší intenzita fluorescence, která byla dokonce nižší než u její negativní kontroly, proto byl tento primer vyloučen pro další práci. Specifický produkt měl teplotu tání při 79,2 °C.

U primeru MD FKBP65 byla účinnost amplifikace nižší kolem 17 %. U negativní kontroly vznikl nespecifický produkt, který měl teplotu tání 78,5 °C a teplota tání specifického produktu byla vyšší a to 80,7 °C. Z toho vyplývá, že se jednalo pouze o nespecifický produkt.

Primery MDP a MD FKBP53 se při těchto podmínkách vůbec neamplifikovaly a pokud by se s nimi chtělo pracovat, musel by se změnit program.



Obrázek 32 – Amplifikační křivky specifických jablečných primerů,  
FT MDP NK – černá, FT MDP – červená, MDP NK – tm. modrá, MDP – modrá,  
MD FKBP42 NK – tm. zelená, MD FKBP42 – zelená, MD FKBP53 NK – tm. fialová,  
MD FKBP53 – fialová, MD FKBP65 NK – hnědá, MD FKBP65 – oranžová



Obrázek 33 – Křivky tání specifických jablečných primerů, FT MDP NK – černá, FT MDP – červená, MDP NK – tm. modrá, MDP – modrá, MD FKB42 NK – tm. zelená, MD FKB42 – zelená, MD FKB53 NK – tm. fialová, MD FKB53 – fialová, MD FKB65 NK – hnědá, MD FKB65 – oranžová

Tabulka 23 – Naměřené hodnoty pro specifické produkty

	FT MDP	MDP	MD FKB42	MD FKB53	MD FKB65
Účinnost reakce [%]	22	2	25	3,5	17
teplota tání Tm [°C]	82,7	78,5	83,3	79,2	80,7
délka fragmentu [bp]	182	278 810	186	-	118

Výsledky agarosové gelové elektroforézy amplikonů specifických pro jablko můžete vidět na následujícím obrázku (Obrázek 34). Po analýze PCR produktů na gelu vypadají negativní kontroly čistě.

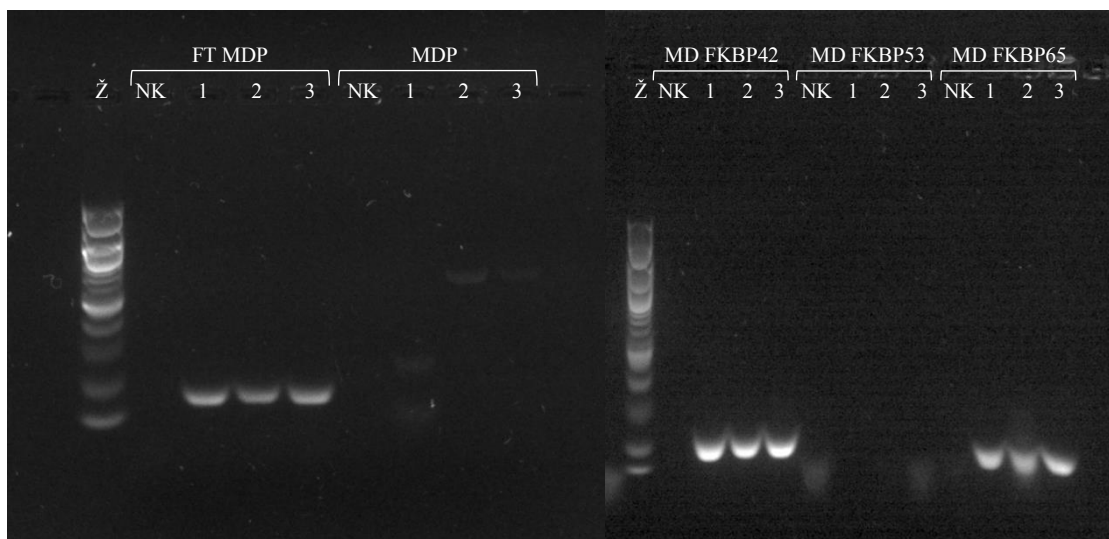
Velikost fragmentů jablečné DNA u primeru FT MDP byla kolem 182 bp, podobně velké úseky měl i primer MD FKB42 (186 bp). U obou primerů byla čistá negativní kontrola bez dimerů nebo oligomerů primerů.

U primeru MD FKB65 byly v negativní kontrole detekovány dimery primerů. Délka specifického úseku DNA se pohybovala okolo 118 bp.

Při použití primeru MDP vznikly ve dvou případech specifické produkty velikosti 810 bp. V jednom případě vznikl produkt o velikosti 278 bp a u tohoto vzorku se objevila i světlá oblast na gelu v oblasti od 131 do 179 bp. Díky tomu, že délka specifických produktů pro tento primer vyšla odlišně v triplicátu, kdy vznikly různě velké produkty, které byly navíc špatně detekovatelné, je tento primer nevhodný pro další práci.

V negativní kontrole u primeru MD FKB53 byla detekována světlá oblast, která odpovídá velikosti od 192 bp níže. Tato oblast vznikla i u jednoho ze vzorků.

Z výsledků amplifikace DNA a elektroforézy amplifikované DNA vyplývá, že vhodnými speciálními primery pro další práci jsou primery **FT MDP** a **MD FKB42**.



Obrázek 34 – Elektroforetická analýza s amplifikovanou jablečnou DNA

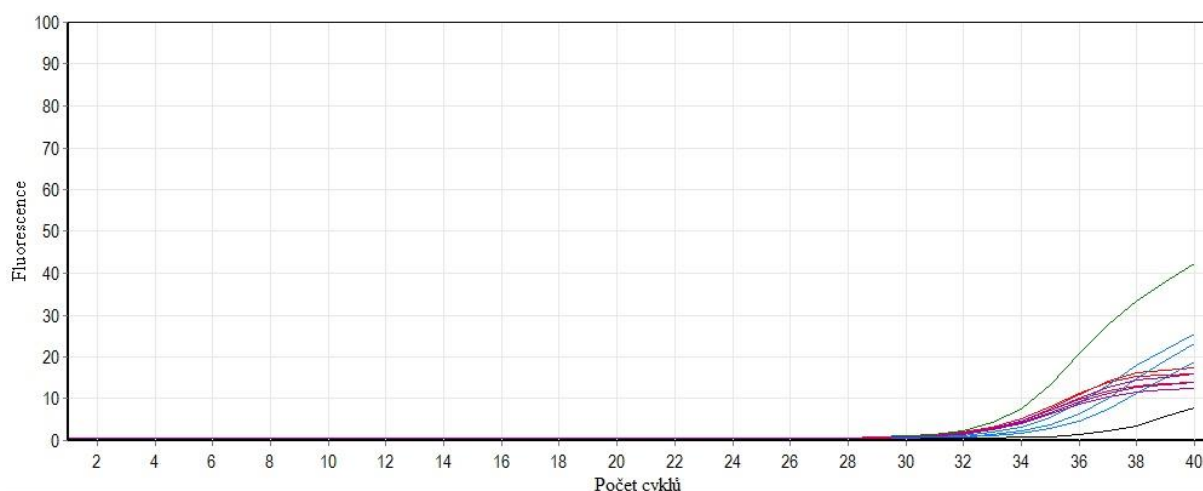
### 4.3.8 Testy specificity vybraných primerů

#### 4.3.8.1 Test specificity jahodového primeru APX1B

Postup ověření specificity použitých jahodových primerů je uveden v kapitole 4.2.13. Byla testována amplifikace meruňkové, malinové a jablečné DNA.

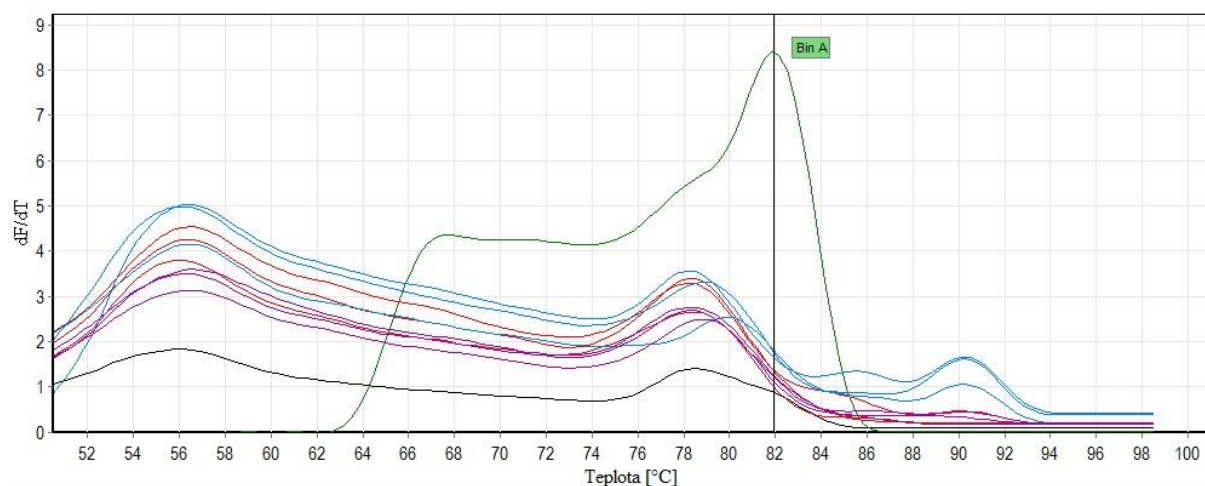
U pozitivní kontroly byl detekován specifický produkt odpovídající jahodové DNA. Z křivky tání je patrné, že u negativní kontroly vznikaly pravděpodobně dimery primerů a nespecifické produkty s odlišnou teplotou tání, než má specifický produkt. U maliny vznikl při vyšší teplotě pík, který může označovat specifický produkt, vzniklý nasednutím tohoto primeru na malinovou DNA.

Nespecifické produkty, které vznikly v negativní kontrole, ale i ve vzorcích s jinou DNA než s jahodovou, měly teplotu tání nižší, než je teplota tání specifického produktu u jahodové DNA.



Obrázek 35 – Amplifikační křivka specifického jahodového primeru APX1B  
NK – černá, PK – zelená, meruňka – červená, malina – modrá, jablko – fialová

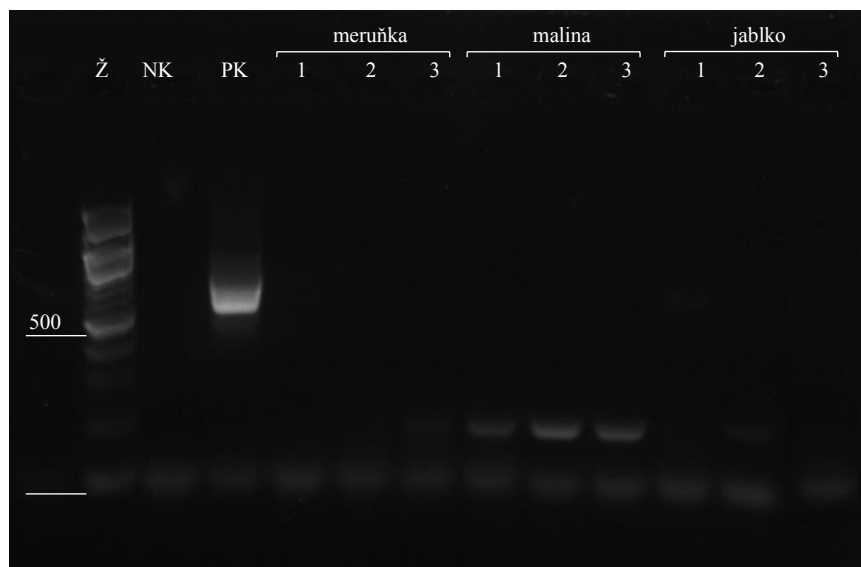




Obrázek 36 – Křivka tání specifického jahodového primeru APX1B  
 NK – černá, PK – zelená, meruňka – červená, malina – modrá, jablko – fialová

Pozitivní kontrola obsahuje jeden specifický produkt, který je větší než 500 bp. Negativní kontrola a všechny vzorky obsahují pravděpodobně dimery primerů, což bylo patrné i z křivky tání (Obrázek 36), kde vzorky měly vyšší pozadí.

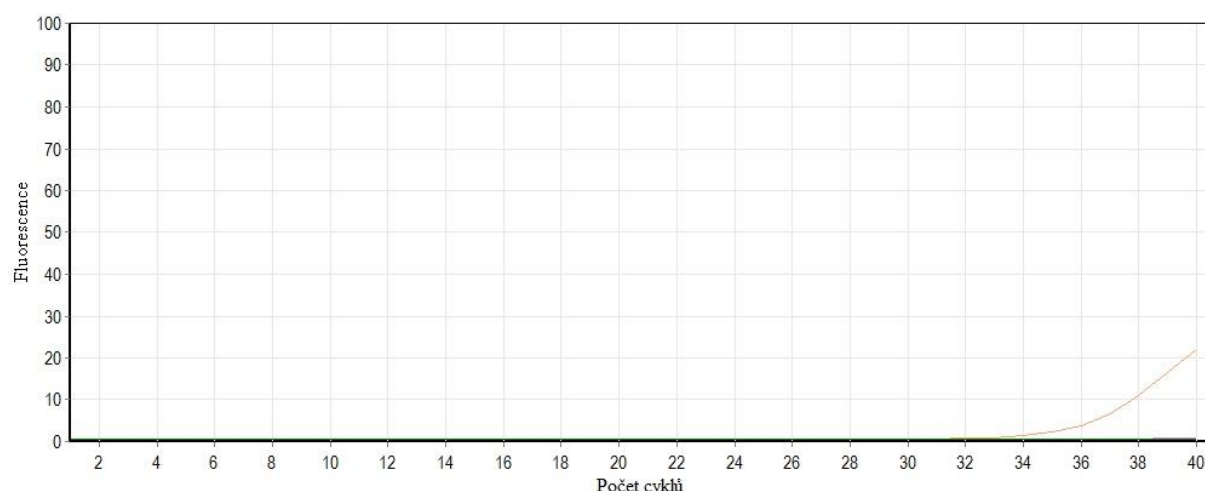
U vzorku s malinovou DNA se objevily bandy o velikosti okolo 200 bp, což korelovalo s křivkou tání, u které byl detekován specifický produkt při vyšší teplotě okolo 90,3 °C. Pro další práci (multiplex PCR) musíme brát v potaz, že pár primerů APX1B není zcela specifický jen pro jahodovou DNA, ale pravděpodobně nasedají i na malinovou DNA, což by mohlo způsobit falešně pozitivní výsledek. Produkt vzniklý reakcí malinové DNA s primerem APX1B má vyšší teplotu tání (90,3 °C) než specifický produkt vzniklý s malinovým primerem RiACO1 (87,2 °C). Produkty obou reakcí mají bohužel velmi podobnou velikost (přes 200 bp) a elektroforeticky nepůjdou odlišit.



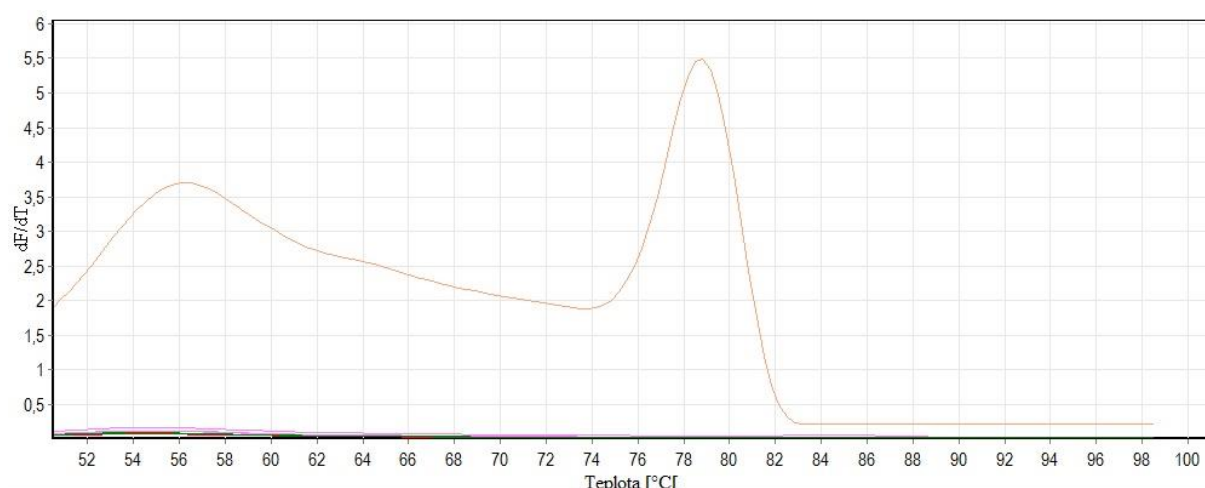
Obrázek 37 – Gelová elektroforéza pro jahodový primer APX1B

#### 4.3.8.2 Test specifity meruňkového primeru AGS6

Postup ověření specifity použitých meruňkových primerů je uveden v kapitole 4.2.13. Byla testována amplifikace jahodové, malinové a jablečné DNA.



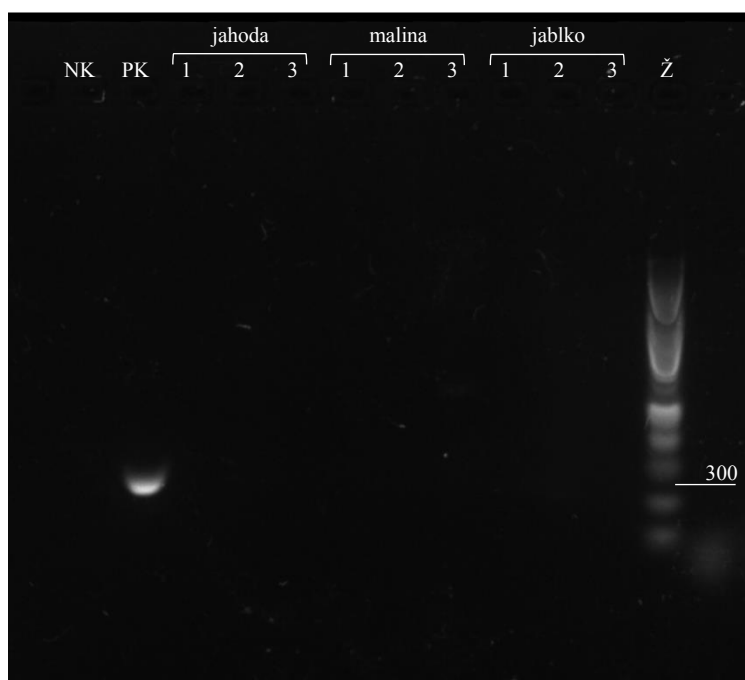
Obrázek 38 - Amplifikační křivky specifického meruňkového primeru AGS6  
NK – černá, PK – oranžová, jahoda – červená, malina – růžová, jablko – zelená



Obrázek 39 – Křivky tání specifického meruňkového primeru AGS6  
NK – černá, PK – oranžová, jahoda – červená, malina – růžová, jablko – zelená

U pozitivní kontroly vznikl očekávaný specifický produkt, který odpovídá teplotou tání a jehož velikost se pohybovala okolo 230 bp.

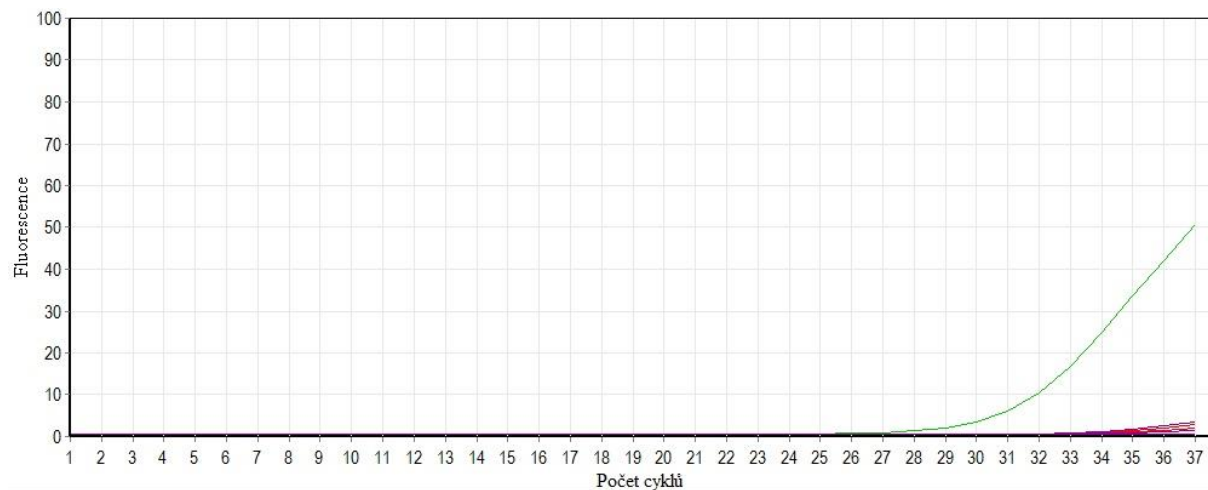
Negativní kontrola byla bez přítomnosti nespecifických produktů nebo dimerů primerů. Primer AGS6 může být použit pro multiplex PCR a je specifický pro meruňku.



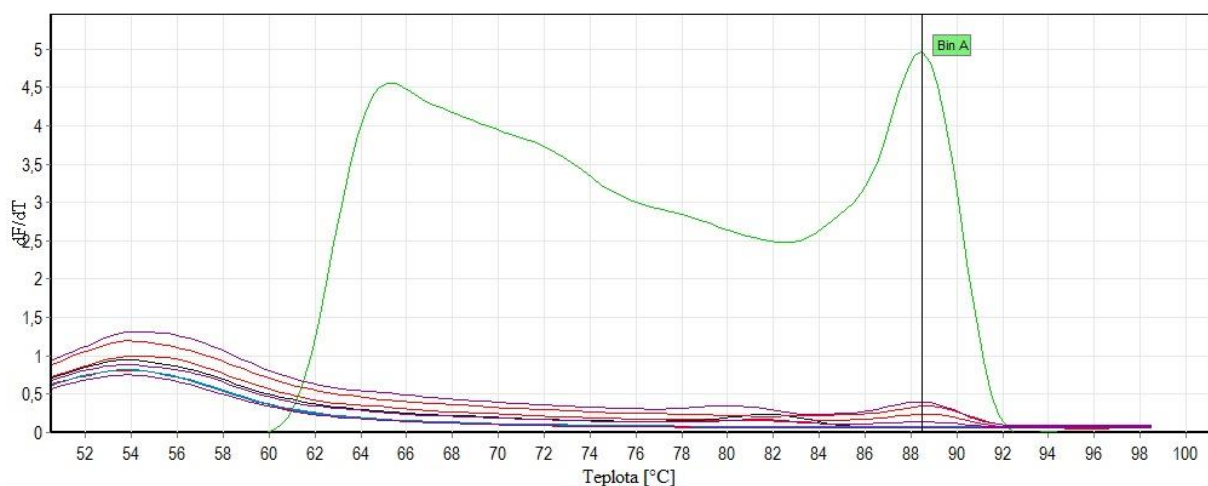
Obrázek 40 – Gelová elektroforéza pro specifický meruňkový primer AGS6

#### 4.3.8.3 Test specificity malinových primerů Ri1 a RiACO1

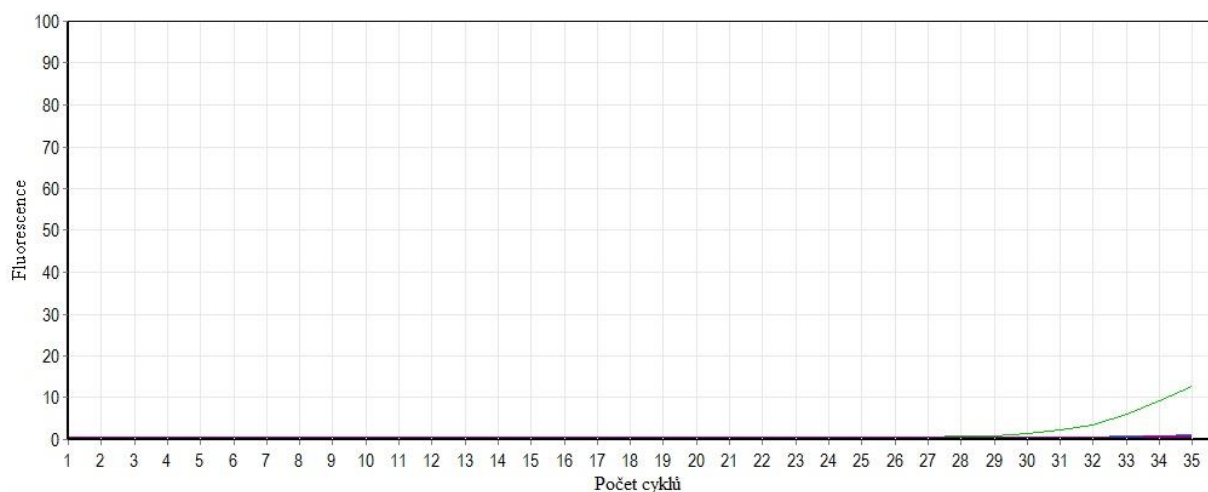
Postup ověření specificity použitých malinových primerů je uveden v kapitole 4.2.14. Byla testována amplifikace jahodové, meruňkové a jablečné DNA.



