



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

TESTOVÁNÍ MIKROMETODY IZOLACE DNA Z LISTŮ, PLODŮ A VÝROBKŮ Z OVOCE

EVALUATION OF A MICROMETHOD FOR ISOLATION OF DNA FROM PLANT LEAF, FRUIT AND FRUIT PRODUCTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Nikola Balažovičová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Aleš Kovařík, CSc.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1286/2018
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Nikola Balažovičová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **RNDr. Aleš Kovařík, CSc.**
Akademický rok: 2018/19

Název diplomové práce:

Testování mikrometody izolace DNA z listů, plodů a výrobků z ovoce

Zadání diplomové práce:

Cílem práce je detekce DNA rostlinného původu v technologicky upracovaných potravinách, jako jsou džemy a marmelády. Budou optimalizovány podmínky amplifikace PCR. Bude sledován vliv délky ampliconu na kvantitu a kvalitu PCR produktu.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019

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

Bc. Nikola Balažovičová
student(ka)

RNDr. Aleš Kovařík, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Diplomová práca bola zameraná na testovanie mikrometódy izolácie DNA z listov, plodov a výrobkov z ovocia. Pre analýzu rastlinnej DNA v technologicky spracovaných potravinách boli vybraté džemy. Listy, plody a džemy boli homogenizované s použitím plastového kopistu v lyzačnom roztoku s 2% cetyltrimetylammonium bromidom (CTAB) s prídavkom 2,5M chloridu sodného (NaCl). Homogenáty boli použité pre izoláciu rastlinnej DNA metódou založenej na magnetických časticách. Boli použité magnetické mikročastice poly(hydroxyethylmethakrylát-co-glycidylmethakrylát) – P(HEMA-co-GMA). Izolovaná DNA bola podrobená spektrofotometrickej analýze, kde bola zisťovaná jej koncentrácia a čistota. Následne bola testovaná amplifikovateľnosť rastlinnej DNA v polymerázovej reťazovej reakcii (PCR). Použité boli špecifické priméry pre rastlinnú ribozomálnu DNA - 18S_for a 5,8S_rev (produkt PCR - 700bp), 26S_for a 26S_rev (produkt PCR - 220 bp), 18S_for a 18S_rev (produkt PCR - 263 bp). Boli optimalizované podmienky PCR a bol sledovaný vplyv dĺžky amplikónu na jeho detekciu. Produkty PCR boli detegované pomocou agarózovej gélovej elektroforézy. Bolo zistené, že z väčšiny listov je možné pomocou zvolených magnetických nosičov izolovať DNA v kvalite vhodnej pre PCR, na rozdiel od plodov. Z väčšiny testovaných džemov bola izolovaná DNA, ktorá sa amplifikovala v PCR s priméry dávajúcimi krátke produkty PCR. Metódu je treba ďalej optimalizovať.

ABSTRACT

The thesis has been focused on testing of micromethod of DNA isolation from leaves, fruits and fruit products. Jams were selected for the analysis of plant DNA in technologically processed foods. Plant leaves, fruits, and jams were homogenized using plastic copist in a lysis buffer containing 2% cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) with 2.5M sodium chloride (NaCl). Microisolation of plant DNA was performed using poly(hydroxyethylmethacrylate-co-glycidylmethacrylate) – P(HEMA-co-GMA)microparticles. Isolated the DNA concentration and purity were assessed by UV light absorbance using a spectrophotometer. After that, amplification of the DNA was tested in PCR. Primers specific for plant ribosomal DNA: 18S_for a 5,8S_rev (PCR product - 700bp), 26S_for a 26S_rev (PCR product - 220 bp), 18S_for a 18S_rev (PCR product - 263 bp) were used. The PCR conditions were optimized and the effect of the amplicon length on its detection was followed. PCR products were detected by agarose gel electrophoresis. It was shown that DNA isolated from almost all of leaves using magnetic particles was in PCR-ready quality in contrary to the fruits. DNA amplified in PCR with primers giving short PCR products was isolated from almost all tested jams. The method must be optimised, yet.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

izolácia DNA, listy, plody, vysoko upravené potraviny, džemy, magnetické mikročastice, PCR

KEY WORDS

isolation of DNA, leaves, fruit, highly processed food products, jams, magnetic microparticles, PCR

BALAŽOVIČOVÁ, Nikola. *Testování mikrometody izolace DNA z listů, plodů a výrobků z ovoce*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/115216>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Aleš Kovařík.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemické VUT v Brně a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

..... podpis študenta

POĎAKOVANIE

Touto cestou by som sa chcela poďakovať pánovi RNDr. Alešovi Kovaříkovi, CSc a doc. RNDr. Aleně Španové, CSc. za odborné vedenie, poskytnutie cenných rád, ochotu a v neposlednom rade za cenný čas, ktorý mi venovali pri spracovávaní tejto práce. Poďakovanie patrí aj mojej rodine za ich podporu počas celej doby štúdia.