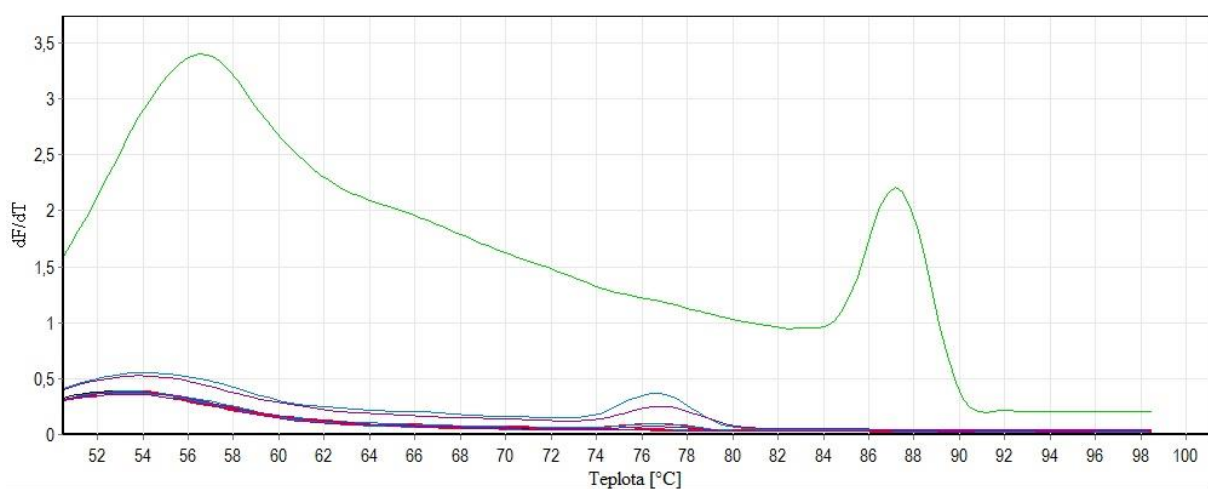
Obrázek 41 – Amplifikační křivky pro specifický malinový primer Ri1  
NK – černá, PK – zelená, jahoda – červená, meruňka – modrá, jablko – fialová



Obrázek 42 – Křivky tání specifického malinového primeru Ri1  
 NK – černá, PK – zelená, jahoda – červená, meruňka – modrá, jablko – fialová



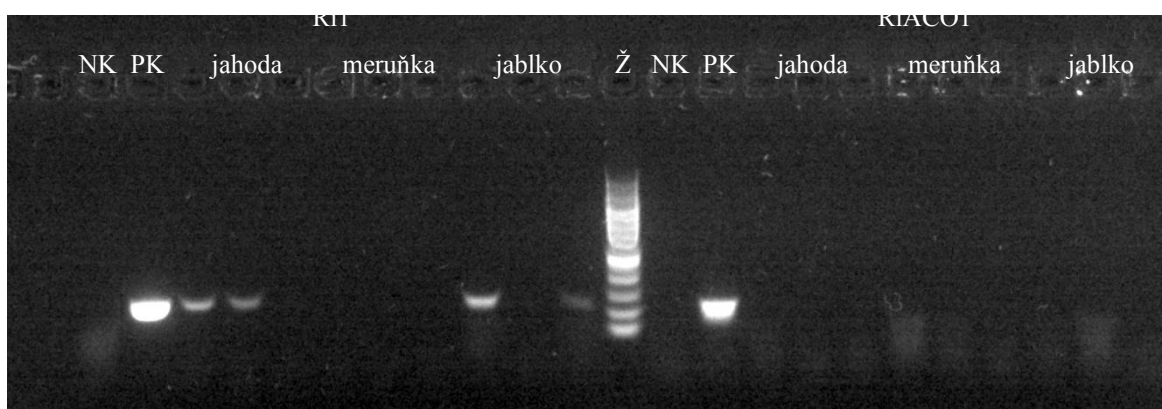
Obrázek 43 - Aplifikační křivky pro specifický malinový primer RiACO1  
 NK – černá, PK – zelená, jahoda – červená, meruňka – modrá, jablko - fialová



Obrázek 44 - Křivky tání specifického malinového primeru RiACO1  
 NK – černá, PK – zelená, jahoda – červená, meruňka – modrá, jablko – fialová

Pozitivní kontroly pro oba primery obsahovaly pouze jeden specifický produkt odpovídající velikostně i křivkou tání malinové DNA. Negativní kontrola obsahovala pravděpodobně dimery primerů, přitom u primeru Ri1 jich bylo víc.

U primeru Ri1 byly z křivek tání patrné píky u vzorků s jahodovou a jablkovou DNA, které měly stejnou teplotu tání (88,5 °C) jako specifický produkt u malinové DNA. Pomocí elektroforézy bylo potvrzeno, že vznikaly u jablečné a jahodové DNA specifické produkty, které měly podobnou délku jako specifický amplikon malinové DNA.

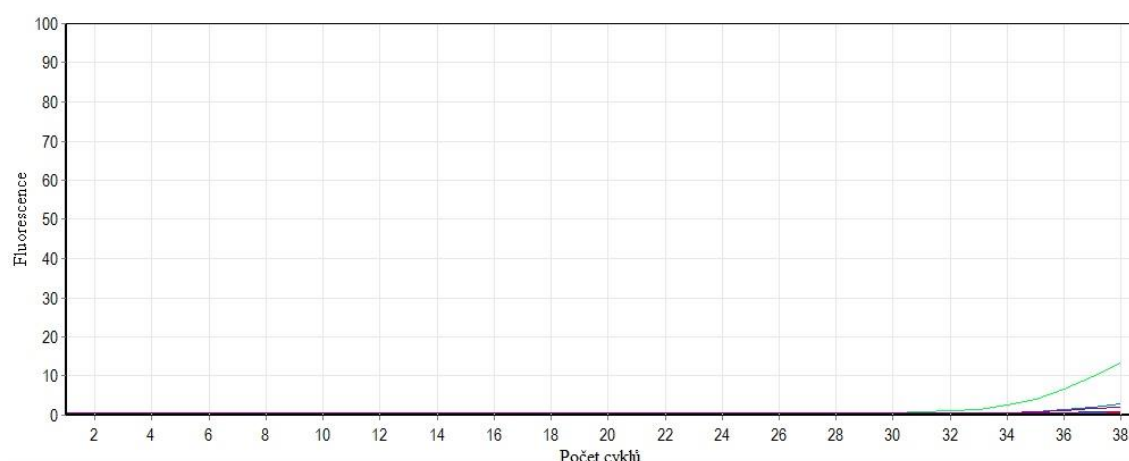


Obrázek 45- Elektroforéza na 1,2% agarosovém gelu specifické malinové primery

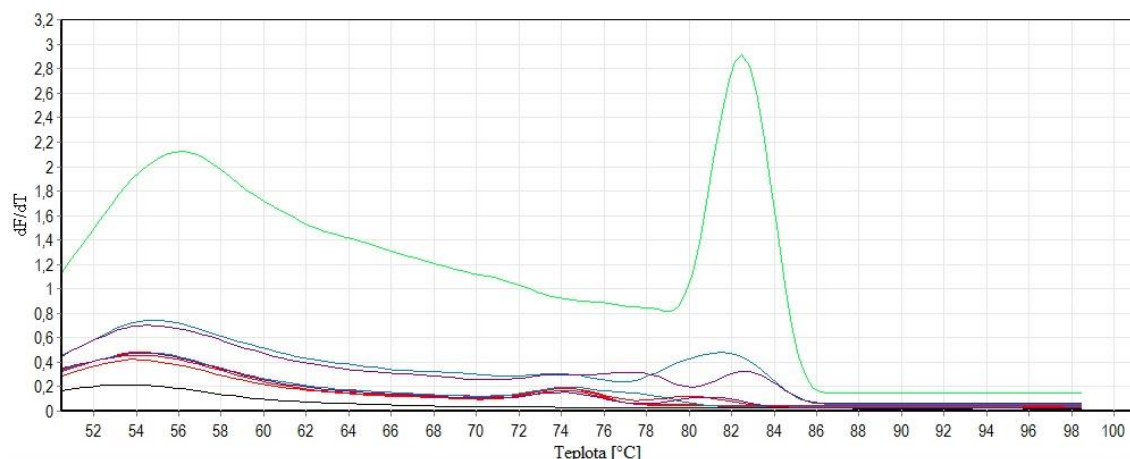
U primeru RiACO1 vznikaly pouze nespecifické produkty, které měly teplotu tání okolo 76,7 °C, což je nižší teplota než pro specifický produkt u malinové DNA. Při elektroforetické analýze, kterou můžeme vidět na následujícím obrázku (Obrázek 45), byly patrné pouze menší fragmenty, než je specifický malinový produkt, což mohly být například dimery primerů. Z těchto důvodů byl, jako vhodný primer pro další práci, zvolen specifický primer **RiACO1**.

#### 4.3.8.4 Test specifity jablečného primeru FT MDP

Postup ověření specifity použitých jablečných primerů je uveden v kapitole 4.3.7. Byla testována amplifikace jahodové, meruňkové a malinové DNA.



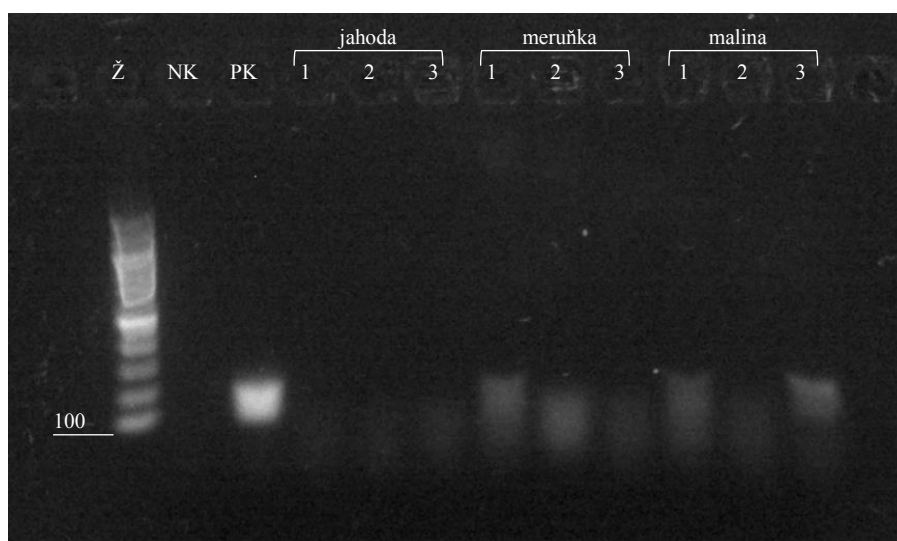
Obrázek 46 - Amplifikační křivky pro specifický jablečný primer FT MDP  
NK – černá, PK – zelená, jahoda – červená, meruňka – modrá, malina – fialová



Obrázek 47 - Křivky tání specifického jablečného primeru FT MDP  
 NK – černá, PK – zelená, jahoda – červená, meruňka – modrá, malina – fialová

U pozitivní kontroly byl detekován pouze jeden specifický produkt, který teplotou tání odpovídal jablečné DNA. Na elektroforéze se jednalo o poměrně široký band, takže nelze přesně určit velikost produktu (100-250 bp).

Negativní kontrola byla čistá. Ve vzorcích vznikly různé nespecifické produkty, které ale měly jinou teplotu tání než specifický produkt.



Obrázek 48 – Gelová elektroforéza se specifickým jablečným primerem FT MDP

#### 4.3.9 Multiplex PCR pro jahodovou a malinovou DNA

Po výběru vhodných specifických primerů pro jahodovou (APX1B) a malinovou DNA (RiACO1) a ověření jejich specificity nasedání pouze na určenou DNA mohla být vytvořena multiplex PCR. Aby mohly být vybrané primery spolu kombinovány, musely být specifické pro danou DNA. Aby došlo k odlišení vzniklých amplikonů, musely se od sebe lišit teplotou tání a svou délkou.

Jak už bylo zmíněno v předchozí kapitole 4.3.8.1, tak primer APX1B pravděpodobně reaguje s malinovou DNA a vytváří specifický produkt, který má vysokou teplotu tání 90,3 °C a délku okolo 200 bp.

Tabulka 24 – Souhrn zjištěných informací pro vybranou dvojici primerů

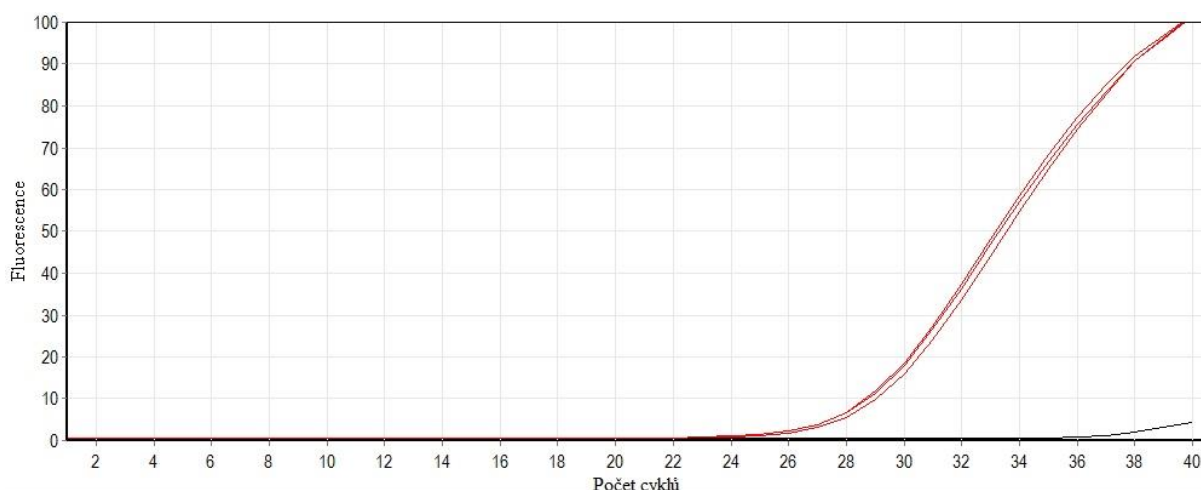
	APX1B	RiACO1
Teplota tání $T_m$ [°C]	82,2	87,2
Délka fragmentu [bp]	655	218
Specifická	není zcela	je specifický

Postup výběru vhodného teplotního profilu pro duplex PCR obsahující dvojici páru specifických pro jahodovou DNA (APX1B) a malinovou DNA (RiACO1) je uveden v kapitole 4.2.16.

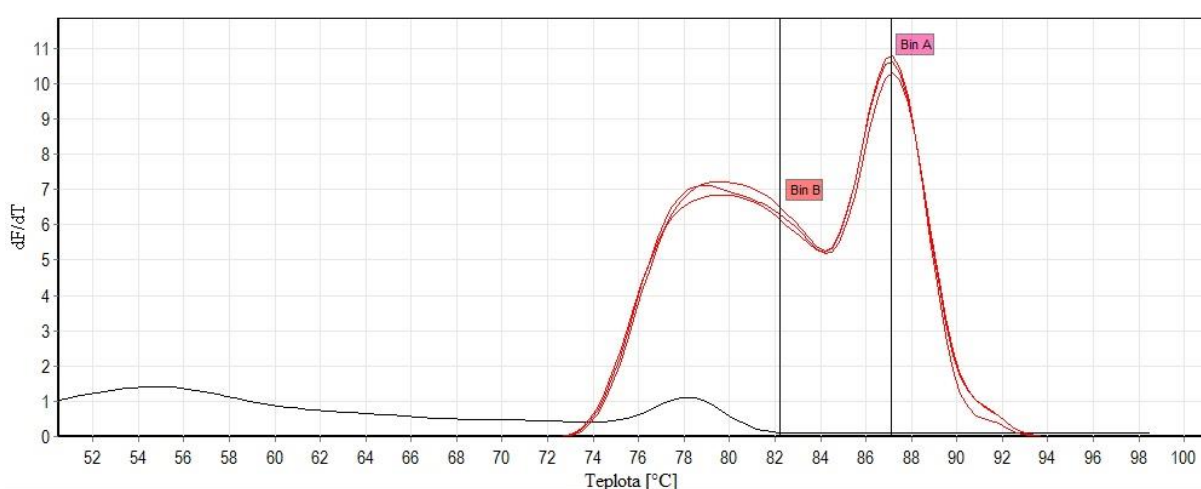
➤ Výsledky PCR s programem optimalizovaným na specifický jahodový primer APX1B:

Amplifikační křivka negativní kontroly se od 37 cyklu zvedla. U křivky tání měla negativní kontrola pík kolem 78 °C.

Intenzita fluorescence vzorků vystoupala až ke 100 %. Křivka tání má maximum při 87,2 °C, což odpovídá malinové DNA. Předpokládané maximum teploty tání ampliconu jahodové DNA nemá u příslušné teploty (82,2 °C) vrchol, a proto by bylo vhodné provést analýzu HRM s postupným zvyšováním teploty při menším teplotním kroku. Díky, které by byla sestrojena podrobnější křivka tání a bylo by možné rozlišit pík pro specifický jahodový amplicon.

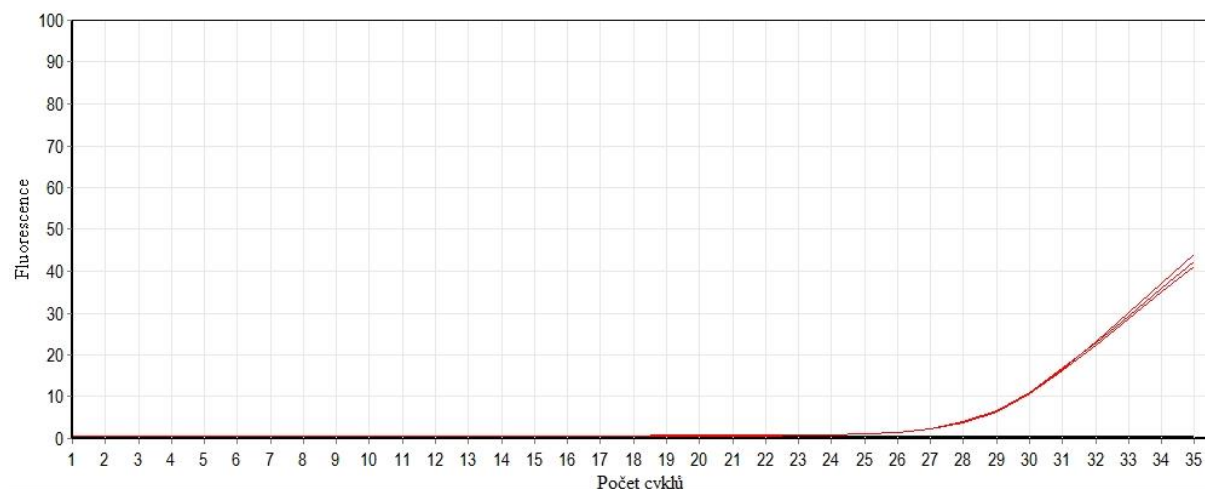


Obrázek 49 – Amplifikační křivky s primery APX1B a RiACO1 a s jahodovou a malinovou DNA

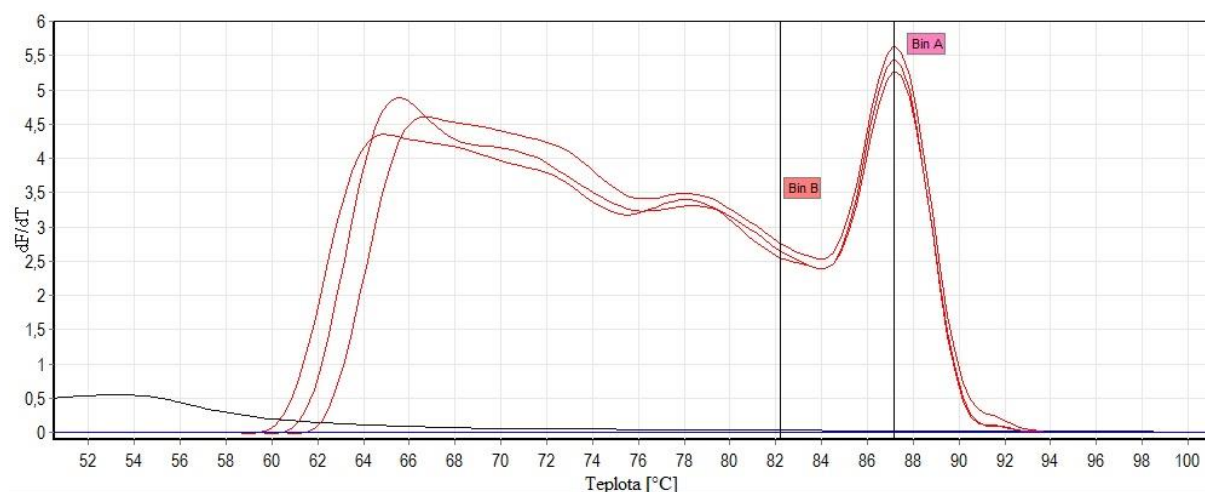


Obrázek 50 – Křivky tání jahodové a malinové DNA, primery APX1B a RiACO1

➤ Výsledky PCR s programem optimalizovaným na specifický primer maliny RiACO1:



Obrázek 51 – Amplifikační křivky s primery APX1B a RiACO1 a s jahodovou a malinovou DNA



Obrázek 52 – Křivky tání jahodové a malinové DNA s primery APX1B a RiACO1

Z amplifikační křivky a z křivky tání je patrná čistá negativní kontrola, u níž vzniklo málo dimerů primerů. Intenzita fluorescence vystoupala až k 44 %. Křivka tání měla maximum píku v teplotě 87,2 °C, což odpovídá malinové DNA. Jahodová DNA by měla mít maximum u 82,2 °C, což není viditelné na těchto křivkách tání (Obrázek 52). Možná by byla zapotřebí, podrobnější teplotní analýza teploty tání nebo vhodnější teplotní profil PCR reakce, která byla primárně optimalizována na malinový primer RiACO1.

Před elektroforetickou analýzou byly vzorky s teplotním profilem optimalizovaným na jahodový primer APX1B podrobeny vysokorozlišovací analýze křivek tání. Výsledky této analýzy jsou uvedeny v kapitole 4.3.12. Výsledky gelové elektroforézy na 1,2% agarosovém gelu pro produkty duplex PCR jsou na obrázku (Obrázek 70) uvedeném v kapitole 4.3.13.

Z gelu je patrné, že program PCR optimalizovaný pro jahodový primer APX1B je vhodnější pro další práci. U vzorků s tímto programem jsou dobře viditelné dva bandy, z čehož lze usuzovat, že obě ovocné DNA byly úspěšně amplifikovány. Větší fragmenty okolo 587 bp patří jahodové DNA a menší fragmenty (177 bp) odpovídají malinové DNA. V negativní kontrole byly detekovány pouze dimery primerů.



U programu optimalizovaného pro malinový primer RiACO1 lze dobře vidět jen jeden band okolo 220 bp odpovídající amplifikované DNA maliny.

Nějaká jahodová DNA se pravděpodobně amplifikovala, což je indikováno světlou oblastí na gelu mezi 500-700 bp. U negativní kontroly i vzorků byly patrné opět dimery primerů jako u programu optimalizovaného pro jahodový primer APX1B.

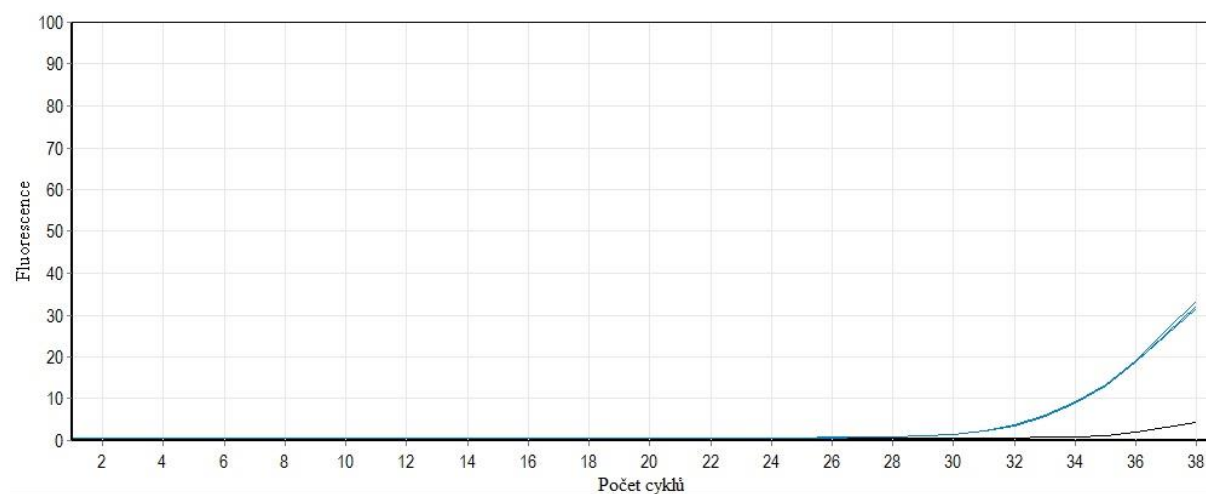
#### 4.3.10 Multiplex PCR pro meruňkovou a jablečnou DNA

Postup výběru vhodného teplotního profilu pro duplex PCR obsahující dvojici páru specifických pro meruňkovou DNA (AGS6) a jablečnou DNA (FT MDP) je uveden v kapitole 4.2.16.

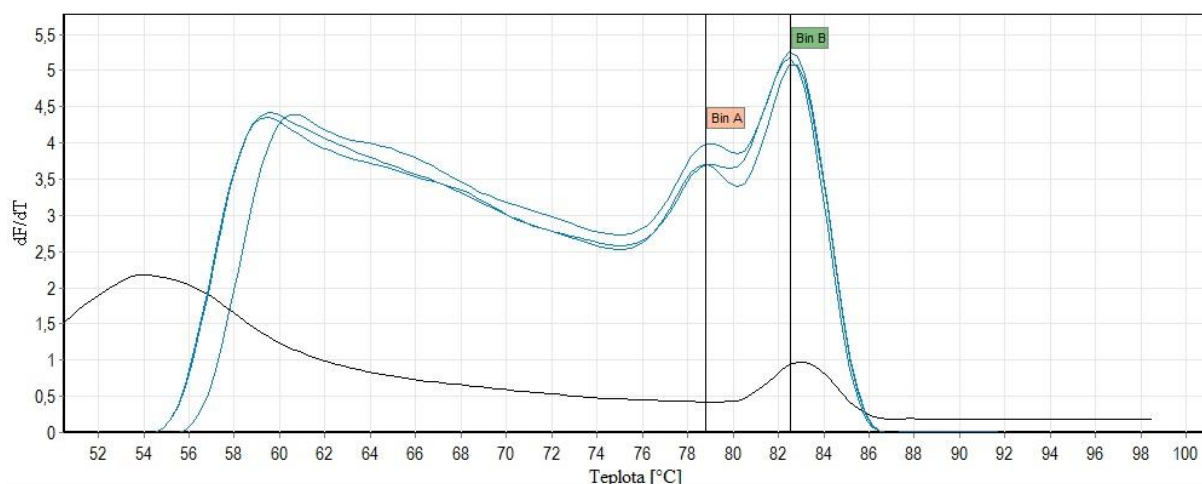
➤ Výsledky PCR s programem optimalizovaným na specifický jablečný primer FT MDP:

Amplifikační křivka negativní kontroly se od 35 cyklu lehce zvedla. Z křivky tání lze usuzovat, že u negativní kontroly vznikly asi nějaké dimery primerů a také nějaký nespecifický produkt s maximem při 83 °C, což se liší od teploty tání specifického jablečného produktu.

Intenzita fluorescence vzorků byla nižší a měla hodnotu okolo 33 %. Jak je vidět z křivky tání, tak lze od sebe dobře rozeznat vrcholy píků pro meruňkovou a jablečnou DNA. Meruňková DNA má maximum při 78,8 °C a jablečková DNA má maximum při 82,5 °C, což je nižší hodnota, než má nespecifický produkt v negativní kontrole. Z toho vyplývá, že program zvolený pro jablečný primer FT MDP může být použit pro multiplex PCR.



Obrázek 53 – Amplifikační křivky s primery AGS6 a FT MDP a s meruňkovou a jablečnou DNA



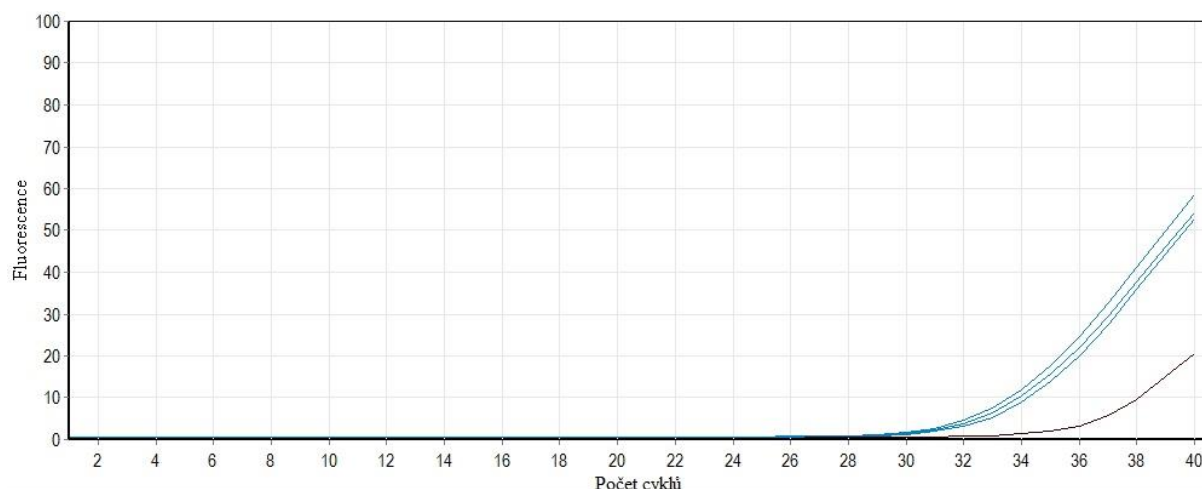
Obrázek 54 – Křivky tání meruňkové a jablkové DNA s primery AGS6 a FT MDP

➤ Výsledky PCR s programem optimalizovaným na specifický meruňkový primer AGS6:

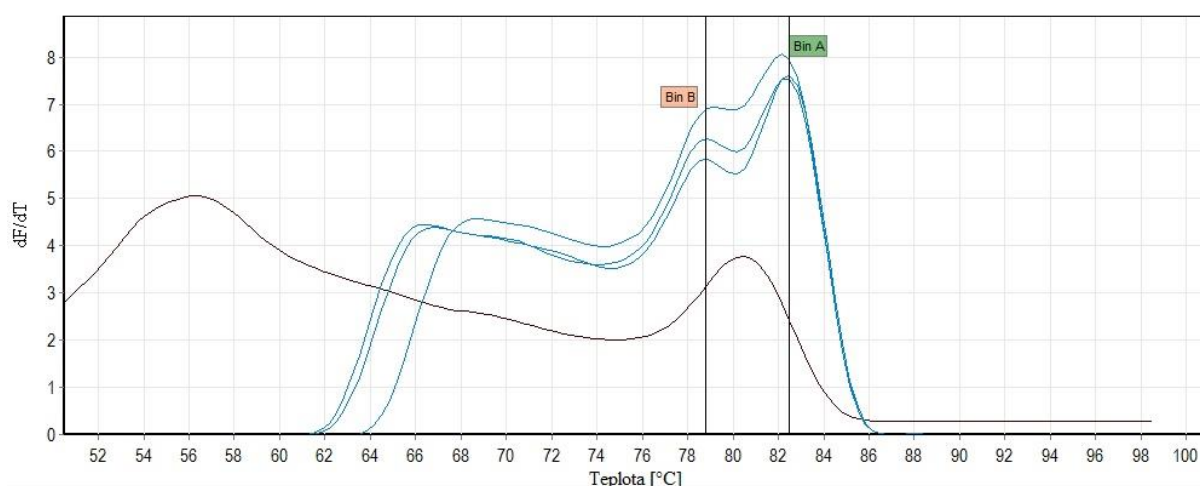
Amplifikační křivka negativní kontroly se od 35 cyklu zvedla až na 20 % tedy víc než u programu optimalizovaného na jablkovou DNA. U negativní kontroly taktéž vznikl nespecifický produkt, který má maximum píku při 80,5 °C.

Amplifikační křivky vzorku měly intenzitu fluorescence okolo 55 %. Z křivek tání lze rozeznat píky pro jablkovou a meruňkovou DNA a obě maxima odpovídají specifickým primerům pro dané ovoce. Jablková DNA má maximum při teplotě 82,5 °C a meruňková DNA má teplotu tání při 78,8 °C. Tyto teploty tání přibližně odpovídají teplotám tání specifických produktů, které vznikly při programu PCR optimalizovaného na jablkovou DNA.

Při porovnání křivek tání vzniklých při odlišných teplotních profilech, se jako vhodnější pro další práci zdá teplotní profil optimalizovaný pro meruňkový primer AGS6. Jeho fluorescence u amplifikačních křivek je vyšší, křivky tání mají menší náběh a dosahují vyšších hodnot než u programu optimalizovaného pro jablkový primer. Další výhodou je to, že teplotní profil je stejný jako pro jahodovou DNA a možná by po další optimalizaci mohla být provedena multiplex PCR s více než dvěma páry primerů.



Obrázek 55 - Amplifikační křivky s primery AGS6 a FT MDP a s meruňkovou a jablkovou DNA



Obrázek 56 - Křivky tání meruňkové a jablečné DNA s primery AGS6 a FT MDP

Amplifikované produkty s meruňkovou a jablečnou DNA pro oba teplotní profily byly ještě před nanesením na gel podrobeny vysokorozlišovací analýze křivek tání (viz kapitola 4.3.12). Díky tomu mohly být zkontrolovány negativní kontroly a poté byl vybrán vhodný teplotní profil pro analýzu modelových směsí a komerčních vzorků. Výsledek elektroforézy je zobrazen na obrázku (Obrázek 70) uvedeném v kapitole 4.3.13.

U teplotního profilu optimalizovaného pro meruňkový primer AGS6 lze vidět o něco málo výraznější fluorescenci. U negativní kontroly jsou přítomny dimery primerů, které jsou menší než 100 bp a menší než specifický produkt jablečné DNA. U vzorků jsou viditelné dva bandy, kdy větší odpovídá specifickému produktu meruňkové DNA a menší jablečné DNA.

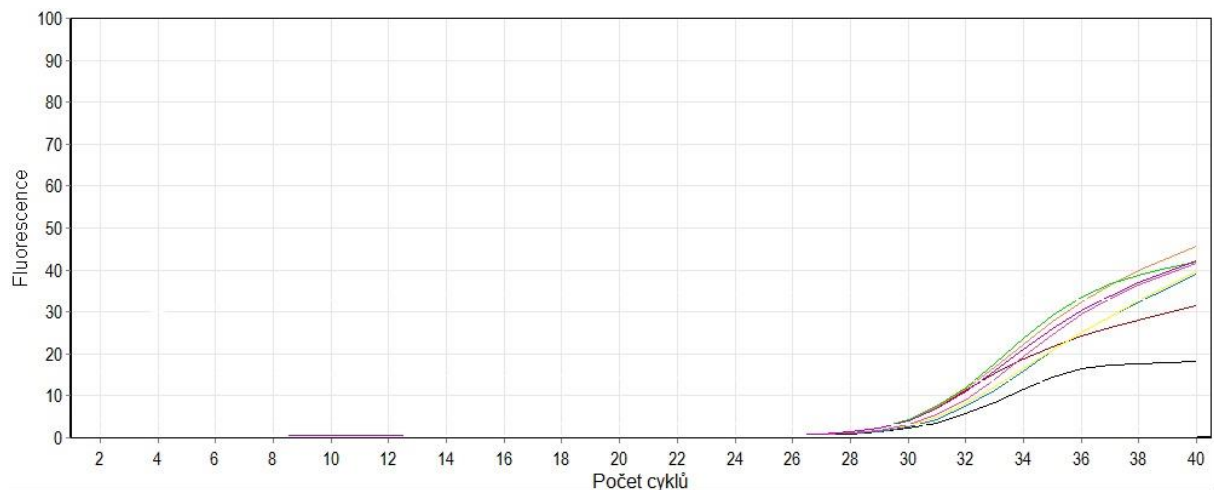
Při použití teplotního profilu optimalizovaného pro jablečnou DNA vypadá, že v negativní kontrole vznikl specifický produkt pro jablečnou DNA. Z tohoto výsledku je usuzováno, že při tomto teplotním profilu primer AGS6 nemusí být zcela specifický jen pro meruňkovou DNA. Taktéž při testu specificity primeru AGS6 s jablečnou DNA vznikl produkt u jednoho vzorku, který byl detekován na gelu. Vznik bandů u vzorku byl nejdříve pokládán za chybu vzniklou při přípravě vzorků, ale je možné, že primer AGS6 není dostatečně specifický.

#### 4.3.11 Multiplex PCR pro modelové směsi a komerční vzorky

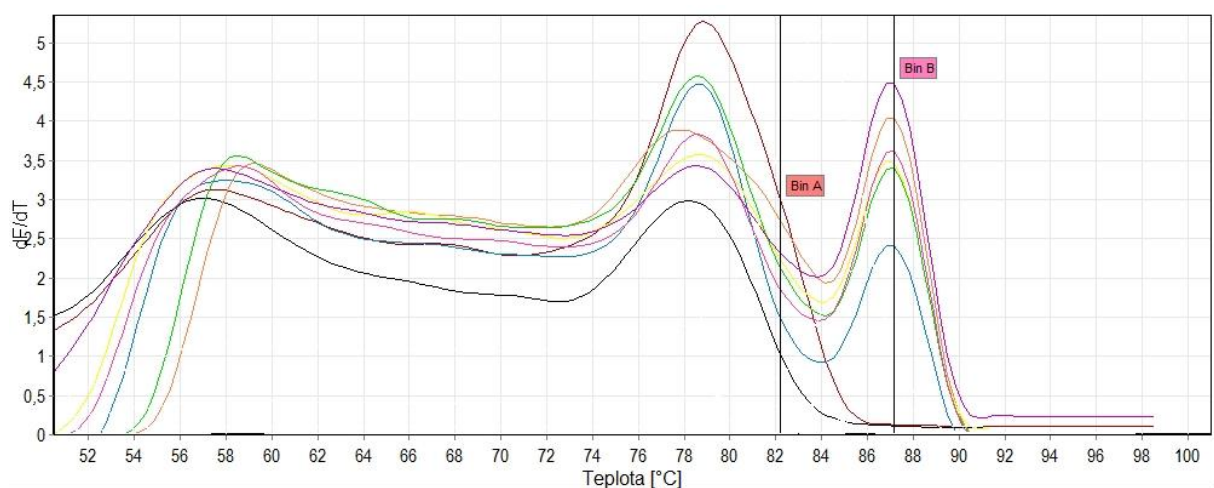
K analýze přítomnosti ovocné DNA v modelových a komerčních vzorcích byly navrženy a optimalizovány dvě duplex PCR pro současnou detekci jahodové a malinové DNA a potom meruňkové a jablečné DNA. Jako vhodný teplotní profil (viz 4.2.94.2.16) pro obě duplex PCR byl vybrán teplotní profil optimalizovaný pro jahodový primer APX1B a meruňkový primer AGS6. Výsledky duplex PCR pro jahodovo-malinové modelové směsi jsou uvedeny na následujících grafech (Obrázek 57 a Obrázek 58).

Účinnost amplifikace u modelových směsí s primery APX1B a RiACO1 se pohybovala od 32-44 %. U komerčního vzorku 1 byla účinnost reakce 26 %, u vzorku 2: 19 %, u vzorku 3: 21 % a u vzorku 4: 17 %.

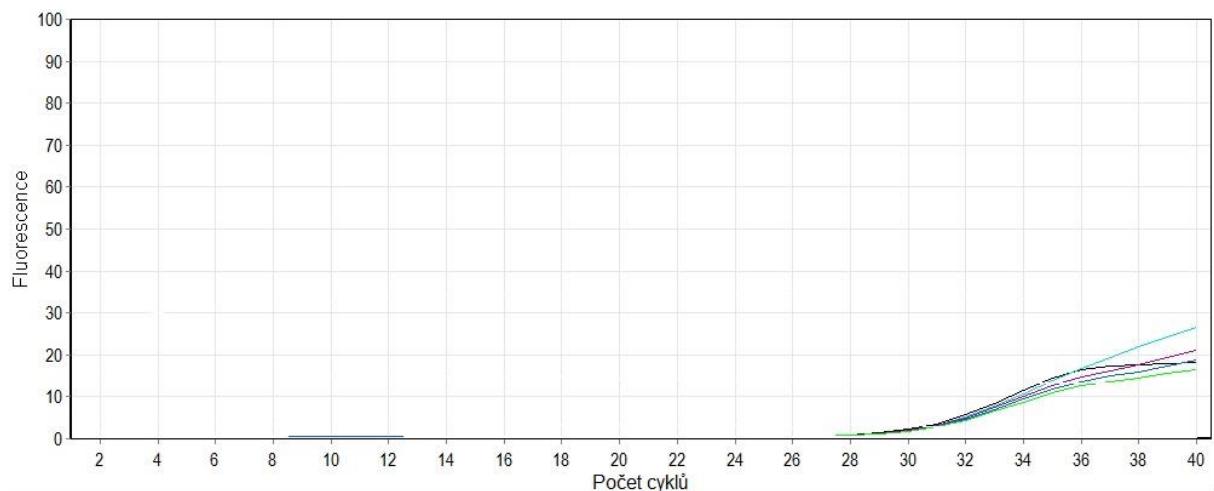
Z křivky tání pro negativní kontrolu lze usuzovat, že obsahovala nespecifický produkt, jehož teplota tání byla 77,8 °C. Komerční vzorky měly velmi podobnou účinnost amplifikace jako negativní kontrola. Při analýze křivek tání s postupně se zvedající teplotou o 1 °C nebylo možné detekovat jahodovou DNA ( $T_m = 82,2$  °C). Z tohoto důvodu byly všechny vzorky dány k HRM analýze (viz 4.3.13), po které následovalo zjištění délky amplikonů.



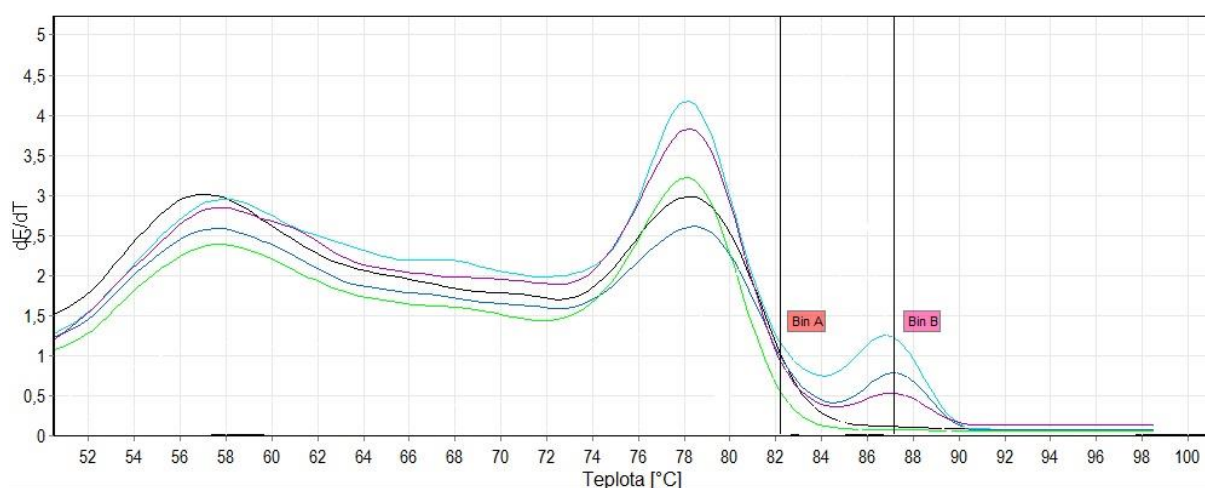
Obrázek 57 – Amplifikační křivky modelových jahodovo-malinových směsí – primery APX1B a RiACO1, NK – černá, 100:0 – hnědá, 50:50 – modrá, 40:60 – oranžová, 30:70 – žlutá, 20:80 – zelená, 10:90 – růžová, 0:100 – fialová



Obrázek 58 – Křivky tání modelových jahodovo-malinových směsí – primery APX1B a RiACO1, NK – černá, 100:0 – hnědá, 50:50 – modrá, 40:60 – oranžová, 30:70 – žlutá, 20:80 – zelená, 10:90 – růžová, 0:100 – fialová



Obrázek 59 – Aplifikační křivky komerčních vzorků – APX1B a RiACO1, NK – černá; vzorek 1 (Hello, jablko + jahoda) – tyrkysová; vzorek 2 (Sunárek, jablko + jahoda) – modrá; vzorek 3 (HiPP, jablko + jahoda + banán + malina) – fialová; vzorek 4 (Hello, jablko + malina) – zelená



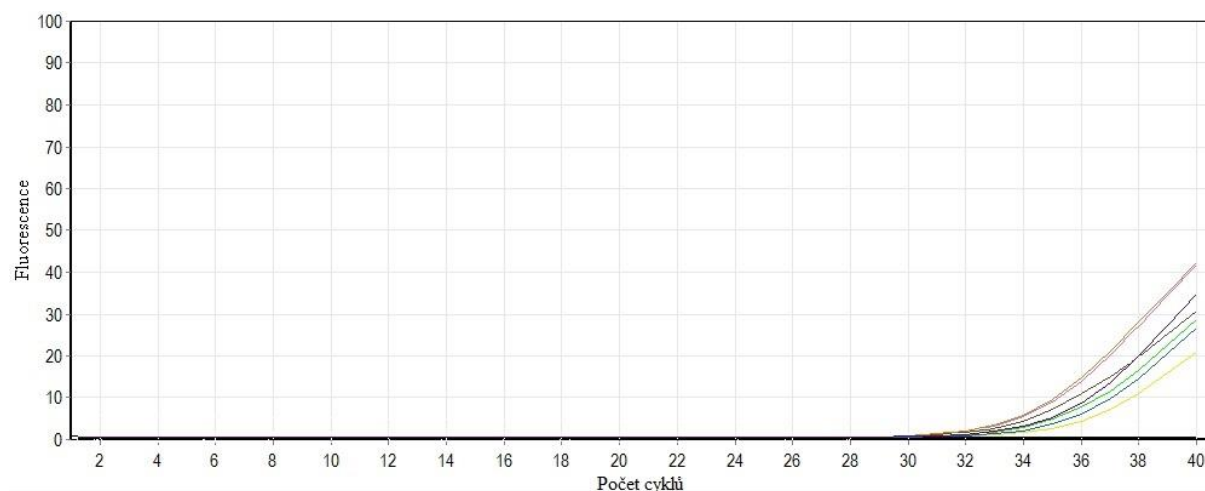
Obrázek 60 – Křivky tání komerčních vzorků – APX1B a RiAC01, NK – černá; vzorek 1 (Hello, jablko + jahoda) – tyrkysová; vzorek 2 (Sunárek, jablko + jahoda) – modrá; vzorek 3 (HiPP, jablko + jahoda + banán + malina) – fialová; vzorek 4 (Hello, jablko + malina) – zelená

Výsledky amplifikace pro duplex PCR s použitím primerů AGS6 pro meruňku a FT MDP pro jablko jsou uvedeny na následujících grafech (Obrázek 61-Obrázek 64).

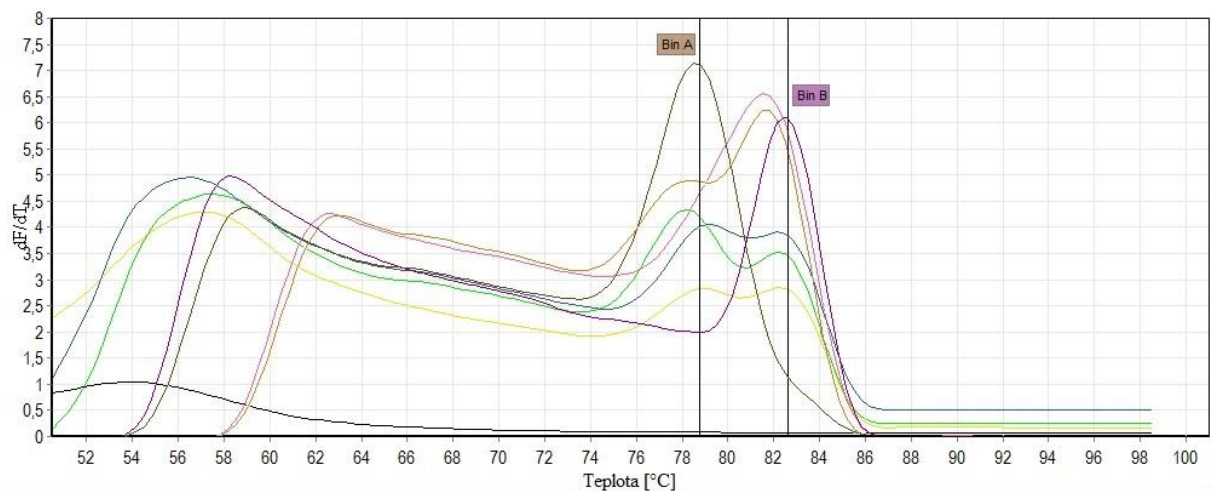
Účinnost amplifikace u modelových směsí s touto dvojicí primerů se pohybovala od 22 do 42 %. U komerčního vzorku 1 byla účinnost reakce 20 %, u vzorku 2: 23 %, u vzorku 3: 20 %, u vzorku 4: 25 %, u vzorku 5: 16% a u vzorku 6: 25 %.

Negativní kontrola byla čistá. U křivek tání modelových směsí je možné pozorovat dva píky, kdy ten s nižší teplotou tání odpovídá meruňkové DNA (78,8 °C) a ten s vyšší teplotou tání odpovídá jablečné DNA (82,5 °C). U modelových směsí, u kterých jsou zastoupeny oba druhy ovoce, došlo k malému posunu píků od předpokládané teploty tání pro čisté ovoce. Z tohoto důvodu je vhodnější provést HRM analýzu, díky které budeme znát přesnější teploty tání produktů. Zjištěné teploty budou sloužit k autentifikaci komerčních směsí. Po skončení HRM analýzy byly vzorky prozkoumány nanesením na gel. Výsledky obou analýz jsou uvedeny v kapitole 4.3.13.

➤ Výsledky amplifikace DNA izolované z meruňkovo-jablečných modelových směsí:

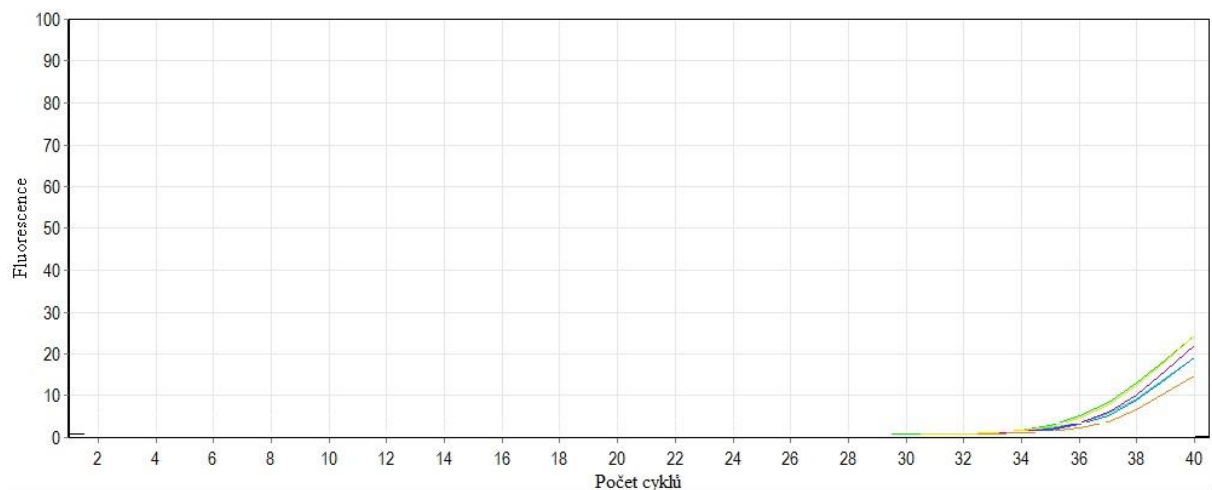


Obrázek 61 – Amplifikační křivky modelových meruňkovo-jablečných směsí s primery AGS6 a FT MDP, NK – černá, 100:0 – hnědá, 50:50 – modrá, 40:60 – oranžová, 30:70 – žlutá, 20:80 – zelená, 10:90 – růžová, 0:100 – fialová

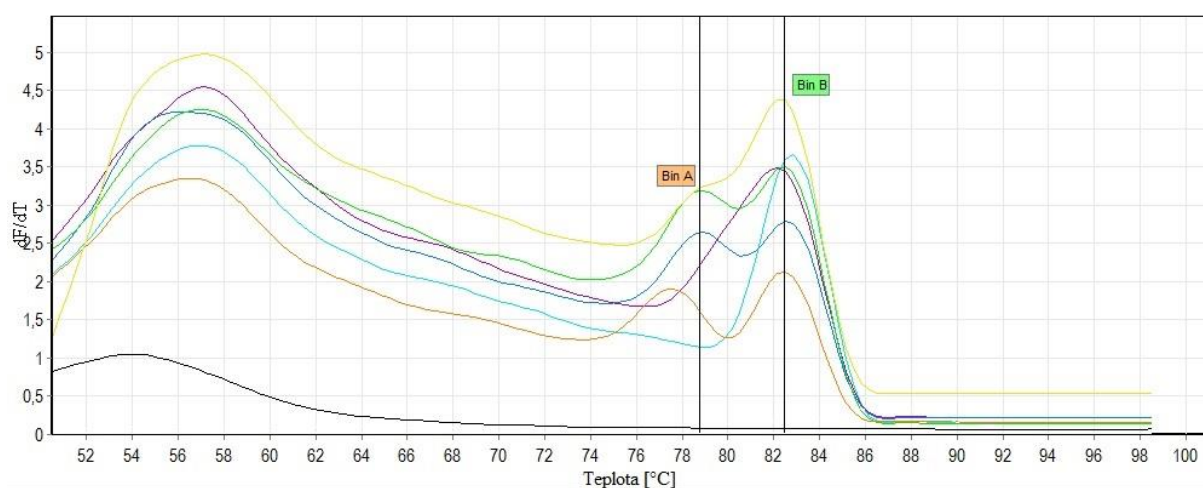


Obrázek 62 – Křivky tání modelových meruňkovo-jablečných směsí s primery AGS6 a FT MDP, NK – černá, 100:0 – hnědá, 50:50 – modrá, 40:60 – oranžová, 30:70 – žlutá, 20:80 – zelená, 10:90 – růžová, 0:100 – fialová

➤ Výsledky amplifikace DNA izolované z komerčních směsí obsahující meruňkovou nebo jablečnou DNA:



Obrázek 63 – Amplifikační křivky komerčních vzorků – AGS6 a FT MDP, NK – černá; vzorek 1 (Hello, jablko + jahoda) – tyrkysová; vzorek 2 (Sunárek, jablko + jahoda) – fialová; vzorek 3 (HiPP, jablko + jahoda + banán + malina) – modrá; vzorek 4 (Hello, jablko + malina) – zelená; vzorek 5 (Nestlé, jablko + meruňka) – oranžová; vzorek 6 (Cvrček, meruňka + jablko) – žlutá



Obrázek 64 – Křivky tání komerčních vzorků – AGS6 a FT MDP, NK – černá; vzorek 1 (Hello, jablko + jahoda) – tyrkysová; vzorek 2 (Sunárek, jablko + jahoda) – fialová; vzorek 3 (HiPP, jablko + jahoda + banán + malina) – modrá; vzorek 4 (Hello, jablko + malina) – zelená; vzorek 5 (Nestlé, jablko + meruňka) – oranžová; vzorek 6 (Cvrček, meruňka + jablko) – žlutá

#### 4.3.12 Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM)

Z amplifikovaných vzorků zkušebních duplex PCR (viz kapitola 4.2.16) byla vybrána vždy negativní kontrola a jeden nejvhodnější vzorek pro vysokorozlišovací analýzu křivek tání. Použitý program pro HRM je uveden v kapitole 4.3.12.