OBSAH

ÚVOD	8
I. TEORETICKÁ ČASŤ	9
1. Vybrané druhy ovocia a výrobkov z ovocia	9
1.1 Džemy	9
1.2 Bobuľové ovocie	9
1.3 Nebobuľové ovocie	10
2 . Izolácia rastlinnej DNA.....	10
2.1 Faktory ovplyvňujúce izoláciu rastlinnej DNA.....	10
2.2 Látky kontaminujúce DNA	11
2.2.1 Polysacharidy	11
2.2.2 Polyfenoly.....	11
2.2.3 Proteíny.....	12
3. Magnetické mikročastice	12
3.1 Zloženie magnetických mikročastíc	12
3.2 Magnetická separácia	13
3.3 Magnetické mikročastice P(HEMA-coGMA).....	14
4. Polymerázová reťazová reakcia.....	14
4.1 Princíp polymerázovej reťazovej reakcie	14
4.1.2 Špecifické rastlinné priméry	15
5. CIELE PRÁCE.....	17
II. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	18
6. Materiál a metódy	18
6.1 Rastlinné materiály.....	18
6.1.1 Listy a plody ovocia	18
6.1.2 Džemy.....	19
6.2 Chemikálie	20
6.2.1 Komponenty pre PCR.....	21
6.2.2 Magnetické častice	21
6.3 Prístroje	21
6.4 Roztoky	22
6.5 Príprava homogenátov v pufru s CTAB.....	22
6.5.1 Príprava homogenátov s použitím kopistu	22
6.5.2 Homogenáty s prídavkom chloroform-oktanolu	23
6.5.3 Prezrážanie DNA v homogenáte isopropanolom	23
6.5.4 Prezrážanie DNA ethanolom	23

6.6	Príprava separačnej zmesi a izolácia DNA magnetickými časticami.....	23
6.7	Spektrofotometrické stanovenie DNA	24
6.8	Príprava zmesí pre PCR, podmienky amplifikácie a detekcia produktov PCR.....	24
6.8.1	Príprava zmesí s rôznymi polymerázami.....	24
6.8.2	Podmienky amplifikácie	26
6.8.3	Špecifické primery.....	27
6.8.4	Detekcia produktov PCR.....	27
7.	VÝSLEDKY.....	28
7.1	Spracovanie vzoriek	28
7.1.1	Spracovanie listov	28
7.1.2	Spracovanie plodov	28
7.1.3	Spracovanie džemov.....	28
7.2	Izolácia DNA z homogenátov magnetickými časticami P(HEMA-co-GMA).....	29
7.2.1	Izolácia DNA z listov	29
7.2.1.1	Prečistenie a zakoncentrovanie DNA	30
7.2.2	Izolácia DNA z plodov	31
7.2.3	Izolácia DNA z džemov	33
7.2.3.1	Prečistenie a zakoncentrovanie DNA	33
7.2.4	Izolácia DNA z džemu z čiernych ríbezlí so zrnčkami a bez zrnčiek	34
7.2.5	Porovnanie množstva DNA izolovaného z listov, plodov a džemov	35
7.3	Testovanie amplifikácie kontrolnej DNA	37
7.3.1	Testovanie rôzneho množstva Taq DNA polymerázy (5U/μL)	37
7.3.2	Testovanie rôznej koncentrácie DNA a LA polymerázy (5U/ μL)	38
7.3.3	Testovanie DNA polymerázy v SYTO-9 master mixu.....	39
7.3.4	Testovanie rôznej koncentrácie Fast Taq polymerázy a ďalších primérov	40
7.3.4	Overenie intaktosti kontrolnej DNA.....	41
7.4	Amplifikácia rastlinnej DNA v PCR.....	42
7.4.1	Amplifikácia DNA izolovanej z listov	42
7.4.2	Amplifikácia DNA izolovaná z plodov	44
7.4.3	Amplifikácia DNA izolovaná z džemov	45
7.4.3.1	Primery pre 700 bp	46
7.4.3.2	Primery pre 263 bp	47
7.4.3.3	Primery na 220 bp	48
7.4.3.4	Zhrnutie amplifikácie DNA izolovanej z analyzovaných vzoriek DNA	49
8.	DISKUSIA.....	50
8.1	Príprava homogenátov.....	50
8.2	Izolácia DNA z homogenátov magnetickými časticami P(HEMA-co-GMA).....	50