Teploty tání specifických produktů jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 25), při použití HRM s krokem 0,01 °C docházelo k tání specifických produktů při nižší teplotě o 1,54-1,76 °C.

Tabulka 25 – Porovnání teplot tání specifických produktů při kroku 1 °C a 0,01 °C

použité primery		krok 1 °C	krok 0,01 °C
APX1B a RiACO1 (program pro APX1B)	jahoda	82,2 °C	80,63 °C
	malina	87,2 °C	85,51 °C
AGS6 a FT-MDP (program pro AGS6)	meruňka	78,8 °C	77,19 °C
	jablko	82,5 °C	80,74 °C
FT-MDP a AGS6 (program pro FT-MDP)	meruňka	78,8 °C	77,26 °C
	jablko	82,5 °C	80,78 °C

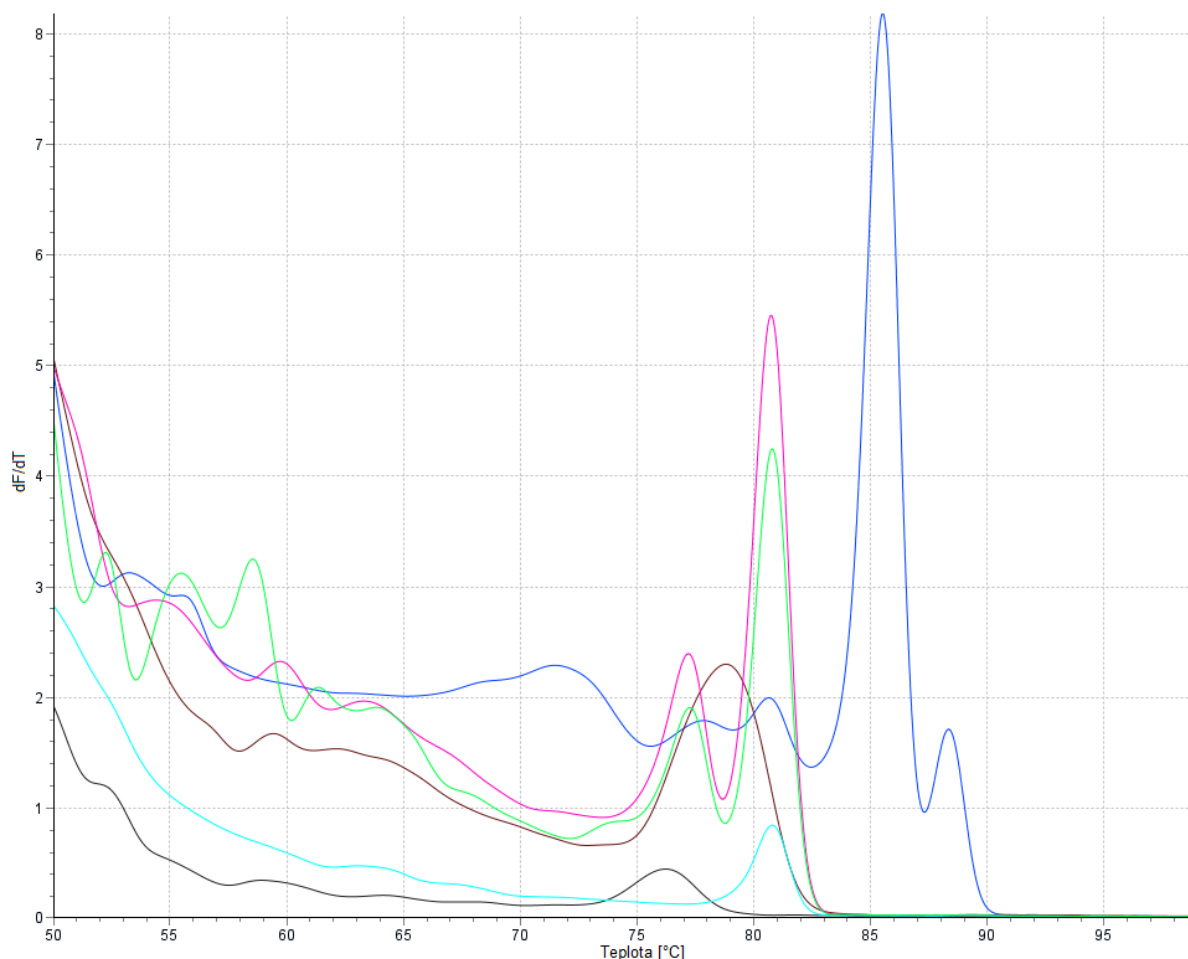
Na obrázku (Obrázek 65) jsou patrné křivky tání specifických produktů amplifikace zkušebních duplex PCR. Negativní kontroly byly v pořádku až na NK obsahující primery FT-MDP a AGS6 s teplotním profilem optimalizovaným pro jablkový primer FT-MDP. V negativní kontrole byl přítomen produkt s teplotou tání stejnou jako má odpovídající jablečná DNA. Z tohoto důvodu nebude s tímto programem nadále pracováno. Tohoto závěru lze dosáhnout i z porovnání křivek tání specifických produktů meruňkovo-jablečné DNA s použitím primerů AGS6 a FT-MDP. Křivky se navzájem kopírují a mají skoro totožné teploty tání specifických produktů, jen růžová křivka (program optim. pro primer AGS6) je vyšší a štíhlejší než zelená (program optim. pro primer FT-MDP). Tudíž se jeví jako vhodnější volba program optimalizovaný pro meruňkový primer.

U stejného vzorku s jahodovou a malinovou DNA lze identifikovat vrchol patřící specifickému amplikonu jahodové DNA oproti křivce tání s krokem 1 °C. Tento amplikon má maximum při 80,63 °C. Menší krok při stoupaní teploty také dokázal oddělit další vrchol, který má maximum při 88,27 °C. Což by mohlo být způsobeno malinovým primerem RiACO1, protože zvolený program nebyl pro tento primer optimalizovaný.

Pro další práci je zvolen program, který byl optimalizován pro jahodový primer APX1B a meruňkový primer AGS6. Teplotní profil tohoto programu je následovný:

Tabulka 26 – Vybraný teplotní profil pro multiplex PCR

krok	Program	podmínky	
		Teplota (°C)	Čas (s)
1.	úvodní denaturace	94	120
2.	Denaturace	94	30
3.	hybridizace primeru	60–55	45
4.	syntéza řetězce DNA	72	60
5.	závěrečná elongace	72	300



Obrázek 65 – Zkušební duplex PCR, primery AGS6 a FT-MDP (program optim. pro meruňku): NK – hnědá, vzorek – růžová; primery FT-MDP a AGS6 (program optim. pro jablko): NK – tyrkysová, vzorek – zelená; primery APX1B a RiACO1 (program optim. pro jahodu): NK – černá, vzorek – modrá



#### 4.3.13 Vysokorozlišovací analýza křivek tání pro modelové a komerční směsi

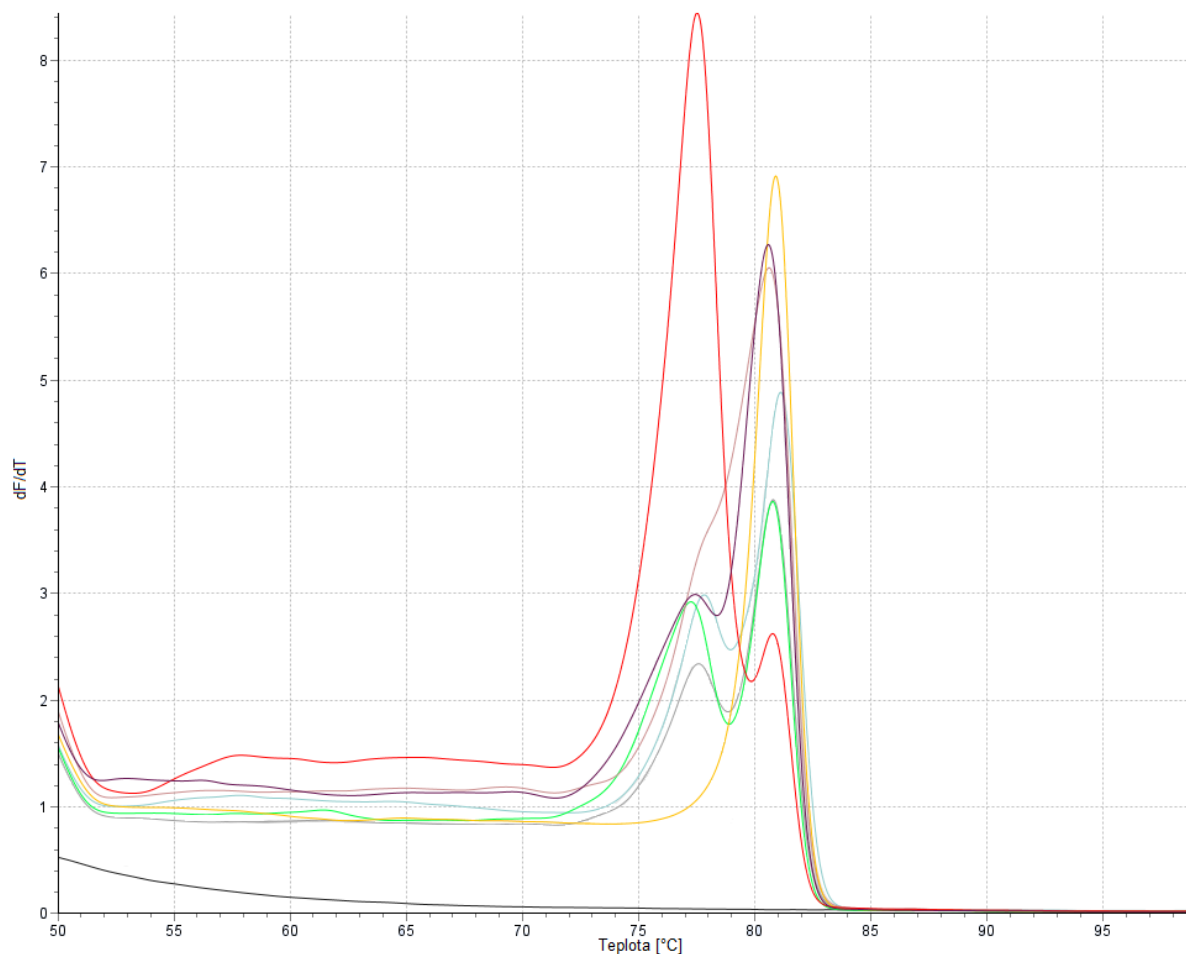
Na vysokorozlišovací analýzu křivek tání (HRM) byly dány modelové a komerční vzorky, u kterých nebylo možné rozlišit pík pro určité ovoce, nebo byly píky posunuty od předpokládané teploty tání. U analyzovaných vzorků byly většinou zastoupeny dvě a více ovocí. Pomocí programu LightCycler byla zjištěna přesná maxima analyzovaných křivek tání. Tyto hodnoty jsou uvedeny ve dvou tabulkách podle použité dvojice primerů (Tabulka 27 a Tabulka 28). Po HRM analýze s krokem 0,01 °C byly amplicony detekovány elektroforeticky.

Jako první jsou zobrazeny grafy pro modelové meruňkovo-jablečné směsi. Pokud vzorek obsahoval pouze meruňkovou DNA (100:0), byla teplota tání amplifikovaného fragmentu 77,51 °C a jeho délka okolo 290 bp. Jelikož daný vzorek neobsahoval jablečnou DNA, tak při analýze teplot tání v příslušné oblasti měl teplotu  $T_m$  nižší (79,47 °C), než kdyby jablečnou DNA obsahoval. Z naměřených dat lze formulovat hypotézu, že jestliže jablečnou DNA obsahoval, tak se bude teplota tání pohybovat od 77,25-77,82 °C. U křivky tání pro čistou meruňku se při menším teplotním kroku (po 0,01 °C) zobrazil pík, který odpovídal teplotě tání jablečné DNA. Stojí za zvážení, jestli je to chyba vzniklá jen u tohoto vzorku nebo primer AGS6 není zcela specifický a došlo k jeho navázání na DNA jablečka. Pokud by byla pravdivá druhá možnost, bylo by vhodné zvážit přidání pozitivní kontroly, aby se zamezilo pozitivně falešnému výsledku.

U vzorku 10:90, který byl složen z 90 % z jablečné DNA a z 10 % z meruňkové DNA, byla teplota tání podobná spíše jablečné DNA než té meruňkové. Díky gelové elektroforéze, ale byly zobrazeny dva bandy, které patřily jablečné i meruňkové DNA, proto nestačí pouze vysokorozlišovací analýza křivek tání, ale je nutná také analýza amplifikované DNA pomocí agarosové elektroforézy.

U vzorku, jenž obsahoval pouze čistou jablečnou DNA (0:100) byl naamplifikován specifický produkt, který měl teplotu tání 80,84 °C a délka fragmentu se pohybovala okolo 200 bp. Jelikož daný vzorek neobsahoval meruňkovou DNA, tak při analýze křivek tání v příslušné oblasti měl teplotu tání vyšší (78,08 °C), než kdyby meruňkovou DNA obsahoval.

Vzorek obsahuje jablečnou DNA, pokud se teplota tání specifického produktu pohybuje od 80,46 do 81,02 °C. Po elektroforéze se na agarosovém gelu objevil pouze jeden band pro jablečnou DNA.



Obrázek 66 – Vysokorozlišovací křivka tání pro modelové vzorky meruňkovo-jablečných pyrů s primery AGS6 a FT-MDP, NK – černá, 100:0 – červená, 50:50 – modrá, 40:60 – fialová, 30:70 – šedá, 20:80 – zelená, 10:90 – růžová, 0:100 – žlutá

U komerčního vzorku 1 byla pomocí HRM (80,99 °C) a elektroforézy potvrzena přítomnost jablečné DNA.

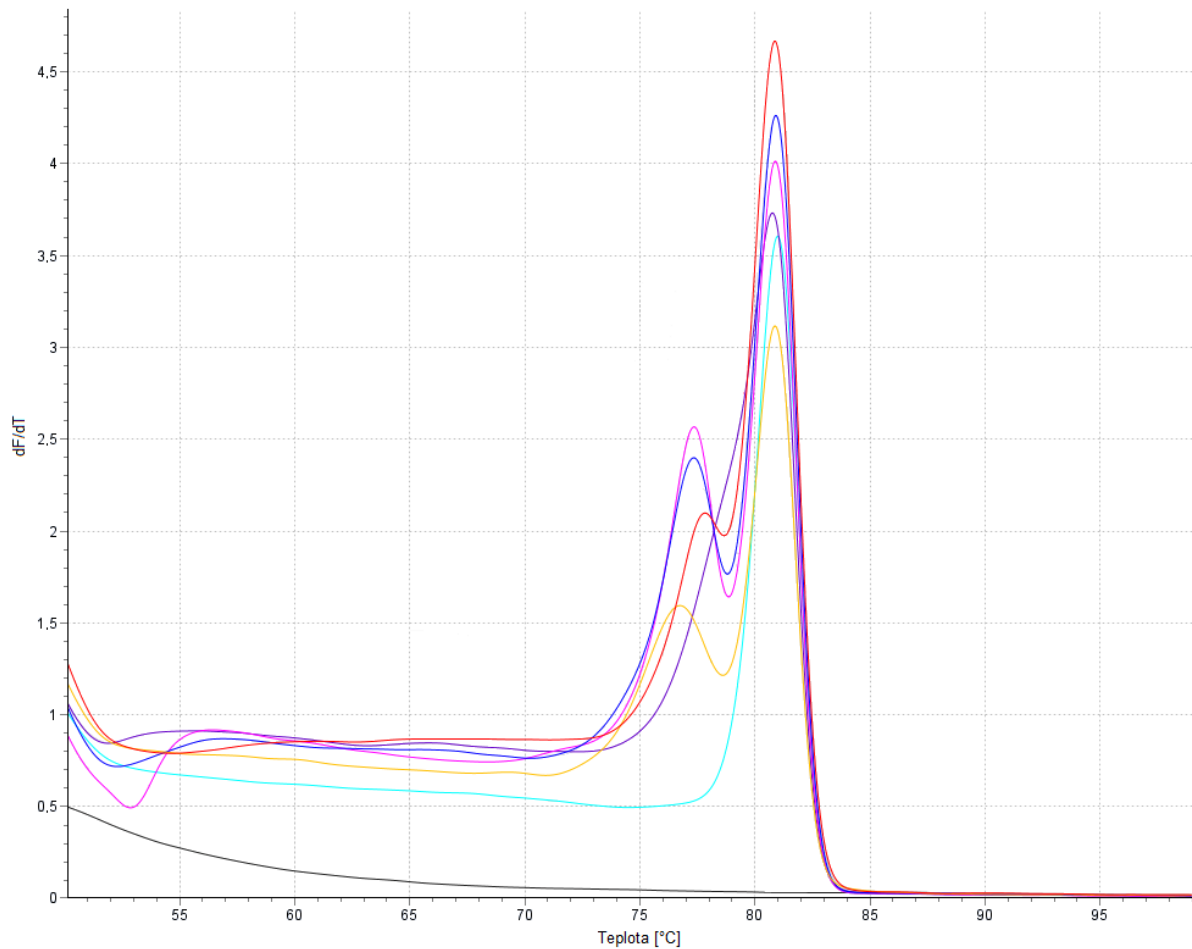
Ve vzorku 2 byla potvrzena přítomnost jablečné DNA, kdy teplota tání amplikonu jablečné DNA byla 80,76 °C a jeho velikost činila 193 bp.

U vzorku 3 byla rovněž potvrzena přítomnost jablečné DNA, kdy seděla teplota tání i délka fragmentu. U tohoto vzorku byl detekován amplikon, který měl teplotu tání (77,41 °C) i délku fragmentu (309 bp) odpovídající meruňkové DNA. Jelikož tento vzorek obsahoval mimo jiné i banánovou DNA, byl proveden test specifity duplex směsi s primery AGS6 a FT MDP, kde jako templát byla banánová DNA. K amplifikaci banánové DNA nedošlo.

Ve vzorku 4 byla potvrzena přítomnost jablečné DNA ( $T_m = 80,91$  °C, 193 bp) a podobně jako u předchozího vzorku 3 byl detekován specifický produkt, který odpovídá meruňkové DNA ( $T_m = 77,39$ , 306 bp).

Při analýze vzorku 5 byla potvrzena přítomnost jablečné DNA, přítomnost meruňkové DNA potvrzena nebyla. Křivka tání měla dva píky, první měl teplotu tání 76,74 °C. Tato teplota byla o něco nižší, než byla naměřená u modelových vzorků. Jednou z možností je, že na přípravu této výživy byla použita jiná odrůda meruňky, díky čemuž došlo k posunutí teploty tání. Jelikož pomocí gelové elektroforézy nebyl detekován specifický produkt znamená to, že buď nebyla meruňková DNA vůbec přítomna, nebo byla postupem výroby poničena, tudíž se neamplifikovala v dostatečném množství, aby byla detekovatelná na gelu.

U vzorku 6 byla potvrzena jableková i meruňková DNA, což odpovídá složení uvedenému na obalu výživy.

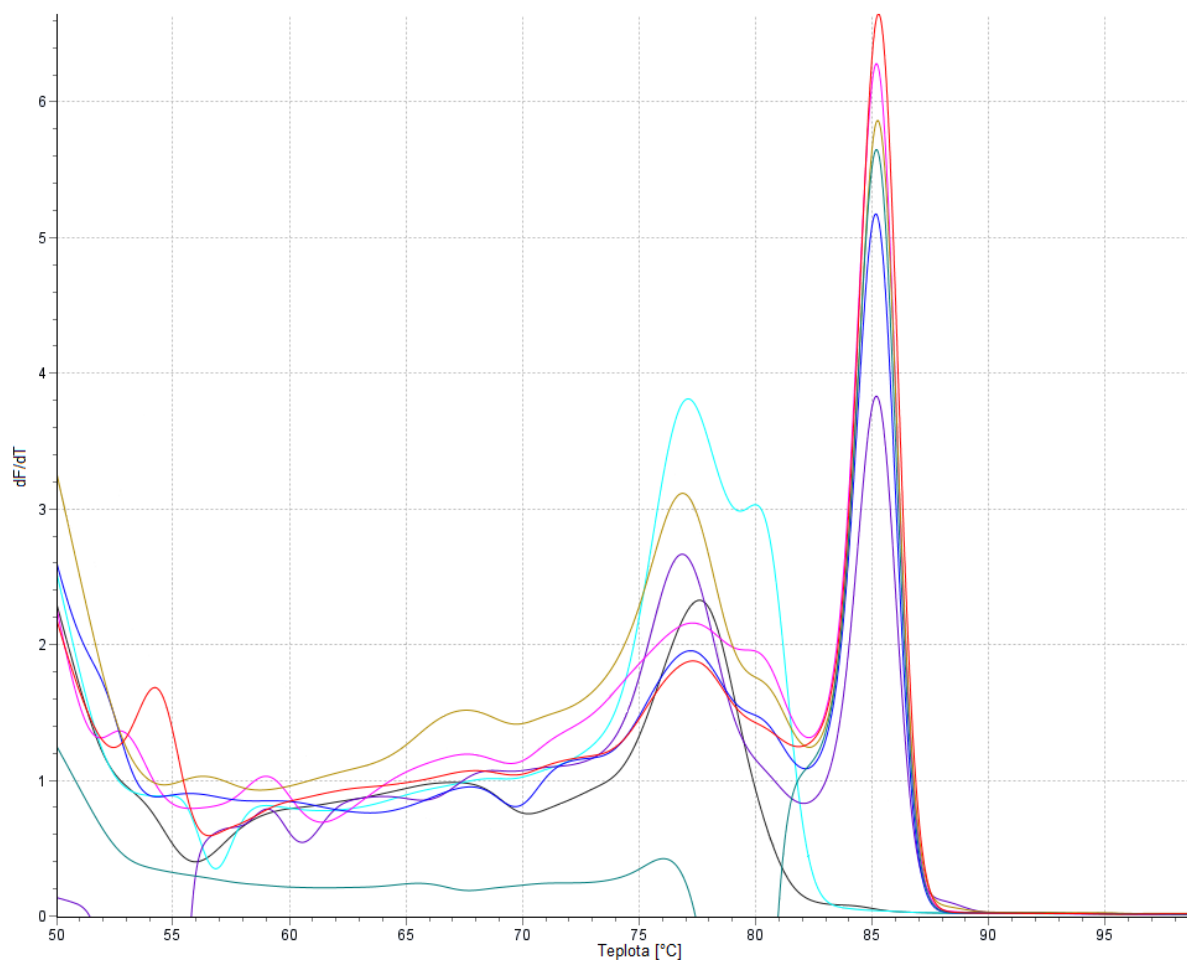


Obrázek 67 – Vysokorozlišovací křivka tání komerčních vzorků – primery AGS6 a FT-MDP, NK – černá; vzorek 1 (Hello, jablko + jahoda) – tyrkysová; vzorek 2 (Sunárek, jablko + jahoda) – fialová; vzorek 3 (HiPP, jablko + jahoda + banán + malina) – růžová; vzorek 4 (Hello, jablko + malina) – tm. modrá; vzorek 5 (Nestlé, jablko + meruňka) – žlutá; vzorek 6 (Cvrček, meruňka + jablko) – červená

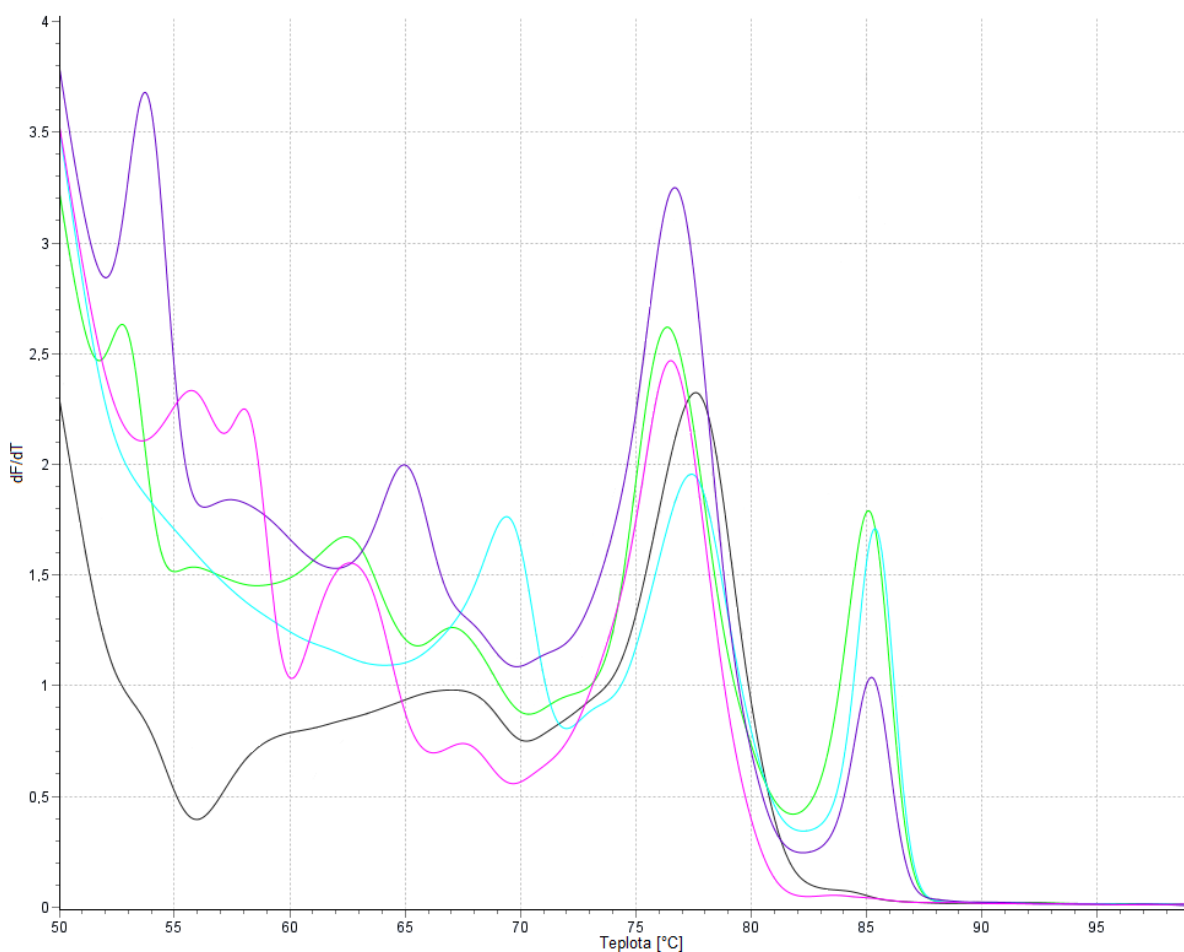
Tabulka 27 – Zjištěné hodnoty teplot tání a délek specifických produktů

		meruňková DNA		jablková DNA	
vzorky		délka DNA [bp]	teplota tání [°C]	délka DNA [bp]	teplota tání [°C]
meruňka : jablko	100:0	288	77,51	-	79,47
	50:50	296	77,82	195	81,02
	40:60	292	77,43	190	80,84
	30:70	300	77,58	204	80,71
	20:80	296	77,25	208	80,69
	10:90	308	78,08	208	80,46
	0:100	-	78,08	202	80,84
komerční směsi	1	-	78,08	193	80,99
	2	-	78,08	193	80,76
	3	(309)	77,41	202	80,89
	4	(306)	77,39	193	80,91
	5	-	76,74	197	80,87
	6	268	77,80	173	80,87

Výsledky vysokorozlišovací analýzy křivek tání pro jahodovo-malinové směsi a komerční vzorky obsahující jahodovou nebo malinovou DNA.



Obrázek 68 – Vysokorozlišovací křivka tání pro modelové vzorky jahodovo-malinových pyrů – primery APX1B a RiACO1, NK – černá, 100:0 – tyrkysová, 50:50 – fialová, 40:60 – růžová, 30:70 – modrá, 20:80 – okrová, 10:90 – šedo-modrá, 0:100 – červená



Obrázek 69 - Vysokorozlišovací křivka tání komerčních vzorků – primery APX1B a RiACO1, NK – černá; vzorek 1 (Hello, jablko + jahoda) – zelená; vzorek 2 (Sunárek, jablko + jahoda) – tyrkysová; vzorek 3 (HiPP, jablko + jahoda + banán + malina) – fialová; vzorek 4 (Hello, jablko + malina) – růžová

Pokud vzorek obsahoval pouze jahodovou DNA (100:0), teplota tání amplifikovaného fragmentu činila 80,47 °C a jeho délka měla okolo 562 bp. Jelikož tento vzorek neobsahoval malinovou DNA, při analýze teplot tání v příslušné oblasti měl danou hodnotu nižší (83,20 °C). V případě, že vzorek obsahuje jahodovou DNA, jeho teplota tání se bude pohybovat okolo 80,31-80,47 °C a délka fragmentu bude od 548-562 bp. U vzorku 10:90 došlo k chybě při měření HRM, kdy hodnoty od 77,5 °C začaly klesat do záporných hodnot. Proto by bylo vhodné tento vzorek znovu proměřit, případně ho vyřadit ze srovnávání.

U vzorek obsahujícího pouze čistou malinovou DNA (0:100) se zmnožil specifický produkt s teplotou tání 85,26 °C a délka fragmentu se pohybovala okolo 220 bp. V oblasti teploty tání jahodového amplikonu byla naměřena nižší teplota (79,12 °C), než má fragment malinové DNA. Vzorek obsahuje malinovou DNA, pokud se teplota tání specifického produktu pohybuje od 85,16 do 85,26 °C.

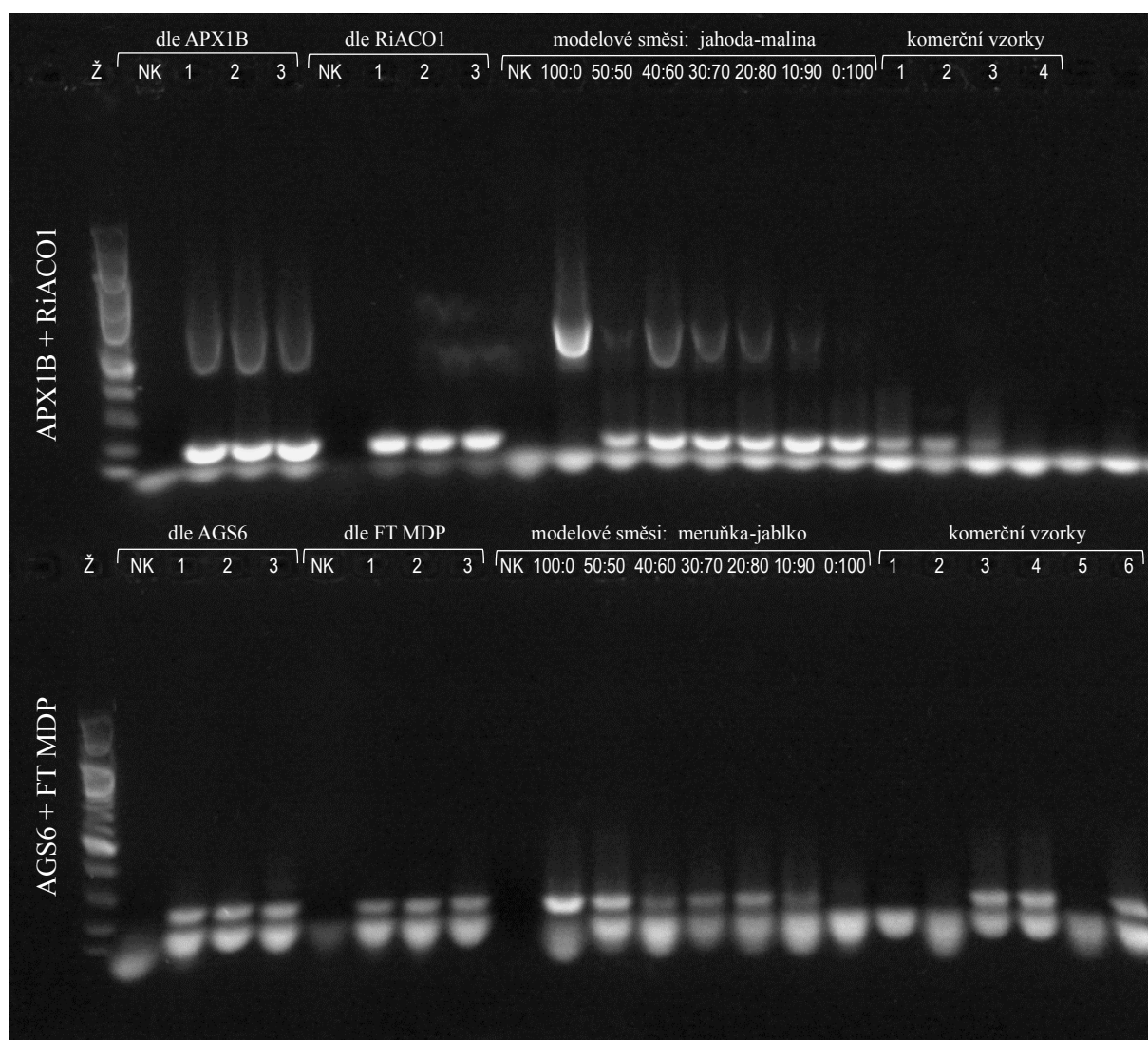
U všech třech vzorků (1, 2, 3), které měly obsahovat jahodovou DNA, odpovídala teplota tání negativní kontrole a rovněž vzorku 0:100, který obsahoval pouze malinovou DNA. Tato teplota tání nemusí znamenat, že vzorek neobsahoval jahodovou DNA, protože teplota tání byla naměřená i pro vzorek 50:50, u kterého byl detekovaný specifický produkt elektroforeticky.

U vzorku 1 byly detekovány pouze kratší PCR produkty o velikosti 224 bp, což svědčí buď o degradaci DNA nebo o přítomnosti malinové DNA i s ohledem na teplotu tání.

U vzorku 2 byly detekovány dva fragmenty DNA o velikosti 224 bp (vyšší intenzita fluorescence) a 311 bp (špatně detekovatelný). Kratší fragment by velikostí i teplotou tání odpovídal malinové DNA.

U vzorku 3 byla velmi slabě detekována světlá oblast okolo 592 bp, což by mohlo indikovat přítomnost jahodové DNA ve vzorku, dále byla detekována teplotou tání i přítomností fragmentu o velikosti 226 bp malinová DNA. U tohoto vzorku bylo potvrzeno složení uvedené na etiketě.

Vzorek 4 by měl podle složení obsahovat malinovou DNA, ale teplota tání byla nižší, než má specifický fragment malinové DNA a zároveň na gelu chyběl band odpovídající malinové DNA. Band, který byl detekován u tohoto vzorku, odpovídal bandu v negativní kontrole a měl délku fragmentu okolo 121 bp.



Obrázek 70 – Elektroforéza produktů multiplex PCR; vlevo: výběr vhodného teplotního profilu pro vybrané duplex PCR; od středu doprava: duplex PCR pro modelové a komerční vzorky

Tabulka 28 - Zjištěné hodnoty teplot tání a délek specifických produktů

		jahodová DNA		malinová DNA	
vzorky		délka DNA [bp]	teplota tání [°C]	délka DNA [bp]	teplota tání [°C]
meruňka : jablko	100:0	562	80,47	-	83,20
	50:50	557	79,12	229	85,17
	40:60	548	80,32	229	85,17
	30:70	557	80,31	229	85,16
	20:80	557	80,47	224	85,23
	10:90	557	81,08	219	85,17
	0:100	-	79,12	219	85,26
komerční	1	-	79,12	224	85,07
	2	-	79,12	224 (311)	85,36
	3	592	79,12	226	85,21
	4	-	79,12	-	83,55

Jelikož při zkoušce specificity primeru APX1B vznikl specifický produkt reakcí s malinovou DNA, který měl vysokou teplotu tání (90,3 °C) a podobnou délku jako malinový fragment, tak bylo zkontrolováno, jestli na křivce tání nebyl detekován pík při této teplotě. Ale u žádného vzorku při této teplotě nedošlo ke vzniku píku.

U komerčních vzorků byla celkově nižší účinnost amplifikace a některé vzorky nebyly detekovány ani na agarosovém gelu. Vzhledem k tomu, že komerční výživy nemusí obsahovat pouze ovocnou složku, ale mohou být k ní přidány další látky, plyne z toho, že výživy naředěné např. vodou, obsahují nižší množství DNA v homogenátu.

Dalším důvodem může být degradace DNA, k níž mohlo dojít při dozrávání, zpracování ovoce (tepelná úprava) nebo při výrobě a skladování výživy. Degradace DNA mohla být způsobena i v průběhu samotné izolace.

Dalším důvodem může být přítomnost inhibičních faktorů. Všechny analyzované výživy obsahovaly jablečné pyré, které je bohaté na polysacharidy, které mohou inhibovat PCR reakci.

#### 4.3.14 Analýza modelových směsí a komerčních vzorků pomocí instrumentálních technik

##### 4.3.14.1 Stanovení obsahu sušiny

Připravené modelové směsi a komerční vzorky byly charakterizované z hlediska množství sušiny, obsahu celkových fenolických látek a flavonoidů. Modelové směsi byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 4.2.1.

Jak je patrné z následující tabulky (Tabulka 29), nejvíce vody bylo v jahodách (96,5 %), poté v meruňkách (96,1 %), v jablečích (92,6 %) a nakonec v malinách (91,3 %). Tyto hodnoty jsou ovlivněny použitým ovocem, tedy jeho zralostí, odkud pocházelo a podobně. Obsah vody v jablečném pyré je ovlivněn odstraněním slupky před samotnou přípravou pyré. To znamená, že by mělo obsahovat vyšší podíl vody, než kdyby v pyré byla přítomna slupka.

U meruňkovo-jablečných směsí lze pozorovat určitá závislost obsahu vody v modelových směsích na podílu ovoce. U jahodovo-malinových vzorků je patrná výchylka obsahu vody u vzorku s poměrem 30:70 od ostatních hodnot, což mohlo být způsobeno přípravou modelových směsí. Jelikož připravená pyré nebyla pasírována, u malinového a jahodového pyré byly přítomny drobné pecičky, které mohly způsobit tuto nepřesnost. Tím je myšleno, že zásobní pyré nebyla zcela homogenní a mohly být nabrány zrovna malinové pecičky.

Pro získání ideálních podmínek pro analýzu vzorků, je vhodné ovocné pyré přepasírovat a až poté připravit modelové směsi. Chyba by se dala eliminovat také přípravou duplikátů či triplikátů modelových směsí.

Tabulka 29 - Obsah sušiny v modelových a komerčních vzorcích

modelové směsi	obsah sušiny mg/1 g pyré	procento sušiny [%]	
meruňka : jablko	0:100	73,9	7,4
	10:90	72,9	7,3
	20:80	71,1	7,1
	30:70	69,2	6,9
	40:60	68,6	6,9
	50:50	59,3	5,9
	100:0	39,0	3,9
jahoda : malina	0:100	86,8	8,7
	10:90	65,9	6,6
	20:80	58,8	5,9
	30:70	64,9	6,5
	40:60	56,6	5,7
	50:50	56,4	5,6
	100:0	34,7	3,5
komerční směsi	1.	55,5	5,5
	2.	58,7	5,9
	3.	41,0	4,1
	4.	53,6	5,4
	5.	42,5	4,3
	6.	51,7	5,2

#### 4.3.14.2 Analýza celkových fenolických látek

Obsah celkových fenolických látek v připravených modelových a komerčních směsích byl stanoven spektrofotometricky, podle postupu uvedeného v kapitole 4.2.18.2. Pomocí kalibrační křivky standardu kyseliny gallové (viz Příloha 1) byla vypočítána koncentrace celkových fenolických látek ve vzorcích. Pro výpočet koncentrace fenolických látek byly naměřené hodnoty absorbance dosazeny do rovnice (4.1).

Vzorky byly proměřeny v tripletech a z naměřených hodnot byla vypočítána průměrná hodnota a směrodatná odchylka. Naměřené výsledky celkových fenolických látek v modelových směsích jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 30) a znázorněny ve dvou grafech (Obrázek 71 a Obrázek 72). Hodnoty celkových fenolických látek v komerčních vzorcích jsou vyneseny ve stejných grafech podle obsahované ovocné složky, aby byla totožná jako v modelových směsích.

$$A = 1,5996 \cdot c \quad (4.1)$$

Pomocí internetové databáze Phenol-Explorer a článků byly zjištěny koncentrace celkových fenolických látek (v mg na 100 g čerstvé váhy) surovin nacházejících se v našich šesti komerčních výživách. Tyto hodnoty byly také stanoveny Folin-Ciocalteovy metodou a pro lepší srovnání jsou uvedeny ve stejných jednotkách. Jelikož jsou tyto hodnoty závislé na použité odrůdě i na podmínkách pěstování, tak kromě průměrné hodnoty jsou uvedeny také intervaly.



Tabulka 30 – Celkové fenolické látky zjištěné z článků

Plodina	Celkové fenolické látky [mg na 100 g FW]			zdroj
	střední hodnota	min.	max.	
jablka se slupkou	200,96	66,20	430,00	[77]
jablka bez slupky	131,80	15,86	690,00	[77]
meruňky	133,00	133,00	133,00	[77]
maliny	154,65	57,51	517,00	[77]
jahody	289,20	72,50	443,40	[77]
banán	154,70	11,80	231,00	[77]
mrkev	57,82	8,21	156,00	[77]
granátové jablko (šťáva)	121,82	78,44	155,15	[78]

Vypočítané koncentrace celkových fenolických (TPC) látek pro modelové a komerční směsi jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 31). Koncentrace celkových fenolických látek pro čistá 100% jednosložková ovocná pyré se pohybovala od 2,23 mg GAE na 100 g mokré hmoty (WM) pro čisté jablko bez slupky, což je nižší hodnota než hodnota zjištěná z publikací. To může být způsobeno dlouhodobým uchováním jablka v mrazáku a jeho degradací. Pro čistou meruňku byla hodnota TPC 11,02 mg GAE na 100 g WM, tato hodnota je nižší než hodnota uvedená v publikaci, což může být způsobeno tím, že byl použit jiný postup nebo nebylo použito žádné extrakční činidlo. Pro jahodu vyšla koncentrace TPC na 99,25 mg GAE na 100 g WM, což odpovídá intervalu pro jahodu. Pro čistou malinu byla koncentrace vypočítána na 118,40 mg GAE na 100 g, což také odpovídá intervalu z publikací.

U komerčních směsí se pohybovala koncentrace celkových fenolických látek 11,52-83,97 mg GAE na 100 g WM.

Tabulka 31 - Vypočítaný obsah celkových fenolických látek

modelové směsi		celkové fenolické látky [mg GAE / 100 g mokré váhy]	celkové fenolické látky [mg GAE / 100 g suché váhy]
meruňka : jablko	0:100	2,23 ± 0,05	7,61 ± 0,16
	10:90	2,32 ± 0,10	7,95 ± 0,33
	20:80	4,48 ± 0,03	15,66 ± 0,12
	30:70	3,12 ± 0,05	11,27 ± 0,20
	40:60	6,66 ± 0,12	24,29 ± 0,42
	50:50	7,82 ± 0,50	32,92 ± 2,09
	100:0	11,02 ± 0,10	70,56 ± 0,61
jahoda : malina	0:100	118,40 ± 0,00	334,56 ± 0,00
	10:90	113,82 ± 0,93	430,95 ± 3,51
	20:80	111,61 ± 1,74	462,65 ± 6,03
	30:70	95,96 ± 0,14	369,91 ± 1,59
	40:60	104,73 ± 0,16	459,32 ± 0,69
	50:50	101,47 ± 0,31	450,60 ± 1,38
	100:0	99,25 ± 2,53	718,47 ± 0,00
komerční směsi	1	22,09 ± 0,14	98,22 ± 0,62
	2	67,88 ± 0,40	288,99 ± 1,71
	3	83,97 ± 2,18	515,48 ± 13,41
	4	12,79 ± 0,49	60,71 ± 2,32
	5	57,57 ± 0,63	334,73 ± 3,65
	6	11,52 ± 0,05	55,59 ± 0,24

U meruňkovo-jablečných modelových směsí lze pozorovat vzestupnou tendenci obsažených fenolických látek od čistého jablka k meruňce, ať už je hodnota TPC vztažena na mokrou nebo suchou váhu. Vzorek 20:80 má vyšší TPC, a to 4,48 mg GAE/100 g WM, než byla předpokládaná hodnota. Pravděpodobně došlo k chybě při navažování této modelové směsi. Jelikož byl připraven pouze jeden vzorek, který byl dále analyzován, bylo by vhodné tuto směs znovu namíchat nebo s touto směsí dále nepracovat.

U jahodovo-malinových modelových směsí lze pozorovat vyšší množství fenolických látek u vzorků, kde je zastoupeno větší množství malinového pyré než jahodového. Pokud množství fenolických látek vztáhneme k sušině, tak jahodové pyré obsahuje více fenolických látek. To je způsobeno vyšším obsahem vody v jahodách než v malinách. Odchýlená hodnota celkových fenolických látek je také u modelové směsi s poměrem 30:70, která je nižší než předchozí hodnota vztažená na pyré.

Pro lepší porovnání komerčních vzorků s modelovými směsmi byly vytvořeny grafy, kde jsou zobrazeny modelové směsi a komerční směsi obsahující stejné ovoce. V grafu (Obrázek 71) jsou zobrazeny modelové směsi meruňka : jablko a komerční vzorky obsahující jablko (1-6) a meruňku (5-6). Na grafu (Obrázek 72) můžeme vidět modelové jahodovo-malinové směsi a komerční vzorky obsahující jahodu (1-3) a malinu (3-4).

Všechny analyzované komerční vzorky obsahovaly určitý podíl jablka, proto je očekávána nižší koncentrace celkových fenolických látek než u jahodovo-malinových směsí. Komerční vzorky můžeme rozdělit na 100% ovocná pyré a ovocná pyré s aditivy. U vzorků 1, 3 a 6 byla vypočítána hodnota TPC do 50 mg GAE na 100 g mokré váhy, což odpovídá i nižšímu zastoupení ovoce (60-85 %). Vzorky 2, 3 a 5 by měly být podle složení uvedeného na obalu stoprocentní. Porovnáním komerčních dětských výživ s hodnotami u jednodruhových modelových směsí lze přibližně odhadnout správnost výsledků. Tyto hodnoty slouží pouze orientačně. Variabilita hodnot může být způsobena jiným postupem při přípravě směsí, či použitím jiné odrůdy. Důležitý je fakt, že připravené směsi neměly stejné složení, co se týče použitého ovoce či dalších aditiv.

Některé komerční vzorky obsahovaly navíc barvicí ovocné a rostlinné extrakty, např. koncentrát z karotky nebo z granátového jablka, což mohlo ovlivnit naměřené hodnoty. V tabulce (Tabulka 30) jsou uvedeny hodnoty TPC pro tato aditiva.

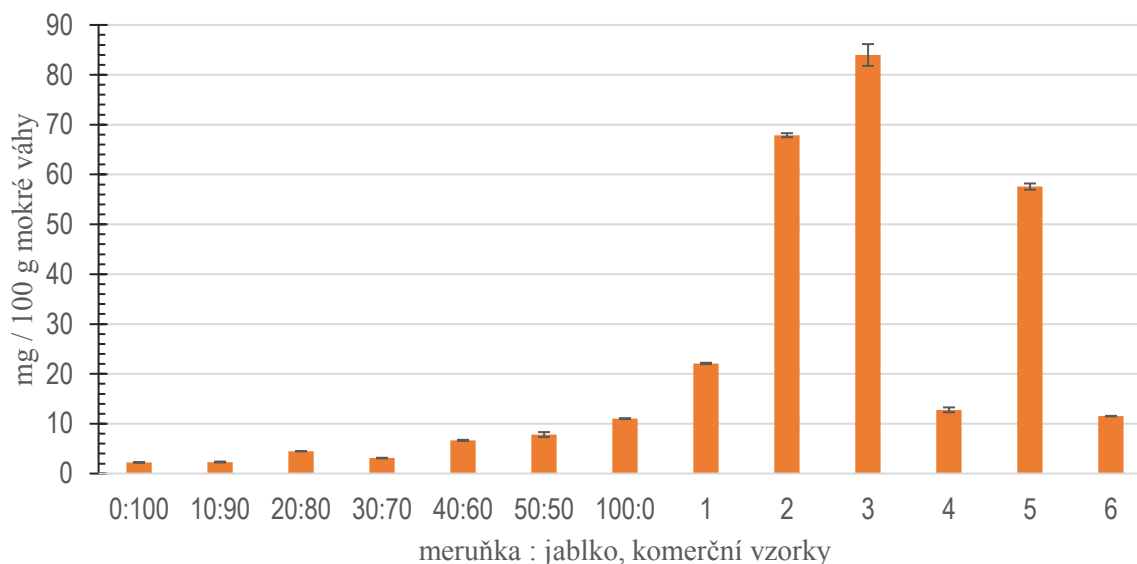
Skoro všechny vzorky kromě vzorku 3 obsahovaly kyselinu askorbovou, která je redukčním činidlem, jenž zabraňuje enzymatickému zhnědnutí čerstvě nakrájeného ovoce a také oxidaci produktu během skladování. Rovněž zabraňuje poklesu obsahu fenolických látek v ovoci a zelenině, kdy dokáže přeměnit chinony zpět na polyfenoly. Přítomnost redukujících interferentů (např. kyseliny askorbové) při stanovení TPC v potravinách rostlinného původu vede k nepřesným odhadům hodnot TPC [79], [80].

Vzorek 1 by měl obsahovat 65 % jablka a 20 % jahody, hodnota TPC přibližně odpovídá modelovým směsím při výpočtu koncentrace pomocí naměřených hodnot u čistého ovoce. Nejnižší hodnota TPC byla naměřena u vzorku 6, který obsahoval 60 % ovocné složky. Tento vzorek měl velmi podobnou hodnotu TPC čistému meruňkovému pyré. Pokud byla použita např. jiná odrůda meruňky, tak je tato hodnota reálná.

Nejvyšší hodnota TPC byla naměřena u vzorku 3, který obsahoval kromě jablek, i jahody, banán a maliny, což pravděpodobně způsobilo vyšší hodnoty TPC.

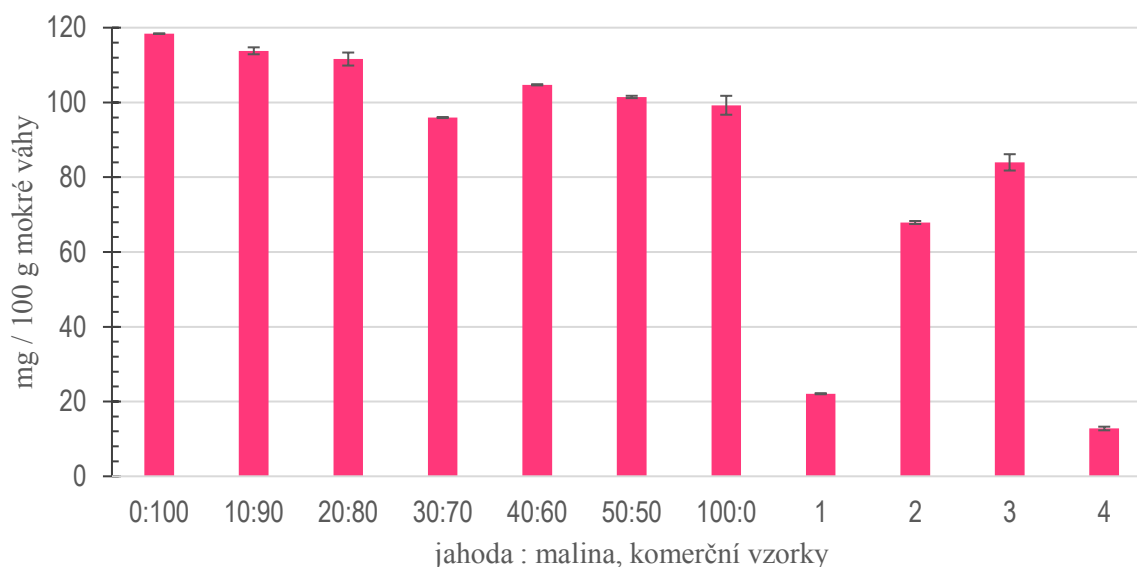
Vzorek 4 měl nižší hodnotu celkových fenolických látek než vzorek 1, který by měl obsahovat stejný podíl ovocné složky (85 %). Jelikož obsahoval více jablečného pyré o 10 % než vzorek 1 a potom 10 % malinové dřevě. U malinového pyré byla stanovená nižší hodnota TPC na 100 g WM než pro jahodové pyré, a proto by měl mít vzorek 2 nižší hodnotu TPC.

Jediný vzorek 5 měl mít podle složení uvedeného na obalu produktu totožné složení jako meruňkovo-jablková modelová směs s poměrem 30:70. U této komerční směsi byla hodnota vypočítána na 57,57 mg GAE na 100 g WM, což je řádově vyšší koncentrace celkových fenolických látek než u modelové směsi s hodnotou 3,12 mg GAE na 100 g WM. Rozdíly hodnot mohly nastat kvůli použití jiné odrůdy jablek nebo meruňky ale také přítomným vitamínem C (viz výše).



Obrázek 71 - Celkové fenolické látky pro modelové směsi meruňka : jablko a komerční směsi

Z grafu (Obrázek 72) je patrné, že u komerčních vzorků bylo minoritně zastoupeno jahodové nebo malinové pyré. Vzorky 1 a 2 by měly obsahovat stejné procentuální zastoupení jahody a to 20 %, ale jejich hodnoty TPC se lišily, což mohlo být způsobeno větším množstvím jablečného pyré ve vzorku 2. Vzorek 4 obsahoval 10 % malinové dřeně a měl z těchto čtyř komerčních vzorků nejnižší hodnotu TPC.