8.3 Spektrofotometrické stanovenie DNA	51
8.4 Amplifikácia DNA v PCR a detekcia produktov	51
8.4.1 Porovnanie sekvencií 18S rDNA <i>Nicotiana tabacum</i> (tabak) a <i>Rubus idaeus</i> (Ostružina malinová / Maliník obecný).....	52
ZÁVER.....	53
ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV	54
ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	60

ÚVOD

S narastajúcimi trendami v oblasti falšovania potravín narastá aj potreba použitia rýchlych, spoľahlivých a kompetentných metód k riešeniu problémov autenticity. Pre odhalenie falšovania a detekcie pravosti v potravinách a poľnohospodárskych komoditách sa používa rada fyzikálnych a analytických metód [1]. Metódy založené na analýze DNA, ako napríklad polymerázová reťazová reakcia (PCR), predstavujú užitočný nástroj k identifikácii zloženia potravín rastlinného pôvodu [2]. DNA zo spracovaných potravín sa kvalitou aj množstvom mení v závislosti od použitého protokolu. Neexistuje univerzálna, použiteľná metóda, ktorá by umožňovala izoláciu dostatočne čistej DNA.

Vzorky rastlín sú všeobecne charakterizované komplexnou kompozíciou obsahujúcou rôzne inhibitory PCR. Existuje mnoho faktorov ako je zdrojový materiál a spracovanie, typ tkaniva a vek, skladovanie, homogenizácia ale i prítomnosť kontaminantov, ktoré ovplyvňujú metodológiu izolácie DNA. V súvislosti s extrakciou rastlinnej DNA sa v praxi dobre osvedčila metóda založená na báze cetyltrimetylammonium bromidu (CTAB) v kombinácii s prídavkom chloridu sodného (NaCl) a ďalších látok [3, 4]. Roztok CTAB vytvára spolu s nukleovými kyselinami komplexy, ktorých rozpustnosť závisí od koncentrácie NaCl. Na základe rozdielnej rozpustnosti CTAB v porovnaní s DNA, ju je možné oddeliť a tak získať dostatočne čistú rastlinnú vzorku. Okrem uvedeného postupu na odstránenie kontaminantov zo vzorky izolovanej DNA využívame aj ďalšie chemikálie. V prípade odstránenia polyfenolov používame antioxidačné látky ako je polyvinylpyrolidón (PVP) alebo β -merkptoethanol. Na prečistenie vzorky DNA od proteínov využívame denaturačné činidlá ako sú laurylsíran sodný (SDS) alebo organické rozpúšťadlá ako sú fenol a chloroform. Veľmi využívaná je aj kombinácia chloroformu a fenolu – tzv. fenolchloroformová extrakcia [5].

Izolácia nukleových kyselín je dôležitým nástrojom v oblasti molekulárnej biológie. Pred použitím moderných technológií bola separácia DNA časovo a prácne náročná. Magnetická separácia je novo vznikajúca metóda, ktorá využíva magnetizmus na účinné oddeľovanie para- a feromagnetických častíc veľkosti mikrometra s naviazanou DNA od chemických alebo biologických suspenzií. V kombinácii s vhodným pufrom umožňujú rýchle a účinné prečistenie vzorky. Magnetická separácia má oproti druhým metódam značné výhody ako je možná izolácia DNA priamo zo surovej vzorky (napr. homogenátu) alebo takmer žiadne obmedzenia z hľadiska objemu vzorky. Vzhľadom na možnosť nastavenia magnetických vlastností pevných materiálov je ich možné relatívne ľahko odstrániť aj z viskózných suspenzií vzoriek [6].