Obrázek 72 - Celkové fenolické látky pro modelové směsi jahoda : malina a komerční směsi

#### 4.3.14.3 Analýza celkových flavonoidů

Obsah celkových flavonoidů v modelových a komerčních vzorcích byl taktéž zjištěn pomocí spektrofotometrické metody, jejíž postup je uveden v kapitole 4.2.18.3. Koncentrace celkových flavonoidů byla vypočítána pomocí kalibrační křivky standardu katechinu (viz Příloha 2). Naměřené hodnoty absorbance byly vloženy do rovnice (4.2). Každý vzorek byl analyzovaný ve třech opakováních a z naměřených hodnot byla vypočítána průměrná hodnota a odchylka.

$$A = 3,1648 \cdot c \quad (4.2)$$

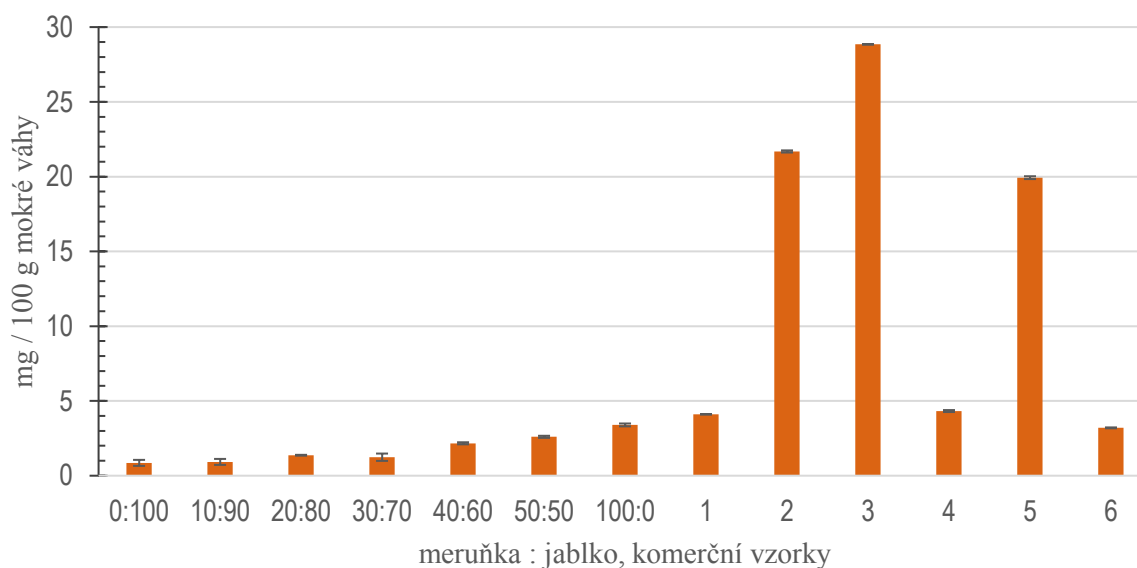
Naměřené hodnoty celkových flavonoidů byly přepočítány na mg ekvivalentu katechinu na 100 g mokré váhy (pyré) a ty jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 32).

U čistých ovocných pyré byla nejnižší hodnota celkových flavonoidů (TFC) stanovena pro jablečné pyré a to na 0,86 mg CE na 100 g WM, u meruňkového pyré byla vypočítaná hodnota o málo vyšší – 3,40 mg CE/100 g WM. U jahodového pyré a malinového pyré byly hodnoty celkových flavonoidů na 100 g mokré váhy stanoveny na 19,26 mg u jahody a 21,56 mg CE u maliny. Jelikož flavonoidy patří do fenolických látek, lze u hodnot flavonoidů pozorovat stejné tendence, které byly popsány v předchozí kapitole u stanovení TPC.

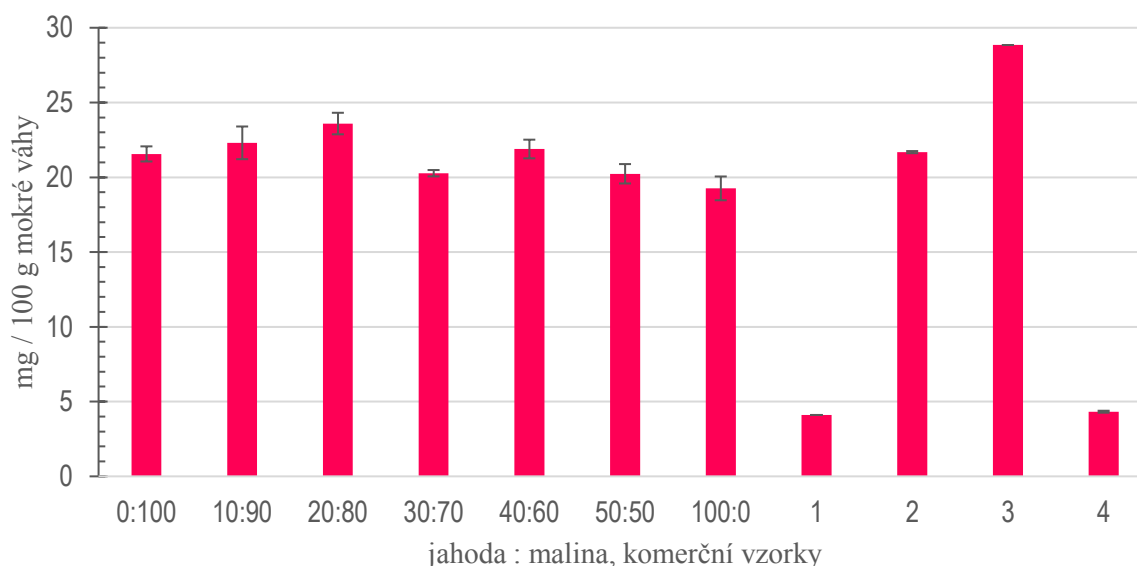
Z komerčních vzorků byla nejnižší hodnota TFC u vzorku 6 a nejvyšší u vzorku 3, u kterého byla dokonce naměřena vyšší hodnota než u čistého malinového pyré.

Tabulka 32 – Vypočítaný obsah celkových flavonoidů

modelové směsi		celkové flavonoidy [mg CE / 100 g mokré váhy]	celkové flavonoidy [mg CE / 100 g suché váhy]
meruňka : jablko	0:100	0,86 ± 0,20	2,92 ± 0,68
	10:90	0,92 ± 0,20	3,16 ± 0,69
	20:80	1,37 ± 0,03	4,78 ± 0,09
	30:70	1,23 ± 0,25	4,46 ± 0,89
	40:60	2,17 ± 0,07	7,90 ± 0,26
	50:50	2,60 ± 0,07	10,94 ± 0,29
	100:0	3,40 ± 0,10	21,74 ± 0,62
jahoda : malina	0:100	21,56 ± 0,50	60,93 ± 1,43
	10:90	22,30 ± 1,09	84,45 ± 4,14
	20:80	23,59 ± 0,72	99,81 ± 3,05
	30:70	20,27 ± 0,21	78,33 ± 0,82
	40:60	21,89 ± 0,63	96,01 ± 2,74
	50:50	20,23 ± 0,65	89,85 ± 2,88
	100:0	19,26 ± 0,79	137,76 ± 5,68
komerční směsi	1	4,10 ± 0,00	18,25 ± 0,00
	2	21,68 ± 0,07	92,31 ± 0,30
	3	28,85 ± 0,00	177,08 ± 0,00
	4	4,32 ± 0,06	20,53 ± 0,31
	5	19,93 ± 0,10	115,88 ± 0,55
	6	3,20 ± 0,03	15,43 ± 0,14



Obrázek 73 - Celkové flavonoidy pro modelové směsi meruňka : jablko a komerční směsi



Obrázek 74 - Celkové flavonoidy pro modelové směsi jahoda : malina a komerční směsi

#### 4.3.14.4 Stanovení fenolických látek pomocí vysokorozlišovací kapalinové chromatografie

Fenolické látky byly stanoveny metodou HPLC podle postupu uvedeného v kapitole 4.2.19. Kvalitativní analýza byla provedena na základě porovnání retenčních časů z methanolových extraktů modelových směsí a komerčních směsí s retenčními časy standardů fenolických látek.

Odečtená plocha pod píkem byla dosazena do rovnic kalibračních křivek uvedených v následující tabulce (Tabulka 33). Písmenem x je označena koncentrace v mg na ml. Grafy kalibračních křivek individuálních standardů naleznete v sekci přílohy.

Příklad chromatogramu komerční výživy 2 (Sunárek, jablko + jahoda) můžete vidět v příloze (Příloha 10Příloha 10Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.).

Postup přípravy methanolových extraktů z lyofilizované ovocné šťávy se nezdál jako nejšťastnější zvolený způsob přípravy. Jelikož ovocné vzorky (šťávy) obsahují vyšší koncentraci

polysacharidů, které nebylo možné zcela rozpustit v n-hexanu a vznikla v něm nerozpustná hmota karamelové konzistence. Poté po přidání methanolu už šlo vidět, že fenolické látky přešly z hexanu do methanolu, protože se u malino-jahodových vzorků zbarvil do červena a u meruňkovo-jablečných do žluta.

Některé komerční vzorky obsahovaly kromě ovocného podílu také vitamin C a rostlinná barviva jako např. extrakt z mrkve nebo granátového jablka. Tato aditiva pravděpodobně mohou ovlivnit složení fenolických látek ve vzorcích.

Markerem pro jablko by měl být floridzin. Neloupaná jablka jsou bohatším zdrojem floridzinu než loupaná, protože obsah floridzinu v jablečné slupce se pohybuje od 12–418 mg na kg, zatímco v jablečné dužině od 4–20 mg na kg. Staré odrůdy jablek navíc obsahují větší množství floridzinu než novější [81].

Tabulka 33 – Rovnice kalibračních křivek standardů fenolických látek

Standard	Rovnice kalibrační křivky
kyselina gallová	$y = 5315,7 \cdot x$
floridzin	$y = 3\,605,7 \cdot x$
kvercetin-3-glukosid	$y = 19\,347 \cdot x$
kyselina kumarová	$y = 4\,962,2 \cdot x$
pelargonidin-3-glukosid	$y = 6\,535 \cdot x$
resveratrol	$y = 3\,036,8 \cdot x$

Jedním způsobem vyhodnocení je porovnání obsahu vybraných fenolických látek v komerčních vzorcích s detekovanými fenolickými látkami v jednodruhových modelových směsích.

Komerční vzorky, jahodový a malinový vzorek musely být naředěny dvakrát, aby mohly být analyzovány, zatímco vzorky pro meruňku a jablko nemusely být vůbec ředěny.

Kvantitativní analýza byla provedena jen pro šest vybraných fenolických látek, které by pomohly určit použité ovoce.

U chromatogramu pro jahodové pyré byl nejvíce výrazným píkem pelargonidin-3-glukosid (5,71 mg na 100 g WM), kyselina gallová (3,22), quercetin-3-glukosid a kyselina chlorogenová byla zastoupena také. I když byl floridzin přítomen, tak se jednalo o malinký pík ve srovnání s ostatními fenolickými látkami.

Z chromatogramu pro vzorek malinového pyré nebylo možné jednoznačně kvantifikovat kyselinu gallovou (reálná hodnota se může mírně lišit), protože byla spojena v jeden pík s dalšími sloučeninami. U maliny byl detekován hesperidin, pelargonidin-3-glukosid, kyselina vanilová, kvercetin-3-glukosid. Floridzin byl také zastoupen ve velmi malém množství.

U chromatogramu pro čisté jablečné pyré byla detekována kyselina gallová. Fenolické látky jako jsou kyselina kávová, hesperidin a floridzin byly ve srovnání s píkem kyseliny gallové výraznější. Ve srovnání s předchozími vzorky měl pelargonidin-3-glukosid malý pík, který při kvantifikaci vyšel nulový.

V našem případě byla k výrobě jablečného pyré s velkou pravděpodobností použita jiná odrůda (jona prince), než byla přítomna v komerčních vzorcích. Nižší hodnota floridzinu (0,03 mg na 100 g WM) mohla být ovlivněna i tím, že před přípravou pyré bylo jablko oloupano a zbaveno jadřince.

Některé z vybraných fenolických látek nebyly vůbec detekovány ani v modelových nebo komerčních vzorcích. Jednalo se o aloenin, daidzein, genistein a apigenin.

Podle etikety měl komerční vzorek 1 obsahovat 65 % jablečné dřeně a 20 % jahodové dřeně, zbylých 18 % připadlo na vodu, cukr, škrob, extrakty (koncentrát z karotky a granátového jablka) a vitamin C. Tento vzorek obsahoval 0,36 mg floridzinu na 100 g WM., což by potvrdzovalo přítomnost jablečného pyré ve vzorku, pravděpodobně jiné odrůdy. Na 100 g mokré váhy byl obsah pelargonidinu-3-glukosidu 0,02 mg a kvercetinu-3-glukosidu 0,01 mg docela nízký oproti naší čisté jahodě. Pokud vezmeme v potaz, že by ve vzorku mělo být jahodové pyré zastoupeno jen ve 20 % (obsah pelargonidinu-3-glukosidu se u modelových vzorků snižoval se snižující se koncentrací jahodové DNA) a jablečného pyré v malé míře nebo vůbec neovlivní obsah pelargonidinu-3-glukosidu, tak naměřená koncentrace je velmi nízká. To může být způsobeno použitím jiné odrůdy jahody, degradací komerčního vzorku nebo menším množstvím jahody, než je uváděno na obalu. Vypadá, že vzorek obsahuje jablečného pyré i jahodové. Pravděpodobně jahodové pyré je obsaženo v menší míře, než je uváděno na obalu.

Komerční vzorek 2 by měl obsahovat 80 % jablečného pyré, 20 % jahodového pyré a koncentrát citronové šťávy a vitamin C. Množství jahodového pyré by mělo být totožné jako u vzorku 1, ale hodnoty má vyšší pro všechny analyzované látky, ale přesto nedostatečné, pokud bychom je vztahovali na námi naměřené hodnoty pro čistou jahodu. Znovu mohlo dojít k degradaci produktu či použití jiné odrůdy jahody, či menšího množství jahodového pyré. Obsah floridzinu byl stanoven na 3,16 mg na 100 g WM, což je o hodně vyšší hodnota než u naší čisté jablečného pyré. Je možné, že při přípravě výživy použily jinou odrůdu jablek nebo použily jablka i se slupkami. Zvláštní je vyšší obsah resveratrolu, a to 0,22 mg na 100 g WM, který mohl být přítomný z koncentrátu citronové šťávy nebo i z jahod. Z toho plyne, že vzorek obsahoval pravděpodobně obě pyré deklarovaná na obalu, jestli ale uváděná procenta odpovídají je sporné [82].

Vzorek 3 by měl obsahovat dle složení uvedeného na obalu: 77 % jablka, 10 % jahody, banán, 4 % maliny a mrkvovou šťávu z koncentrátu. Vzorek obsahuje 0,82 mg floridzinu na 100 g WM, z čeho lze usuzovat, že bylo použito jablečného pyré. Jelikož se jedná o čtyři druhy ovoce, tak pro zjednodušení se budeme dívat na vzorek tak, že obsahuje pouze 3 druhy ovoce a fenolické látky v banánu budeme zanedbávat, protože pro toto ovoce nejsou naměřená data. Orientačně pokud bychom vypočítali obsah pelargonidinu-3-glukosidu ve vzorku obsahující 10 % jahodového pyré a 4 % malinového pyré a zředili ho pouze methanolem, tak by výpočetně jeho koncentrace byla 0,59 mg na 100 g. Naměřená hodnota pelargonidinu-3-glukosidu (0,07 mg) je nižší než byla tímto způsobem vypočítaná hodnota. Kvercetin-3-glukosid nebyl vůbec detekován u tohoto vzorku, takže pravděpodobně použily ovoce s menším množstvím těchto fenolických látek než byla ovoce použitá na přípravu modelových směsí. Nebo byly fenolické látky degradovány. Tento vzorek pravděpodobně obsahuje jablečnou DNA a jahodovou a malinovou DNA by také mohl obsahovat.

Vzorek 4 by měl obsahovat podle obalu 75 % jablečné dřeně, 10 % malinové, vodu, cukr, škrob, extrakty (koncentrát z karotky a granátového jablka) a vitamin C. U tohoto vzorku bylo 2,82 mg floridzinu, což by mělo detekovat přítomnost jablečného pyré. U čisté malinové a jablečného pyré nebyla detekována kyselina kumarová, která ale byla detekována u tohoto vzorku v koncentraci 0,03 mg na 100 g WM. Kvercetin-3-glukosid by pravděpodobně měl být přítomen v tak malé koncentraci, že by měl být problém ho detekovat, což odpovídá. Pokud se zaměříme na pelargonidin-3-glukosid, tak ho bylo ve vzorku 0,31 mg na 100 g WM, což je o něco málo nižší hodnota než byla vypočítána z modelového malinového pyré 0,57 mg na 100 g WM. Z těchto hodnot lze usuzovat, že je překvapivý vysoký obsah kyseliny gallové a přítomnost kyseliny kumarové, ale jinak se dá říct, že vzorek pravděpodobně obsahuje jablečného i malinové pyré, kdy malinové pyré bylo pravděpodobně degradováno při výrobě nebo byla použita jiná odrůda maliny.

Vzorek 5 by měl obsahovat 70 % jablečného pyré, 30 % meruňkového pyré a vitamin C. Hodnota kyseliny gallové byla 4,16 mg na 100 g WM, tato hodnota je o hodně vyšší, než u čistých směsí meruňky a jablka. Hodnoty pelargonidinu-3-glukosidu a kyseliny kumarové jsou také vyšší než by byly, pokud by byly použity stejné odrůdy ovoce. Vzorek obsahuje floridzin (1,88 mg na 100 g WM), který indikuje přítomnost jablečného pyré, meruňkovou DNA by mohl vzorek obsahovat, ale pravděpodobně obsahuje i něco dalšího, které zvýšilo hodnotu pelargonidinu-3-glukosidu.

Vzorek 6 měl obsahovat nejmenší podíl ovocné složky, a to 40 % meruňkové dřeně, vodu, 20 % jablečné dřeně, cukr, fruktózový sirup, škrob, kyselinu citronovou a vitamin C. Obsah floridzinu je nižší než u předchozích komerčních vzorků, což i odpovídá nižšímu zastoupené množství jablečného pyré. Hodnota kyseliny kumarové odpovídá, ale hodnoty pelargonidinu-3-glukosidu (0,04 mg) a kvercetin-3-glukosidu (0,01 mg) jsou vyšší než by byly očekávány při tomto složení z hodnot pro čisté ovoce. Tuto hodnotu mohly ovlivnit i přidaný extrakt z granátového jablka.

Množství polyfenolů v meruňkách závisí převážně na použitém kultivaru a oblast pěstování nemá na tuto hodnotu až tak významný vliv. Jelikož pro meruňkovou DNA neexistuje nějaký specifický marker, tak by u nich měly dominovat z fenolických látek flavan-3-oly, kyselina chlorogenová a kvercetin-3-rutinosid [83].

Lze jen konstatovat, že pravděpodobně je u vzorku 6 přítomné jablečkové i meruňkové pyré, kdy asi použily jinou odrůdu meruňky.

*Tabulka 34 – Obsah vybraných fenolických látek ve vzorcích*

Fenolické látky [mg / 100 g mokré váhy]						
vzorky	kyselina gallová	pelargonidin-3-glukosid	kyselina kumarová	kvercetin-3-glukosid	floridzin	Resveratrol
jahoda	3,22	5,71	0,60	0,23	0,19	n.a.
malina	1,77	0,52	n.a.	0,03	0,06	n.a.
meruňka	1,07	0,04	n.a.	n.a.	0,10	n.a.
jablko	0,19	0,00	0,00	n.a.	0,03	n.a.
1	0,38	0,02	0,04	0,01	0,36	0,01
2	4,09	0,43	0,26	0,26	3,16	0,22
3	4,15	0,07	0,66	n.a.	1,59	n.a.
4	0,60	0,02	0,03	0,02	0,82	n.a.
5	4,16	0,31	0,05	n.a.	1,88	0,05
6	0,92	0,04	n.a.	0,01	0,24	0,02



## 5 SHRNU TÍ VÝSLEDKŮ A ZÁVĚR

Předložená diplomová práce byla zaměřena na screeningovou analýzu dětských ovocných přesnídávek a zjištění jejich autentičnosti.

Pomocí komerčního izolačního kitu (od EliGene) byla úspěšně izolována rostlinná DNA z jahody, meruňky, maliny a jablka. Amplifikovatelnost izolované DNA byla ověřena (až na jeden jahodový vzorek) pomocí primerů specifických pro ITS2 region rostlin.

Poté byla rostlinná DNA amplifikována s využitím specifických primerů pro dané ovoce. Pro jahodovou DNA byl vybrán primer APX1B, u kterého má produkt amplifikace teplotu tání 80,63 °C a délka tohoto produktu je okolo 655 bp. Pro meruňkovou DNA byl vybrán primer AGS6 a detekovaný ampikon měl teplotu tání 77,19 °C a délku 244 bp. Pro malinovou DNA byl vybrán primer RiACO1 a jeho specifický produkt měl teplotu tání 85,51 °C a délku 218 bp. Pro jablkovou DNA byl vybrán primer FT MDP, jehož detekovaný PCR produkt měl teplotu tání 80,74 °C a délka fragmentu byla stanovena na 182 bp.

Teplotní profil PCR byl pro všechny čtyři vybrané primery nakonec zvolen totožný, aby mohla být vytvořena multiplex PCR.

V dalším kroku byly navrženy dvě duplex PCR, navzájem byly kombinovány primery APX1B (jahoda) s RiACO1 (malina). Druhá PCR směs obsahovala dvojici páru primerů pro meruňkovou (AGS6) a jablkovou (FT MDP) DNA.

Aby došlo k amplifikaci konkrétního úseku DNA, bylo potřeba ověřit specifičnost vybraných primerů. Navzájem byly kombinovány primery s izolovanou ovocnou DNA z jahody, meruňky, maliny a jablka. Bylo zjištěno, že primery AGS6, RiACO1 a FT MDP jsou specifické pro dané ovoce. Primer APX1B reagoval s malinovou DNA, takže v případě optimalizace tohoto postupu by bylo vhodné navrhnout zařazení pozitivní kontroly, aby se zamezilo falešně pozitivnímu výsledku.

Byly připraveny modelové směsi, které obsahovaly, buď jahodové a malinové pyré, nebo meruňkové a jablečné pyré. Vzniklo tak celkem sedm různých poměrů, a to 100:0, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 a 0:100. Bylo koupeno šest komerčních dětských výživ, u kterých byly zastoupeny ve většině případů dvě ze čtyř vybraných ovocí. Z těchto modelových i komerčních vzorků došlo k izolaci DNA. Ze vzorků byla DNA vyizolována v nízké koncentraci (max. do 11 ng/μl). Poté byla ověřena amplifikovatelnost izolované DNA pomocí primerů specifických pro ITS2 region. Všechny modelové směsi se amplifikovaly, což bylo potvrzeno i na agarosovém gelu. Z komerčních vzorků se amplifikovaly všechny, ale detekovány na gelu nebyly vzorky 4 a 6.

U modelových směsí a komerčních přesnídávek byla snaha o identifikaci rostlinné DNA pomocí duplex PCR a následné elektroforetické analýzy. U modelových meruňkovo-jablečných směsí kombinace meruňkového a jablečného primeru fungovala, protože byla úspěšně potvrzena přítomnost meruňkové i jablečné DNA ve vzorcích. Teplota tání se u vzorků obsahujících víc než 20 % meruňkové DNA pohybovala od 77,25 do 77,82 °C. Teplota tání amplifikované jablečné DNA se pohybovala okolo 80,46-81,02 °C. Pokud vzorek obsahoval 10 % meruňkové DNA a 90 % jablečné DNA, křivka tání byla podobnější vzorku s čistou jablečnou DNA a tomu odpovídaly i teploty tání. Aby byly vzorky správně vyhodnoceny je nutné provést horizontální elektroforézu na 1,2% agarosovém gelu, na kterém je detekovatelné i toto množství meruňky.

Pomocí duplex PCR s primery APX1B a RiACO1 bylo možné ve směsi analyzovat přítomnost malinové i jahodové DNA. Jestliže vzorek obsahoval jahodovou DNA, teplota tání se pohybovala mezi 80,31-80,47 °C. U vzorku 50:50 se spíše amplifikovala malinová DNA než jahodová, specifický amplikon pro jahodovou DNA byl detekován až při analýze gelu. Pokud vzorky obsahovaly malinovou DNA, tak se teplota tání pohybovala od 85,16 do 85,26 °C.

U komerčních vzorků amplifikace navrhnoutou metodou duplex PCR už tak dobře nefungovala jako u modelových směsí. Mohlo to být způsobeno nízkou koncentrací izolované DNA, která pravděpodobně obsahovala kontaminanty.

Je vhodné, aby se při přípravě modelových směsí zohlednily technologické postupy, které jsou použity při výrobě komerčních výživ. Hlavními rozdíly mezi připravenými modelovými směsmi a komerčními vzorky je fakt, že modelové směsi nebyly tepelně upraveny, pasírovány a byly bez jakýchkoliv přidaných látek. Jelikož většina ovocných přesnídávek obsahuje jablečné pyré, bylo by vhodnější připravit a analyzovat modelové směsi se stejným poměrem surovin, jako se používají u komerčních vzorků. Takové vzorky by lépe odpovídaly dostupnému sortimentu výživ.

Z analýzy dětských výživ pomocí biologických metod založených na analýze DNA vyplývá, že všechny komerční vzorky obsahovaly jablečnou DNA. Komerční vzorky 1 a 2 by navíc mohly obsahovat malinovou DNA, což neodpovídá složení. Tyto oba vzorky by měly obsahovat 20 % jahodového pyré, které nebylo potvrzeno pomocí specifického primeru APX1B. Pravděpodobně byl nevhodně zvolen primer APX1B, protože tvoří větší fragmenty (655 bp). Zároveň je možné, že DNA u komerčních výživ byla technologickým postupem degradována, a proto nelze vytvořit tak dlouhé amplikony jahodové DNA.

U vzorku 3 byla potvrzena přítomnost jablečné, jahodové a malinové DNA, odpovídá to složení vzorku, ve kterém by navíc už měla být jen banánová DNA. Dokonce by mohl obsahovat meruňkovou DNA podle teploty tání specifického produktu, který vznikl při reakci s primery AGS6 a FT MDP.

U vzorku 4 nebyla potvrzena přítomnost malinové DNA, ale mohl by obsahovat meruňkovou DNA, stejně jako předchozí vzorek 3.

U vzorku 6 byla potvrzena meruňková i jablečková DNA, což odpovídá složení produktu.

Pro molekulárně biologické metody sloužily jako srovnávací metody: stanovení celkových fenolických látek a flavonoidů ve vzorcích a HPLC. Vypočítané hodnoty TPC byly srovnány i s dalšími studiemi. Při analýze celkových fenolických látek a celkových flavonoidů obsahovaly meruňkovo-jablečné směsi nižší koncentrace celkových fenolických látek než jahodovo-malinové směsi. Komerční vzorky by mohly odpovídat složení uvedenému na obalu kromě vzorku 5, který měl velmi vysoké hodnoty TPC. Hodnoty pro celkové flavonoidy korelují s hodnotami TPC. Jelikož se jedná pouze o orientační metodu, byly tyto hodnoty doplněny naměřenými koncentracemi vybraných fenolických látek pomocí HPLC.

Opět zmiňuji, že by bylo vhodné připravit srovnávací modelové vzorky stejným způsobem jako byly připraveny komerční vzorky, pokud docházelo k výraznému poklesu obsahu některých fenolických látek při přípravě výživ, tak vzájemné porovnání naměřených hodnot nedává věrohodné výsledky. Každý vzorek obsahoval celé spektrum fenolických látek, které se při HPLC navzájem ovlivňovaly.

Výsledky HPLC analýzy potvrdily přítomnost floridzinu v komerčních vzorcích, a tedy přítomnost jablečného pyré u všech šesti vzorků. Jelikož jeho hodnoty byly vyšší než u jablečného pyré z odrůdy jona prince, tak to indikuje použití jiné odrůdy jablka k přípravě komerčních vzorků.

U komerčních vzorků 1 a 2, u kterých bylo uvedeno stejné procentuální zastoupení jahodového pyré. U vzorku 2 se naměřený obsah fenolických látek lépe shodoval s předpokládanými hodnotami. U obou vzorků byly naměřeny nižší koncentrace pelargonidinu-3-glukosidu a kvercetinu-3-glukosidu, které byly zvoleny za fenolické sloučeniny sloužící ke zjištění autenticity jahodového pyré. Jedním z vysvětlení je, že technologickou přípravou došlo ke snížení množství fenolických látek, dalším vysvětlením je použití jiné odrůdy jahody nebo menší množství jahodového podílu ve vzorcích. Obsahovaly také pravděpodobně jinou odrůdu jablka.

Pro vzorek 3 byla potvrzena přítomnost jablečného pyré, tento vzorek pravděpodobně obsahuje jahodové i malinové pyré. Tato pyré byla buď degradovaná, vyrobena z jiných odrůd, nebo jich bylo použito méně než se uvádí na etiketě.

U vzorku 4 byla potvrzena přítomnost jablečného pyré (jiná odrůda) a pravděpodobně obsahuje i malinové pyré, u kterého byly degradovány fenolické sloučeniny při jeho výrobě.

Vzorek 5 pravděpodobně obsahuje jablečné pyré. U meruňkového ani jablečného modelového pyré nebylo detekováno vyšší množství pelargonidinu, jehož koncentrace byla u tohoto vzorku vysoká. Toto pyré možná obsahovalo i další složky, které nebyly uvedeny ve složení produktu.

Vzorek 6 pravděpodobně odpovídá složení uvedenému na obalu, kdy byly použity jiné odrůdy jablka i meruňky.

Použitými metodami a jejich kombinací se pravděpodobně dá ověřit přítomnost vybraných druhů ovoce v potravinových produktech, ale bylo by vhodné využít další metody pro potvrzení výsledků, nebo se zaměřit na detailnější optimalizaci. Ať už při přípravě modelových směsí nebo samotných metod.

## SEZNAM LITERÁRNÍCH ZDROJŮ

- [1] ČÍŽKOVÁ, Helena, Rudolf ŠEVČÍK, Aleš RAJCHL, Jan PIVOŇKA a Michal VOLDŘICH. Trendy v autenticitě potravin a v přístupech k detekci falšování. *Chemické listy* [online]. Praha: Institute of Chemical Technology, 2012, **106**(10), 903-910 [cit. 2020-03-25]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: [http://chemicke-listy.cz/docs/full/2012\\_10\\_903-910.pdf](http://chemicke-listy.cz/docs/full/2012_10_903-910.pdf)
- [2] SOVOVÁ, Tereza, Křížová BARBORA a Ovesná JAROSLAVA. Determining the optimal method for DNA isolation from fruit jams. *Czech Journal of Food Sciences* [online]. 2018, **36**(2), 126-132 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.17221/340/2017-CJFS. ISSN 12121800. Dostupné z: <https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/244064.pdf>
- [3] MÍKOVÁ, Kamila. Vyhláška o potravinách určených pro zvláštní výživu. *Envi profi* [online]. Praha: Verlag Dashöfer, nakladatelství, spol. s r. o., 1997-2020 [cit. 2020-02-12]. Dostupné z: [https://www.enviprofi.cz/33/vyhlaska-o-potravinach-urcenyh-pro-zvlastni-vyzivu-uniqueidmRRWSbk196FNf8-jVUh4EIJc\\_cGyFPGgP7v7i4GgXg0/Aspekty%20bezpe%C4%8Dnosti%20a%20%C3%BAdr%C5%BEby%20nov%C4%9B%20instalovan%C3%BDch%20a%20modernizovan%C3%BDch%20v%C3%BDrobn%C3%ADch%20za%C5%99%C3%ADzen%C3%AD](https://www.enviprofi.cz/33/vyhlaska-o-potravinach-urcenyh-pro-zvlastni-vyzivu-uniqueidmRRWSbk196FNf8-jVUh4EIJc_cGyFPGgP7v7i4GgXg0/Aspekty%20bezpe%C4%8Dnosti%20a%20%C3%BAdr%C5%BEby%20nov%C4%9B%20instalovan%C3%BDch%20a%20modernizovan%C3%BDch%20v%C3%BDrobn%C3%ADch%20za%C5%99%C3%ADzen%C3%AD)
- [4] ČÍŽKOVÁ, H., R. ŠEVČÍK, A. RAJCHL a M. VOLDŘICH. Nutritional Quality of Commercial Fruit Baby Food. *Czech Journal of Food Sciences*. 2009, **27**(1), 134-137. DOI: 10.17221/616-CJFS. ISSN 12121800. Dostupné z: <https://ukp.vscht.cz/files/uzel/0007349/Cizkova+2009.pdf?redirected>
- [5] SEIDEL, Kathrin, Johannes KAHL, Flavio PAOLETTI et al. Quality assessment of baby food made of different pre-processed organic raw materials under industrial processing conditions. *Journal of Food Science and Technology*. 2015, **52**(2), 803-812. DOI: 10.1007/s13197-013-1109-5. ISSN 0022-1155. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-013-1109-5>
- [6] The fight against food fraud. *Food & Feed Analysis: a division of R-Biopharm AG* [online]. Darmstadt: R-Biopharm AG [cit. 2020-03-26]. Dostupné z: <https://food.r-biopharm.com/news/the-fight-against-food-fraud/>
- [7] ANDREWS, Ryan. Infant nutrition: The best nutrition from birth to year one. *Precision Nutrition* [online]. New York: Precision Nutrition Inc., 2020 [cit. 2020-03-29]. Dostupné z: <https://www.precisionnutrition.com/all-about-infant-nutrition>
- [8] Ovocné příkrmy – jaké a kdy začít. *Sunar* [online]. Hero Czech, s. r. o, 2020 [cit. 2020-03-29]. Dostupné z: <https://www.sunar.cz/ovocne-prikrm-y-jake-a-kdy-zacit/>
- [9] ZICHA, O., M. MAŇAS a J. NOVÁK. Profil taxonu: čeled' růžovité Rosaceae L. *BioLib: Biological Library* [online]. 1999-2019 [cit. 2020-03-26]. Dostupné z: <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id3270/>
- [10] SYTSMA, Kenneth. Rosaceae: Plant family. *Encyclopædia Britannica* [online]. Chicago: Britannica Group [cit. 2020-03-26]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/plant/Rosaceae>
- [11] ROBERTSON, Kenneth a Kenneth SYTSMA. Rosales: Plant order. *Encyclopædia Britannica* [online]. Chicago: Britannica Group [cit. 2020-03-26]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/plant/Rosales/Economic-and-ecological-importance#ref1009940>
- [12] MAHMOOD, Tahir, Farooq ANWAR, Mateen ABBAS a Nazamid SAARI. Effect of Maturity on Phenolics (Phenolic Acids and Flavonoids) Profile of Strawberry Cultivars

- and Mulberry Species from Pakistan. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2012, **13**(4), 4591-4607 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.3390/ijms13044591. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/13/4/4591>
- [13] Multimediální učební text Obecná botanika: Morfologie a klasifikace plodů. *Kiwi: uživatelský server Mendelovy univerzity v Brně* [online]. Brno: Mendelova univerzita v Brně [cit. 2020-03-26]. Dostupné z: [http://web2.mendelu.cz/af\\_211\\_multitext/obecna\\_botanika/texty-organologie-morfologie\\_klasifikace\\_plodu.html](http://web2.mendelu.cz/af_211_multitext/obecna_botanika/texty-organologie-morfologie_klasifikace_plodu.html)
- [14] LEE, Byung-Hyun, Jinki JO a Won-Il CHUNG. Sequence Variability of Nine Cytosolic Ascorbate Peroxidases in Polyploid Strawberry. *DNA Sequence* [online]. 2009, **11**(6), 475-484 [cit. 2020-03-25]. DOI: 10.3109/10425170109041331. ISSN 1042-5179. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10425170109041331>
- [15] KOPEC, Karel. *Tabulky nutričních hodnot ovoce a zeleniny*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1998. ISBN 80-861-5364-9.
- [16] LOZANO, Jorge. *Fruit Manufacturing: Scientific Basis, Engineering Properties, and Deteriorative Reactions of Technological Importance* [online]. United States of America: Springer, 2006 [cit. 2020-03-24]. ISBN 0-387-30616-1. Dostupné z: [https://books.google.cz/books?id=SoiEgjFMTjYC&pg=PA148&lpg=PA148&dq=apricot+apple+flavonoids&source=bl&ots=ch6ZBPJCPk&sig=ACfU3U1jIqTAITer6\\_-eSZvQZ6Z-1rnECg&hl=cs&sa=X&ved=2ahUKEwj9s-\\_s6LPoAhXPY6QKHXIIB2kQ6AEwAHoECACQAQ#v=onepage&q=apricot%20apple%20flavonoids&f=false](https://books.google.cz/books?id=SoiEgjFMTjYC&pg=PA148&lpg=PA148&dq=apricot+apple+flavonoids&source=bl&ots=ch6ZBPJCPk&sig=ACfU3U1jIqTAITer6_-eSZvQZ6Z-1rnECg&hl=cs&sa=X&ved=2ahUKEwj9s-_s6LPoAhXPY6QKHXIIB2kQ6AEwAHoECACQAQ#v=onepage&q=apricot%20apple%20flavonoids&f=false)
- [17] *Léčivé rostliny*. Praha: Ottovo nakladatelství, 2010. Ottův průvodce přírodou. ISBN 978-80-7360-588-9.
- [18] REKIKI, Djamila, Shahrokh KHANIZADEH, Martine DESCHÊNES, Audrey LEVASSEUR, Marie CHARLES, Rong TSAO a Raymond YANG. Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Selected Strawberry Genotypes. *HortScience* [online]. 2005, **40**(6), 1777-1781 [cit. 2020-07-19]. DOI: 10.21273/HORTSCI.40.6.1777. ISSN 0018-5345. Dostupné z: <https://journals.ashs.org/view/journals/hortsci/40/6/article-p1777.xml>
- [19] ERDOGAN-ORHAN, Ilkay a Murat KARTAL. Insights into research on phytochemistry and biological activities of *Prunus armeniaca* L. (apricot). *Food Research International* [online]. 2011, **44**(5), 1238-1243 [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.11.014. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996910004473>
- [20] BAŽANT, Zdeněk. *Pěstujeme meruňky*. Praha: Grada, 2004, 100 s. Česká zahrada, (57.). ISBN 80-247-0873-6.
- [21] JIMÉNEZ, A., M. MARTÍNEZ-TOMÉ, I. EGEA, F. ROMOJARO a M. MURCIA. Effect of industrial processing and storage on antioxidant activity of apricot (*Prunus armeniaca* v. *bulida*). *European Food Research and Technology* [online]. 2008, **227**(1), 125-134 [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.1007/s00217-007-0701-1. ISSN 1438-2377. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-007-0701-1>
- [22] SHAHIDI, Fereidoon a Marian NACZK. *Phenolics in food and nutraceuticals*. 1st Edition. Boca Raton: CRC Press, 2003, 576 s. ISBN 15-871-6138-9. Dostupné z: [https://www.academia.edu/4200762/Phenolics\\_in\\_Food\\_and\\_Nutraceuticals\\_Phenolics\\_in\\_Food\\_and\\_NutraceuticalsPrefaceFereidoon\\_Shahidi](https://www.academia.edu/4200762/Phenolics_in_Food_and_Nutraceuticals_Phenolics_in_Food_and_NutraceuticalsPrefaceFereidoon_Shahidi)
- [23] FRANCINI, Alessandra a Luca SEBASTIANI. Phenolic Compounds in Apple (*Malus x domestica* Borkh.): Compounds Characterization and Stability during Postharvest and

- after Processing. *Antioxidants* [online]. 2013, **2**(3), 181-193 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.3390/antiox2030181. ISSN 2076-3921. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2076-3921/2/3/181>
- [24] MARKOWSKI, Jarosław a Witold PLOCHARSKI. Determination of phenolic compounds in Apples and processed apple products. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* [online]. 2006, **14**(2) [cit. 2020-03-26]. ISSN 1231-0948. Dostupné z: [http://www.insad.pl/files/journal\\_pdf/Suppl\\_2\\_2006/Suppl\\_2\\_full\\_12\\_2006.pdf](http://www.insad.pl/files/journal_pdf/Suppl_2_2006/Suppl_2_full_12_2006.pdf)
- [25] IACOPINI, Patrizia, Fabiano CAMANGI, Agostino STEFANI a Luca SEBASTIANI. Antiradical potential of ancient Italian apple varieties of *Malus domestica* Borkh. in a peroxy-nitrite-induced oxidative process. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2010, **23**(6), 518-524 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1016/j.jfca.2009.05.004. ISSN 08891575. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157509001574>
- [26] FU, Li, Bo-Tao XU, Xiang-Rong XU, Ren-You GAN, Yuan ZHANG, En-Qin XIA a Hua-Bin LI. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry* [online]. 2011, **129**(2), 345-350 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.04.079. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611006455>
- [27] ANDRADE, Ana, Srinivasan DAMODARAN a Kirk PARKIN, ed., Owen FENNEMA. *Fennema's Food Chemistry*. 4th edition. Boca Raton: CRC Press, 2008, 1144 s. ISBN 0-8493-9272-1. Dostupné z: [https://www.academia.edu/8361211/Fennemas\\_Food\\_Chemistry\\_4th\\_edition\\_pdf](https://www.academia.edu/8361211/Fennemas_Food_Chemistry_4th_edition_pdf)
- [28] MAREK, Adam. *Výroba rozmělněných ovocných polotovarů*. Praha: VŠCHT, 2016, 19 s. Dostupné z: <https://docplayer.cz/25712572-Vyroba-rozmelnenych-ovocnych-polotovaru-rozmelnene-ovocne-materialy-se-pouzivaji-jako-vyroba-rozmelnenych-ovocnych-polotovaru.html>
- [29] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2012. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-145-0.
- [30] HORČIN, Vojtech. *Technológia spracovania ovocia a zeleniny*. 2. nezm. vyd. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2008. ISBN 978-80-552-0063-7.
- [31] DASENAKI, Marilena a Nikolaos THOMAIDIS. Quality and Authenticity Control of Fruit Juices-A Review. *Molecules* [online]. 2019, **24**(6) [cit. 2020-07-16]. DOI: 10.3390/molecules24061014. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/6/1014>
- [32] TAUFEROVÁ, Alexandra, Martina OŠŤÁDALOVÁ, Zdeňka JAVŮRKOVÁ, Michaela PETRÁŠOVÁ a Petra ČÁSLAVKOVÁ. *Technologie a hygiena potravin rostlinného původu I., II.* [online]. Brno: VFU Brno, 2014, 170 s. [cit. 2020-05-16]. Dostupné z: [https://fvhe.vfu.cz/files/rostliny-technologie\\_a\\_hyg.\\_potravin,skripta.pdf](https://fvhe.vfu.cz/files/rostliny-technologie_a_hyg._potravin,skripta.pdf)
- [33] ČÍŽKOVÁ, Helena. Metody hodnocení autenticity a detekce falšování potravin. *Potravinový info* [online]. Praha: Verlag Dashöfer, nakladatelství, spol. s r. o., 2020 [cit. 2020-03-27]. Dostupné z: [https://www.potravinovyinfo.cz/33/metody-hodnoceni-autenticity-a-detekce-falsovani-potravin-uniqueidmRRWSbk196FNf8-jVUUh4EIJc\\_cGyFPGgsq6VfC6jhTPVRYFLS2WAvA/%C2%A8](https://www.potravinovyinfo.cz/33/metody-hodnoceni-autenticity-a-detekce-falsovani-potravin-uniqueidmRRWSbk196FNf8-jVUUh4EIJc_cGyFPGgsq6VfC6jhTPVRYFLS2WAvA/%C2%A8)
- [34] JEŽEK, František a Alena SALÁKOVÁ. *Senzorická analýza potravin* [online]. Brno: VFU, 2012 [cit. 2020-03-27]. Dostupné z: [https://fvhe.vfu.cz/files/skripta-senzorika\\_2012.pdf](https://fvhe.vfu.cz/files/skripta-senzorika_2012.pdf)

- [35] ČÍŽKOVÁ, Helena. Úvod do problematiky falšování potravin. *Potraviny info* [online]. Praha: Verlag Dashöfer, nakladatelství, spol. s r. o., 2020 [cit. 2020-03-28]. Dostupné z: <https://www.potravinyinfo.cz/33/uvod-do-problematiky-falsovani-potravin-uniqueidmRRWSbk196FNf8-jVUh4EtI668NLi3Lvk4eZlhFhv3b2ZspOsA8wwA/>
- [36] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. První. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [37] KIM, C., C. LEE, J. SHIN, Y. CHUNG a N. HYUNG. A Simple and Rapid Method for Isolation of High Quality Genomic DNA from Fruit Trees and Conifers Using PVP. *Nucleic Acids Research* [online]. 1997, **25**(5), 1085-1086 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1093/nar/25.5.1085. ISSN 0305-1048. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/25.5.1085>
- [38] RUML, Tomáš, Michaela RUMLOVÁ a Václav PAČES. *Genové inženýrství*. Dotisk. Praha: VŠCHT, 2007. ISBN 978-80-7080-499-5.
- [39] 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. 2020-04-30]. DOI: 10.1002/biot.200600195. ISSN 18606768. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/biot.200600195>
- [40] PETZER, Inge-Marie, Joanne KARZIS, Theodorus VAN DER SCHANS, Johanna WATERMEYER, Norman MITCHELL-INNES, Stephanie ELOFF a Geoffrey FOSGATE. Comparing effects of freezing at -196 °C and -20 °C on the viability of mastitis pathogens. *Onderstepoort J Vet Res* [online]. Pretoria, 2012, **79**(1), 1-6 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.4102/ojvr.v79i1.343. ISSN 2219-0635. Dostupné z: <http://ojvr.org/index.php/ojvr/article/view/343>
- [41] KITNER, Miloslav. *Odběr a uchování vzorků pro extrakci DNA* [prezentace]. Olomouc: Katedra botaniky PřF UP, 2014, 67 s. Dostupné z: <http://www.moloch.upol.cz/uploads/vyukovy-portal/molek-2-odbe-r-vzorku-extrakce-dna.pdf>
- [42] BRABEC, Viktor. *Izolace genomové DNA ze savčích buněk, stanovení koncentrace DNA pomocí absorpční spektrofotometrie: KBF/PZLM Laboratorní cvičení 4*. Olomouc: Katedra biofyziky PřF UPOL, 2017, 6 s. Dostupné z: [http://biofyzika.upol.cz/userfiles/file/4\\_Izolace%20genomov%C3%A9%20DNA.pdf](http://biofyzika.upol.cz/userfiles/file/4_Izolace%20genomov%C3%A9%20DNA.pdf)
- [43] JAROŠOVÁ, Jana, Jaroslav POLÁK a Jiban KUMAR. *Metodika molekulární detekce virů peckovin pomocí RT-PCR a multiplex-RT-PCR: Metodika pro Státní rostlinolékařskou správu* [online]. Praha: VÚRV, v.v.i., 2008, , 1-26 [cit. 2020-03-26]. ISBN: 978-80-87011-86-7. Dostupné z: <https://www.vurv.cz/sites/File/Publications/ISBN978-80-87011-86-7.pdf>
- [44] *NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer: V1.0 User Manual*. Wilmington: Thermo Fisher Scientific Inc., 2009, 97 s. Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/NanoDrop-2000-User-Manual-EN.pdf>
- [45] MLA style: The Nobel Prize in Chemistry 1993. *The Nobel prize* [online]. Nobel Media AB, 2020 [cit. 2020-03-27]. Dostupné z: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1993/summary/>
- [46] PRŮŠA, Richard, Jan LÁNY, Jan VEJVALKA, Václav KARGER a Karel KOTAŠKA. *Multimediální učebnice DNA diagnostiky: Určeno pro studenty lékařských fakult* [online]. 1. vydání. Praha: 2. lékařská fakulta UK, 1998 [cit. 2020-03-28]. Dostupné z: <http://kolweb.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/>

- [47] TERPE, Kay. Overview of thermostable DNA polymerases for classical PCR applications: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2013, **97**(24), 10243-10254 [cit. 2020-03-28]. DOI: 10.1007/s00253-013-5290-2. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-013-5290-2>
- [48] KRÁLOVÁ, Blanka, Ladislav FUKAL, Pavel RAUCH a Tomáš RUMML. *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 80-7080-449-1.
- [49] KUBISTA, Mikael, José ANDRADE, Martin BENGTSSON et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* [online]. 2006, **27**(2-3), 95-125 [cit. 2020-03-29]. DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.007. ISSN 00982997. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098299705000907>
- [50] *Bioprospect: bulletin biotechnologických společností v České republice a Slovenské republice*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2014, , 95-97 s. ISSN 1210-1737. Dostupné z: <https://www.medvik.cz/bmc/view.do?gid=1067542>
- [51] NEIDLER, Sarah. What are the differences between PCR, RT-PCR, qPCR, and RT-qPCR?. *Enzo* [online]. Enzo Life Sciences, Inc., 2020 [cit. 2020-03-29]. Dostupné z: <https://www.enzolifesciences.com/science-center/technotes/2017/march/what-are-the-differences-between-pcr-rt-pcr-qpcr-and-rt-qpcr?/>
- [52] QPCR: Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR). *VŠCHT: Ústav mléka, tuků a kosmetiky* [online]. Praha: VŠCHT UMTK, 2016 [cit. 2020-03-29]. Dostupné z: <http://umtk.vscht.cz/miniatlas-vad/metody/qpcr/>
- [53] SIGMA-ALDRICH CO. *QPCR Technical Guide*. Sigma-Aldrich, 2008, 42 s. Dostupné z: <https://www.gene-quantification.de/SIAL-qPCR-Technical-Guide.pdf>
- [54] ARAKI, Choji. Structure of the Agarose Constituent of Agar-agar. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* [online]. 1956, **29**(4), 543-544 [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.1246/bcsj.29.543. ISSN 0009-2673. Dostupné z: <http://www.journal.csj.jp/doi/10.1246/bcsj.29.543>
- [55] EFENDI, Ferry, Retno HANDAJANI a Nursalam NURSALAM. Searching for the best agarose candidate from genus Gracilaria, Eucheuma, Gelidium and local brands. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* [online]. 2015, **5**(10), 865-869 [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.1016/j.apjtb.2015.06.009. ISSN 22211691. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2221169115001458>
- [56] SUDHAKAR, Y., M. SELVAKUMAR a D. KRISHNA BHAT. *Biopolymer Electrolytes: Fundamentals and Applications in Energy Storage* [online]. Amsterdam: Elsevier, 2018 [cit. 2020-03-27]. ISBN 978-0-12-813447-4. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=6YRfDwAAQBAJ&pg>
- [57] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
- [58] COUFAL, Pavel. High Performance Liquid Chromatography, HPLC. *Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova* [online]. Praha [cit. 2020-07-14]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>
- [59] SNYDER, Lloyd, Joseph GLAJCH a J. KIRKLAND. *Practical HPLC method development*. 2ND ED. New York: WILEY, 1997. ISBN 9781118592014.
- [60] Kapalinová chromatografie s různými typy detekce pro analýzu biologicky významných látek. *NanoBioMetalNet* [online]. Brno: Laboratoř metalomiky a nanotechnologií, 2014 [cit. 2020-07-14]. Dostupné z:



[http://web2.mendelu.cz/af\\_239\\_nanotech/nanobiometalnet/ucebni-pumucky/UP\\_6\\_Kapalinova%20chromatografie%20s%20různými%20typy%20detekce%20pro%20analýzu%20biologicky%20významných%20látek.pdf](http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/nanobiometalnet/ucebni-pumucky/UP_6_Kapalinova%20chromatografie%20s%20různými%20typy%20detekce%20pro%20analýzu%20biologicky%20významných%20látek.pdf)

- [61] JANDERA, Pavel a Jaroslav CHURÁČEK. *Gradient elution in column liquid chromatography: theory and practice*. Amsterdam: Elsevier, 1985. Journal of chromatography library. ISBN 04-444-2124-6. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=0WfYjrb2VgsC&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false>
- [62] SMITH, Clare. Disadvantages & Advantages of an HPLC. *Sciencing* [online]. Santa Monica: Leaf Group Media, 2020 [cit. 2020-07-14]. Dostupné z: <https://sciencing.com/disadvantages-advantages-hplc-5911530.html>
- [63] BLAINSKI, Andressa, Gisely LOPES a João DE MELLO. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules* [online]. 2013, **18**(6), 6852-6865 [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.3390/molecules18066852. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/18/6/6852>
- [64] AINSWORTH, Elizabeth a Kelly GILLESPIE. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols* [online]. 2007, **2**(4), 875-877 [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1038/nprot.2007.102. ISSN 1754-2189. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nprot.2007.102>
- [65] BANCUTA, O., A. CHILIAN, I. BANCUTA, R.-M. ION, R. SETNESCU, T. SETNESCU a A GHEBOIANU. Improvement of Spectrophotometric Method for Determination of Phenolic Compounds by Statistical Investigations. *Romanian Journal of Physics* [online]. 2016, **61**(7–8), 1-10, 1255–1264 s. [cit. 2020-03-24]. ISSN 1221-146X. Dostupné z: [http://www.nipne.ro/rjp/2016\\_61\\_7-8/RomJPhys.61.p1255.pdf](http://www.nipne.ro/rjp/2016_61_7-8/RomJPhys.61.p1255.pdf)
- [66] CHEN, Shilin, Hui YAO, Jianping HAN et al. Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. *PLoS ONE* [online]. 2010, **5**(1) [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.1371/journal.pone.0008613. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0008613>
- [67] SARGENT, D., A. RYS, S. NIER, D. SIMPSON a K. TOBUTT. The development and mapping of functional markers in *Fragaria* and their transferability and potential for mapping in other genera. *Theoretical and Applied Genetics* [online]. 2006, **114**(2), 373-384 [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.1007/s00122-006-0441-9. ISSN 0040-5752. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00122-006-0441-9>
- [68] MUÑOZ SANZ, Juan. *Crossability barriers in Prunus: the role of modifiers in the regulation of the gametophytic self-incompatibility system*. Valencia, 2016, 236 s. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/24f1/a331e1e48a64e20b2d713f312f3a4e8cf0e4.pdf>. Tesis doctoral. Universitat Politècnica de València. Vedoucí práce Dr. Carlos Romero Salvador, Dra. Marisa Badenes Catalá.
- [69] ZHANG, Songwen, Dong ZHANG, Sheng FAN et al. Effect of exogenous GA 3 and its inhibitor paclobutrazol on floral formation, endogenous hormones, and flowering-associated genes in ‘Fuji’ apple (*Malus domestica* Borkh.). *Plant Physiology and Biochemistry* [online]. 2016, **107**, 178-186 [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.06.005. ISSN 09819428. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942816302261>