I. TEORETICKÁ ČASŤ

1. Vybrané druhy ovocia a výrobkov z ovocia

1.1 Džemy

S rýchlym rozvojom a globalizáciou medzinárodného trhu s potravinami sa stáva kontrola kvality potravín prioritnou. Je potrebné overiť, či bol spotrebiteľ správne informovaný o pôvode a zložení dostupných výrobkov. V oblasti kvality a bezpečnosti potravín sú okrem fyzikálnych a chemických metód bežne používané aj metódy založené na analýze DNA ako je polymerázová reťazová reakcia [7]. Ovocné džemy sú často predmetom falšovania. Definície a požiadavky na džemy sú stanovené právnymi predpismi (Smernica Rady 2001/113/ES z 20. decembra 2001 - vzťahujúca sa na ovocné džemy, rôsoly a marmelády a sladené gaštanové pyrė určené na ľudskú spotrebu; US FDA Code of Federal Regulations). Ovocné džemy sú zvyčajne definované ako zmes cukrov, pyrė jedného alebo viacerých druhov ovocia a vody; navyše môžu obsahovať pridané konzervačné látky, farbivá a arómy. Táto zmes je ďalej prevedená do vhodnej rôsolovitej konzistencie. Džem je vyrobený z jedného alebo viac druhov ovocia, ktorého minimálny obsah je všeobecne stanovený na 350 g/kg džemu. Pri niektorých druhoch ovocia ako sú napríklad ríbezle je obsah spracovaného ovocia znížený na hodnotu 250g ovocia / kg džemu. Džemy rozdelujeme do kategórií: džem výberový (Extra), džem výberový (Extra) špeciálny, džem výberový (Extra) menej sladký [8].

Ovocné plody sú z uvedených prísad najdrahšie a preto sú najčastejšie predmetom falšovania a nahrádzajú sa lacnejšími zložkami (alternatívne ovocie, rastlinná hmota, cukor) alebo umelými prísadami [9].

1.2 Bobuľové ovocie

V posledných desaťročiach sa neustále zvyšuje popularita a záujem o výskum všetkých druhov ovocia. Obzvlášť dobre študované sú ovocné bobule, pretože obsahujú najlepšie dietetické zdroje bioaktívnych zlúčenín (BAC - BioActive Compounds). K druhom, ktoré obsahujú najviac BAC patria členovia viacerých rodín, ako sú *Rosaceae* (jahody, maliny, černice) a *Ericaceae* (čučoriedky, brusnice). Majú lahodnú chuť a vôňu, ekonomický význam a vzhľadom na ich antioxidantné vlastnosti vyvolávajú veľký záujem u výživových a potravinárskych technológov a to vďaka možnosti používať BAC ako funkčné zložky potravín. Bioaktívne zlúčeniny v bobuliach obsahujú hlavne fenolové zlúčeniny (fenolové kyseliny, flavonoidy - ako sú antokyany, flavonoly a taníny) a kyselinu askorbovú. Tieto zlúčeniny, buď jednotlivito alebo v kombinácii, sú zodpovedné za rôzne zdravotné prínosy plodov, ako je prevencia zápalových ochorení, kardiovaskulárnych chorôb alebo ochranných účinkov na zníženie rizika rôznych typov rakoviny [10].

K významným zástupcom bobuľových rastlín patria aj čierne ríbezle. Vlastnosti čiernych ríbezlí sú odvodené od ich biochemických zložiek, z ktorých niektoré zahŕňajú antokyány (konkrétne delphinidín-3-O-glukozid, delphinidín-3-O-rutinozid, kyanidín-3-O-glukozid a kyanidín), kyseliny a polynenasýtené mastné kyseliny. Vďaka týmto vlastnostiam našli široké uplatnenie v súvislosti s terapeutickými aplikáciami [11].

1.3 Nebobul'ové ovocie

Najviac konzumovaným ovocím v Európe je jablko (EFSA, 2011). Zloženie živín jablák je dobre známe [12]. Jeho najcharakteristickejšími sekundárnymi metabolitmi sú floridizín (fluoretín 2'-O-glukozid) a floretín 2'-O-xyloglukozid, zatiaľ čo ostatné polyfenoly ako epikatechín, proantokyandíny a kyselina chlorogénna sú prevládajúce, ale bežné pre mnohé iné zdroje potravy - ovocie, ako sú bobule, zelený a čierny čaj, káva).

Ďalším hojne konzumovaným ovocím v mnohých častiach zeme je marhuľa. Celková svetová produkcia marhúľ je 2,6 milióna ton ročne [13]. Plody obsahujú rôznu úroveň fytochemikálií ako sú vitamíny, karotenoidy a polyfenoly, ktoré významne prispievajú k ich chuti, farbe a výživovej hodnote. Čerstvé marhule sú dobrým zdrojom antioxidantov ako je kyselina chlorogenová, kyselina neochlorogenová, kyselina kávová, kyselina p-kumarová, kyselina ferulová, β -karoten a γ -karoten [14]. Semená marhúľ majú omnoho vyššiu antioxidačnú aktivitu a vyšší obsah fenolov v porovnaní s dužinou plodu [15].