- [70] DONG, Qinglong, Ke MAO, Dingyue DUAN et al. Genome-wide analyses of genes encoding FK506-binding proteins reveal their involvement in abiotic stress responses in apple. *BMC Genomics* [online]. 2018, **19**(1) [cit. 2020-03-28]. DOI: 10.1186/s12864-018-5097-8. ISSN 1471-2164. Dostupné z: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-018-5097-8>
- [71] MA, Baiquan, Yangyang YUAN, Meng GAO, Libo XING, Cuiying LI, Mingjun LI a Fengwang MA. Genome-wide Identification, Classification, Molecular Evolution and Expression Analysis of Malate Dehydrogenases in Apple. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, **19**(11) [cit. 2020-03-28]. DOI: 10.3390/ijms19113312. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/11/3312>
- [72] ZHENG, Desen a Geza HRAZDINA. Molecular and biochemical characterization of benzalacetone synthase and chalcone synthase genes and their proteins from raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 2008, **470**(2), 139-145 [cit. 2020-03-28]. DOI: 10.1016/j.abb.2007.11.013. ISSN 00039861. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986107005620>
- [73] VILANOVA, Santiago, Daniel SARGENT, Pere ARÚS a Amparo MONFORT. Synteny conservation between two distantly-related Rosaceae genomes: *Prunus* (the stone fruits) and *Fragaria* (the strawberry). *BMC Plant Biology* [online]. 2008, **8**(1) [cit. 2020-03-28]. DOI: 10.1186/1471-2229-8-67. ISSN 1471-2229. Dostupné z: <http://bmcplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2229-8-67>
- [74] FUENTES, Lida, Liliam MONSALVE, Luis MORALES-QUINTANA, Mónica VALDENEGRO, Juan-Pablo MARTÍNEZ, Bruno DEFILIPPI a Mauricio GONZÁLEZ-AGÜERO. Differential expression of ethylene biosynthesis genes in drupelets and receptacle of raspberry (*Rubus idaeus*). *Journal of Plant Physiology* [online]. 2015, **179**, 100-105 [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.1016/j.jplph.2015.02.005. ISSN 01761617. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0176161715000437>
- [75] *EliGene® Plant DNA Isolation Kit: Návod k použití*. Brno-Židenice: ELISABETH PHARMACON, spol. s r. o., 2018, 8 s. Dostupné z: <https://www.elisabeth.cz/produkt-eligene-plant-dna-isolation-extraction-kit.html>
- [76] MATLOCK, Brian. *Assessment of Nucleic Acid Purity*. Wilmington: Thermo Fisher Scientific, 2015. Technical Note 52646. Dostupné z: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>
- [77] ROTHWELL, JA, J PÉREZ-JIMÉNEZ, V NEVEU et al. *Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content* [Database]. 2013 [cit. 2020-05-05]. 10.1093/database/bat070. Dostupné z: <http://phenol-explorer.eu/>
- [78] GÖZLEKÇI, Sadiye, Onur SARAÇOĞLU, Ebru ONURSAL a Mustafa ÖZGEN. Total phenolic distribution of juice, peel, and seed extracts of four pomegranate cultivars. *Pharmacognosy Magazine* [online]. 2011, **7**(26) [cit. 2020-07-16]. DOI: 10.4103/0973-1296.80681. ISSN 0973-1296. Dostupné z: <http://www.phcog.com/text.asp?2011/7/26/161/80681>
- [79] SHIRI, Mohammad, Mahmood GHASEMNEZHAD, Davood BAKHSHI a Mohammad SAADATIAN. *Effects of ascorbic acid on phenolic compounds and antioxidant activity of packaged fresh cut table grapes* [online]. *EJEAFChe*, 2011, , 2506-2515 s. [cit. 2020-07-20]. ISSN 1579-4377. Dostupné z:

- [https://www.researchgate.net/publication/234055244\\_Effects\\_of\\_ascorbic\\_acid\\_on\\_phenolic\\_compounds\\_and\\_antioxidant\\_activity\\_of\\_packaged\\_fresh\\_cut\\_table\\_grapes](https://www.researchgate.net/publication/234055244_Effects_of_ascorbic_acid_on_phenolic_compounds_and_antioxidant_activity_of_packaged_fresh_cut_table_grapes)
- [80] SÁNCHEZ-RANGEL, Juan, Jorge BENAVIDES, J. HEREDIA, Luis CISNEROS-ZEVALLOS a Daniel JACOBO-VELÁZQUEZ. The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods* [online]. 2013, **5**(21) [cit. 2020-07-20]. DOI: 10.1039/c3ay41125g. ISSN 1759-9660. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3ay41125g>
- [81] LONDZIN, Piotr, Szymon SIUDAK, Urszula CEGIEŁA, Maria PYTLIK, Aleksandra JANAS, Arkadiusz WALIGÓRA a Joanna FOLWARCZNA. Phloridzin, an Apple Polyphenol, Exerted Unfavorable Effects on Bone and Muscle in an Experimental Model of Type 2 Diabetes in Rats. *Nutrients* [online]. 2018, **10**(11) [cit. 2020-07-29]. DOI: 10.3390/nu10111701. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6643/10/11/1701>
- [82] SEBASTIÀ, Natividad, Alegría MONTORO, Zacarías LEÓN a Jose SORIANO. Searching trans-resveratrol in fruits and vegetables: a preliminary screening. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2017, **54**(3), 842-845 [cit. 2020-07-29]. DOI: 10.1007/s13197-016-2474-7. ISSN 0022-1155. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-016-2474-7>
- [83] DRAGOVICUZELAC, V, B LEVAJ, V MRKIC, D BURSAC a M BORAS. The content of polyphenols and carotenoids in three apricot cultivars depending on stage of maturity and geographical region. *Food Chemistry* [online]. 2007, **102**(3), 966-975 [cit. 2020-07-22]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.04.001. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814606002962>
- [84] Primer-BLAST: A tool for finding specific primers. *NCBI: National Center for Biotechnology Information* [online]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine [cit. 2020-03-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CE	Catechin equivalents – Ekvivalent katechinu
DM	Dry Mass – suchá masa
dsDNA	double-stranded DNA – dvouvláknová DNA
FMC	Folin-Ciocalteu Method – Folin-Ciocalteuova metoda
GAE	Gallic Acid Equivalents – Ekvivalent kyseliny gallové
GC	Gas Chromatography – plynová chromatografie
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
n.a.	nebylo analyzováno
NK	negativní kontrola
PCR	Polymerase Chain Reaction – polymerasová řetězová reakce
PK	pozitivní kontrola
sNTPs	stavební kameny DNA (dATP - deoxyadenosin trifosfát, dCTP - deoxycytidin trifosfát, dGTP – deoxyguanosin trifosfát, dTTP - deoxythymidin trifosfát)
TPC	Total Phenolic Content – celkové fenolické látky
TFC	Total Flavonoid Content – celkové flavonoidy
UV	UltraViolet – ultrafialový
UV/VIS	Ultrafialová a viditelná spektroskopie
WM	Wet Mass – vlhká masa (suchá masa + voda)

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ

A	absorbance
C	koncentrace roztoku
L	tloušťka kyvety
$\epsilon$	maximální molární absorpční koeficient
T <sub>m</sub>	teplota tání

## 8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 – Kalibrační křivka kyseliny gallové pro stanovení celkových polyfenolů

Příloha 2 – Kalibrační křivka katechinu pro stanovení celkových flavonoidů

Příloha 3 – Kalibrační křivka kyseliny gallové (HPLC)

Příloha 4 – Kalibrační křivka floridzinu (HPLC)

Příloha 5 – Kalibrační křivka hesperidinu (HPLC)

Příloha 6 – Kalibrační křivka kvercetinu-3-glukosidu (HPLC)

Příloha 7 – Kalibrační křivka kyseliny kumarové (HPLC)

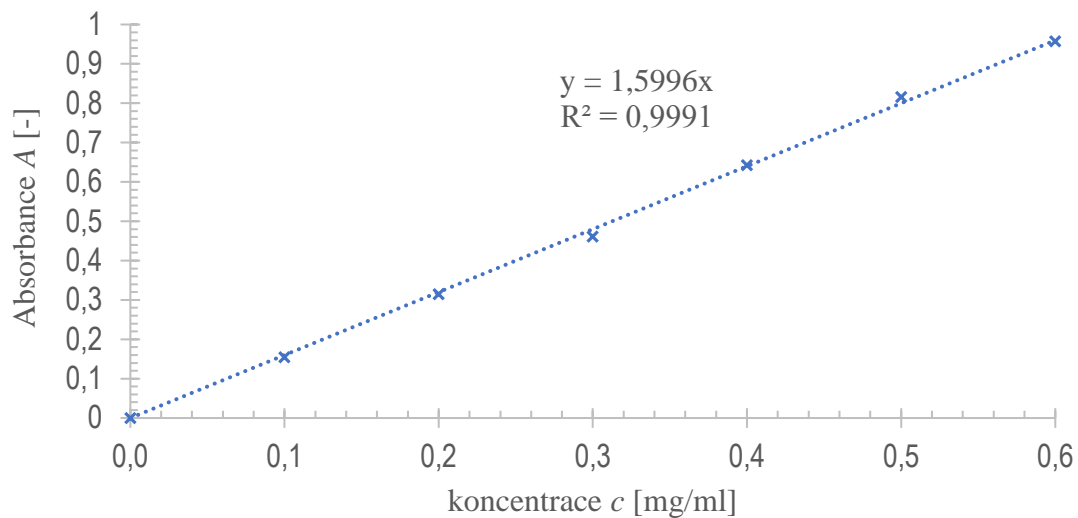
Příloha 8 – Kalibrační křivka pelargonidinu-3-glukosidu (HPLC)

Příloha 9 – Kalibrační křivka resveratrolu (HPLC)

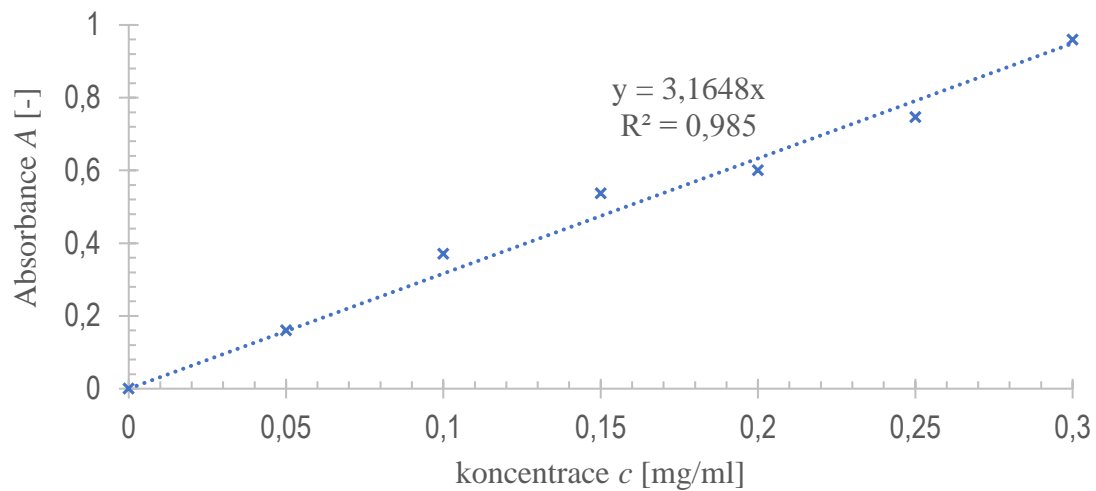
Příloha 10 - Chromatogram fenolických látek v komerčním vzorku 2 (jablko + jahoda)

## 9 PŘÍLOHY

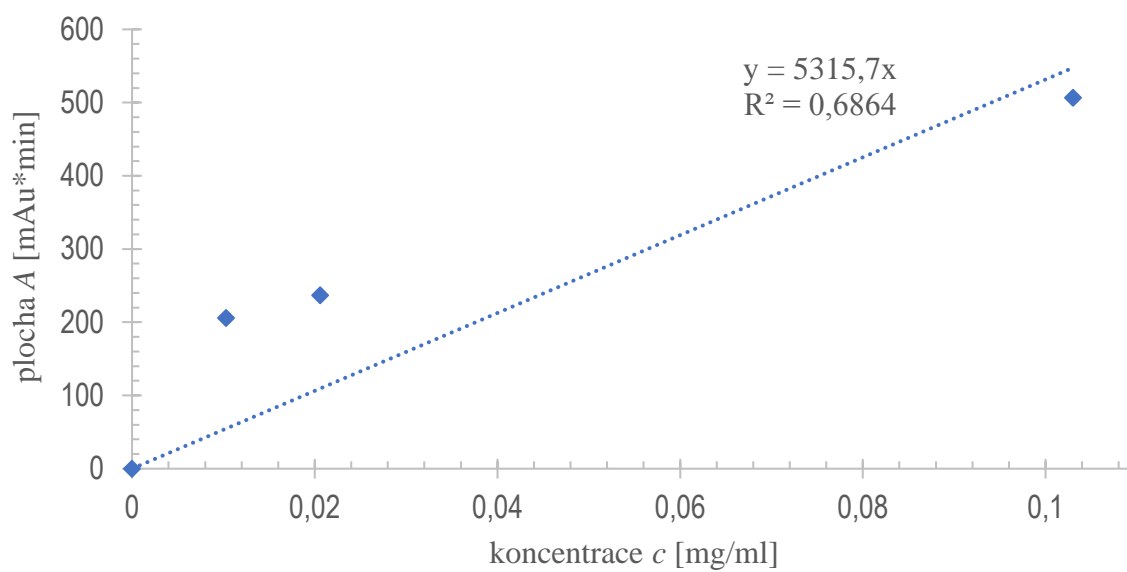
*Příloha 1 – Kalibrační křivka kyseliny gallové pro stanovení celkových polyfenolů*



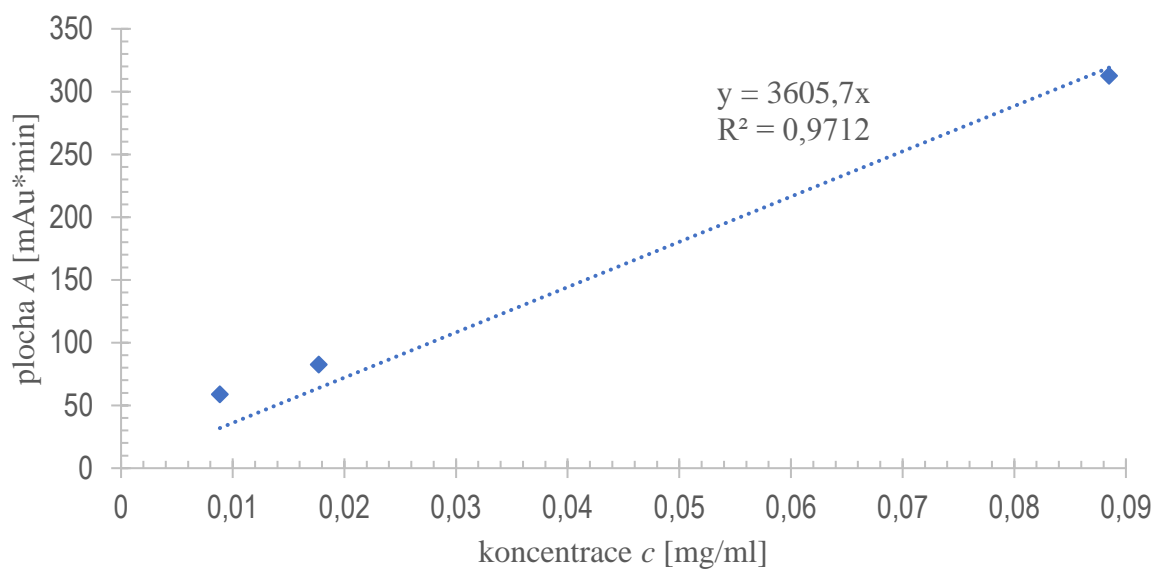
*Příloha 2 – Kalibrační křivka katechinu pro stanovení celkových flavonoidů*



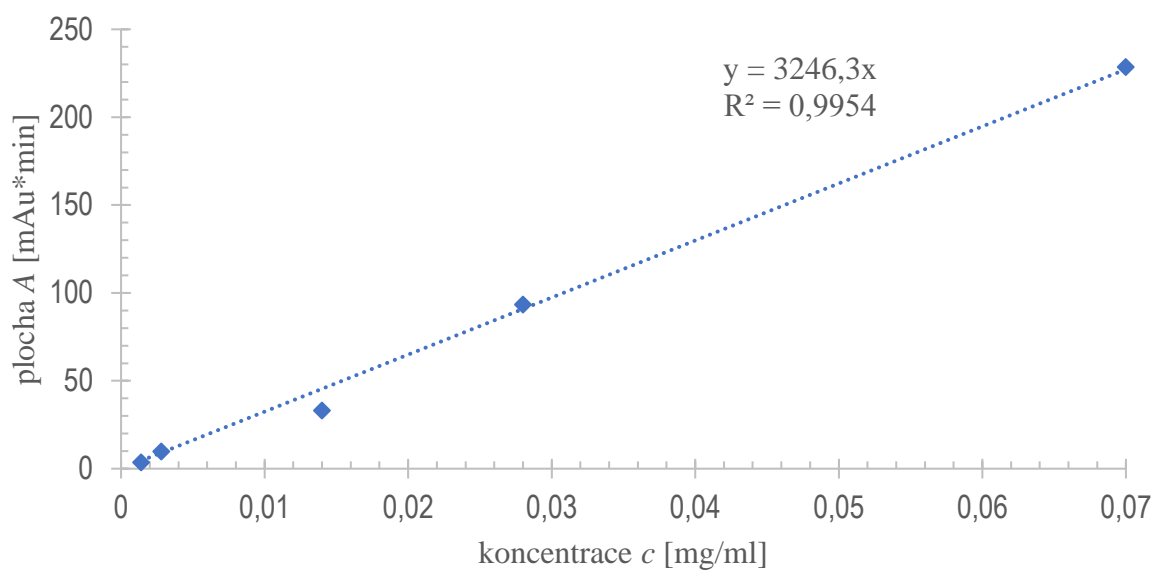
Příloha 3 – Kalibrační křivka kyseliny gallové (HPLC)



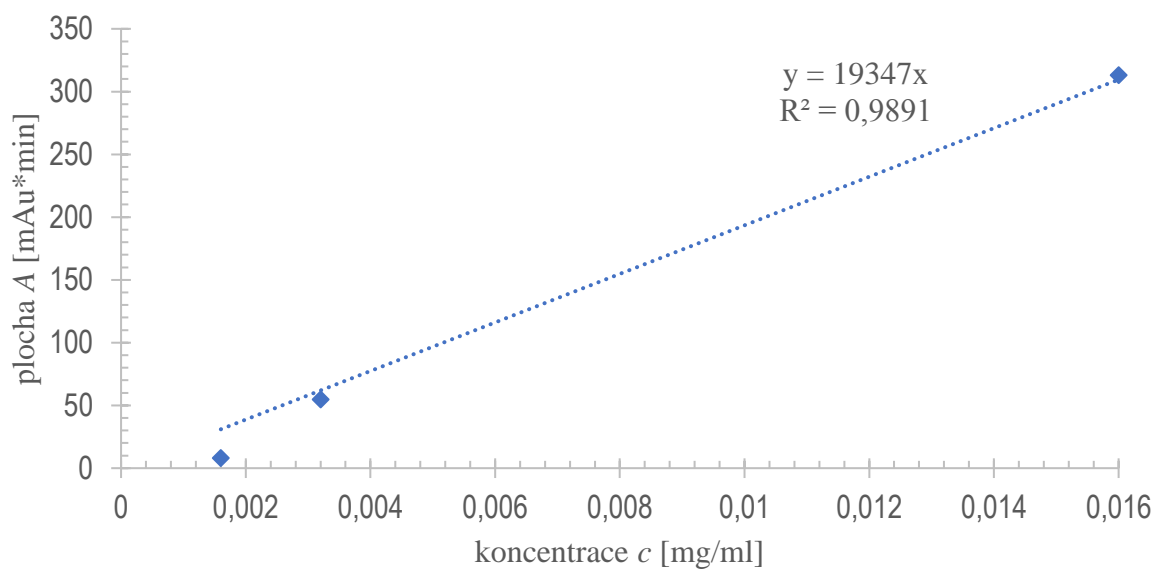
Příloha 4 – Kalibrační křivka floridzinu (HPLC)



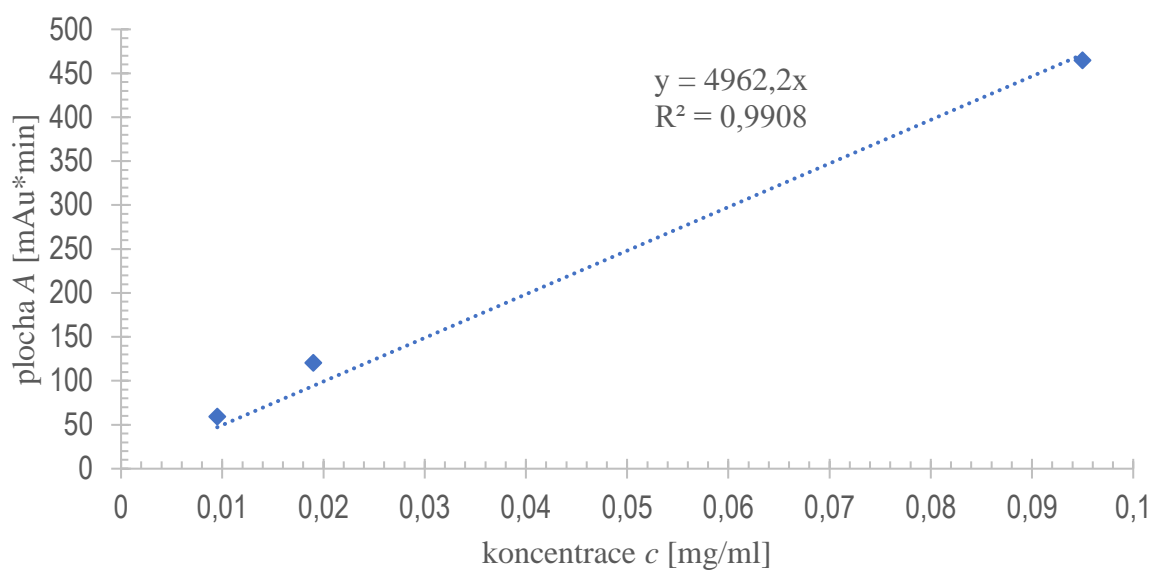
Příloha 5 – Kalibrační křivka hesperidinu (HPLC)



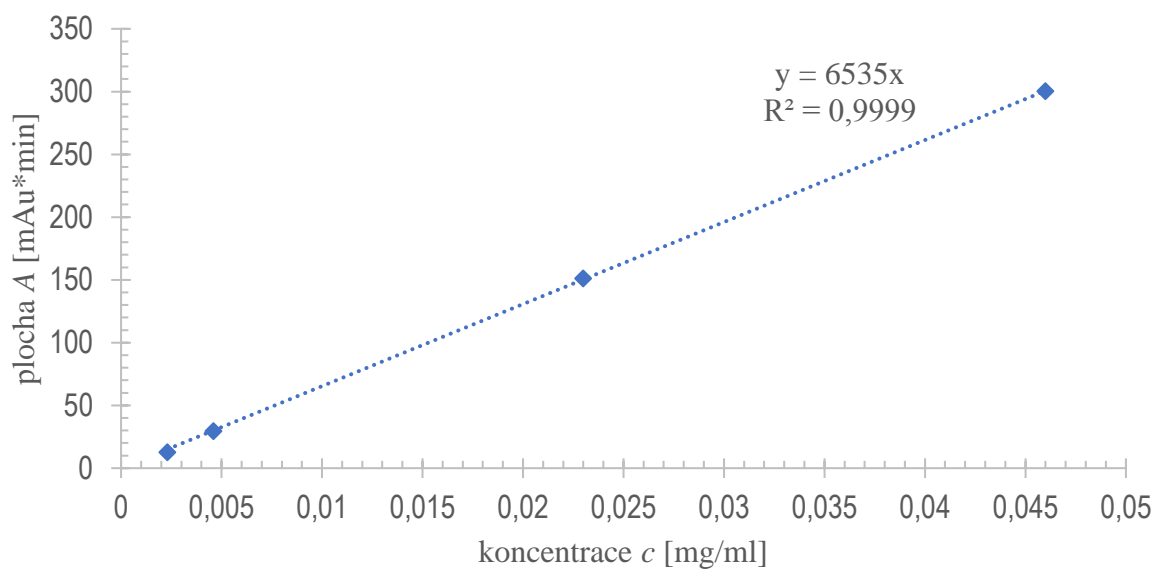
Příloha 6 – Kalibrační křivka kvercetin-3-glukosidu (HPLC)



Příloha 7 – Kalibrační křivka kyseliny kumarové (HPLC)

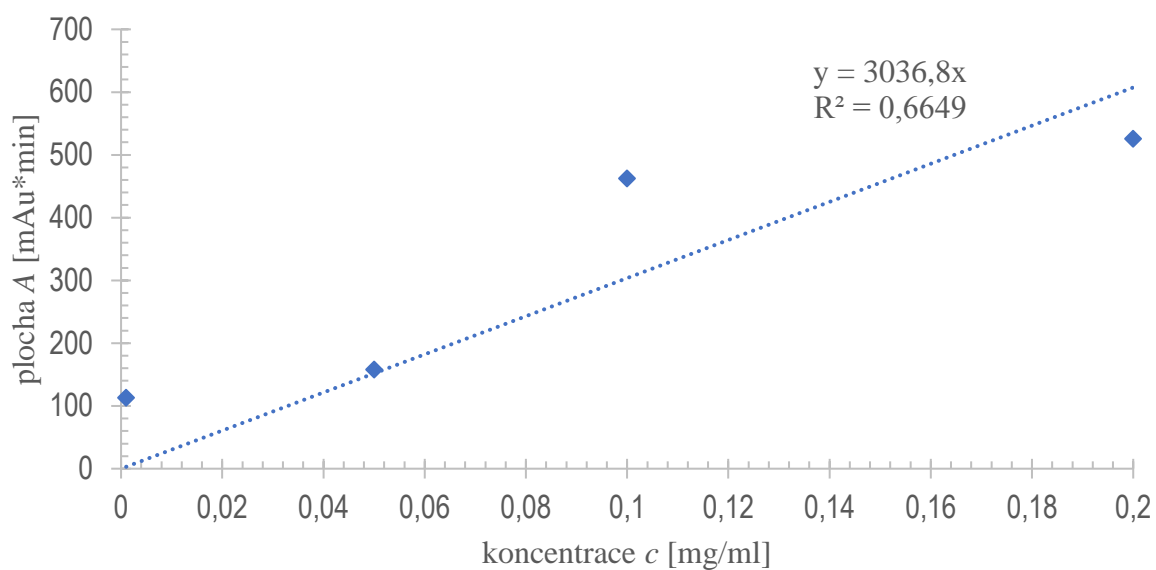


Příloha 8 – Kalibrační křivka pelargonidinu-3-glukosidu (HPLC)





Příloha 9 – Kalibrační křivka resveratrolu (HPLC)



Příloha 10 - Chromatogram fenolických látek v komerčním vzorku 2 (jablko + jahoda)