Väčšina bioaktívnych zložiek v potravinách pochádza z rastlín; tie, ktoré sú takto odvodené, sa kolektívne nazývajú fytochemikálie. Veľká väčšina týchto fytochemikálií sú redoxne aktívne molekuly a preto sú definované ako antioxidanty. Potraviny na báze rastlín majú vo všeobecnosti vyšší antioxidačný obsah ako živočíšne alebo zmiešané potravinárske výrobky [16].

2. Izolácia rastlinnej DNA

Druh zdrojového materiálu je pre izoláciu rastlinnej DNA kľúčový. Metóda PCR je náchylná vzhľadom na inhibujúce látky, ktoré sa môžu nachádzať v analyzovanej vzorke DNA a ktoré môžu ovplyvniť citlivosť tejto metódy. Inhibitory PCR sú heterogénnou skupinou látok, ktoré pôsobia v rôznych fázach diagnostického postupu. Sú prítomné vo veľkom množstve typov vzoriek a dokonca môžu viesť falošne negatívnym výsledkom [17].

2.1 Faktory ovplyvňujúce izoláciu rastlinnej DNA

Izolácia DNA v dobrej kvalite z tkanív / buniek predstavuje rad problémov, najmä ak sa ako východiskový materiál používajú rastliny. Špecifické charakteristiky rastlín, ako je prítomnosť tuhej polysacharidovej bunkovej steny, pigmenty, chemická heterogenita sekundárnych metabolitov nájdených v rôznych druhoch rastlín atď., vyžadujú osobitnú pozornosť a zručnosť počas izolácie. O priebehu izolačného postupu rozhodujú rôzne faktory od výberu východiskového materiálu po koncentráciu metabolitov prítomných v rastline. Na tento účel boli doteraz zverejnené mnohé protokoly, ale žiadne z nich sa nepovažuje za všeobecne použiteľný [5]. Základná procedúra izolácie genómovej DNA z rôznych eukaryotických buniek zahŕňa tri základné kroky: (1) odstránenie bunkových membrán (u rastlinného materiálu aj bunkovej steny), (2) oddelenie DNA od všetkých ostatných bunkových komponentov (bunkové organely a metabolické látky) a (3) udržiavanie integrity DNA počas postupu t.j., ochrana pred degradáciou nukleázami [18].

Jeden z faktorov, ktoré výrazne ovplyvňuje kvalitu a výťažok izolovanej DNA je vek a druh zdrojového materiálu. Čerstvé mladé listy sú považované za dobrý zdroj DNA z hľadiska kvality a množstva a to vďaka veľkému počtu buniek, nižšiemu ukladaniu škrobu a menšej prítomnosti sekundárnych metabolitov [3].

Základný prvok, ktorý sa zohľadňuje v procese izolácie DNA je správna manipulácia a skladovanie rastlinného materiálu po jeho odobratí. Pri extrakcii DNA sa rastlinný materiál zvyčajne zbiera čerstvý a priamo sa spracováva [19] alebo je uchovávaný v teplote od -18°C do -80°C [20] alebo sa použije tekutý dusík na okamžité zmrazenie vzorky tesne pred jej spracovaním [21].

Rastliny majú tuhú polysacharidovú bunkovú stenu, čo je jedným z dôvodov, prečo je izolácia rastlinnej DNA pomerne zložitá. Homogenizáciu a spracovanie rastlinných vzoriek môžeme previesť fyzikálnymi ale i chemickými metódami. Chemické metódy sú oproti fyzikálnym drahšie ale zahŕňajú širšiu škálu možností. Chemické disruptory zahŕňajú hlavne hydrolyzujúce enzýmy ako sú celulózy a pektinázy, ktoré rozpúšťajú bunkovú stenu [22].

2.2 Látky kontaminujúce DNA

Najčastejším problémom pri postupoch izolácie DNA je prítomnosť kontaminantov vo vzorkách. Patria sem zlúčeniny ako sú napríklad RNA a proteíny, polysacharidy, polyfenoly a iné sekundárne metabolity. Podľa rôznych druhov látok prítomných spolu s DNA sa musia navrhovať aj rôzne druhy protokolov [23].

2.2.1 Polysacharidy

Polysacharidy predstavujú najzložitejšiu skupinu sacharidov. Sú tvorené z desiat a viac monosacharidových jednotiek, ktoré sú navzájom pospájané glykozidovými väzbami. Polysacharidy sa prirodzene vyskytujú v rastlinných bunkách ako súčasť ich bunkovej steny. Podľa ich funkcie v bunke rozdeľujeme polysacharidy na zásobné, štruktúrne a ochranné. Medzi najvýznamnejšie rastlinné polysacharidy patrí škrob, celulóza, hemicelulóza a pektíny.

Patria k hlavným kontaminantom DNA, pretože sú ťažko detekovateľné a odstrániteľné. Spolu s DNA vytvárajú viskózne komplexy. Vhodným spôsobom ako odstrániť polysacharidy zo vzorky DNA je použitie vysokej koncentrácie (viac ako 0,5 M) chloridu sodného (NaCl), ktorý zvyšuje ich rozpustnosť v ethanole. Koncentrácia NaCl sa mení v závislosti od druhu zdroja rastlín [24]. Roztok NaCl v kombinácii s kationovým detergentom CTAB sa ukázal ako vysoko prospešný pri izolácii DNA z rastlín bohatých na sacharidy. V prostredí s nízkou iónovou silou a pri vysokej koncentrácii solí, pôsobí CTAB ako selektívne činidlo, ktoré uvoľňuje nukleové kyseliny z komplexu tvoreného proteínmi a polysacharidmi. Ďalej má schopnosť tvoriť komplex s DNA pričom jeho rozpustnosť je ovplyvnená koncentráciou NaCl. Komplex je rozpustný pri koncentrácii 0,7M NaCl ale pri zníženej koncentrácii 0,45M NaCl vytvára zrazeninu [4].

2.2.2 Polyfenoly

Polyfenolické látky sú také látky, ktoré vo svojom jadre obsahujú dve a viac hydroxylových skupín naviazaných na aromatickom jadre. Polyfenoly možno rozdeliť na fenolové kyseliny, flavonoidy, stilbeny a lignany. V ľudskom organizme vykazujú polyfenolické zlúčeniny širokú škálu biologických účinkov [25].

Polyfenolické látky sú rozšírené a veľmi problematické kontaminanty. Polyvinylpyrolidón (PVP) a polyvinylpolypyrolidón (PVPP) sú najčastejšie používané chemikálie na elimináciu polyfenolov,

pretože pôsobia ako ich adsorbenty. PVP a PVPP vytvárajú spolu s polyfenolickými zlúčeninami prostredníctvom vodíkových väzieb komplexy, pričom sa polyfenoly uvoľňujú od DNA [26]. Ďalšou často používanou látkou na elimináciu polyfenolov vo vzorkách je β -merkptoethanol, ktorý zabraňuje polymerizácii tanínov. Taníny bránia izolácii DNA podobným spôsobom ako polysacharidy [5].

2.2.3 Proteíny

Proteíny klasifikujeme ako polyméry aminokyselín. Tieto vysokomolekulárne prírodné látky sa skladajú z lineárnych reťazcov a bežne obsahujú sto a viac aminokyselín. Molekulová hmotnosť proteínov sa pohybuje rádovo medzi $1 \cdot 10^4$ a $1 \cdot 10^6$ Da.

Proteíny je možné zo vzoriek odstrániť rôznymi spôsobmi. Vo všeobecnosti sa odstraňujú chemikáliami ako sú laurylsíran sodný (SDS), dithiothreitol (DTT) alebo β -merkptoethanol, ktoré rozrušujú ich priestorovú organizáciu. Okrem uvedených denaturačných činidiel môžu byť k tomuto účelu využité aj enzýmy ako je proteínáza K. Tieto hydrolytické enzýmy narušajú peptidové väzby a rýchlo inaktivujú DNázy a RNázy v bunkových lyzátach, čo uľahčuje izoláciu DNA s vysokou molekulovou hmotnosťou. Medzi bežné spôsoby odstraňovania proteínov patrí ich extrakcia organickými rozpúšťadlami ako sú fenol alebo chloroform. Hlavnou nevýhodou používania týchto rozpúšťadiel sú ich toxické a žieravé vlastnosti a tiež značná strata DNA počas priebehu celého procesu [5]. Veľmi využívaná je aj tzv. fenol-chloroformová extrakcia.

3. Magnetické mikročastice

Magnetické častice boli prvýkrát použité v roku 1970 vo farmaceutickom priemysle ako súčasť perorálne podávaného liečiva [27, 28]. Avšak značný pokrok vývoja technológií magnetických nosičov sa dosiahol až v posledných rokoch.

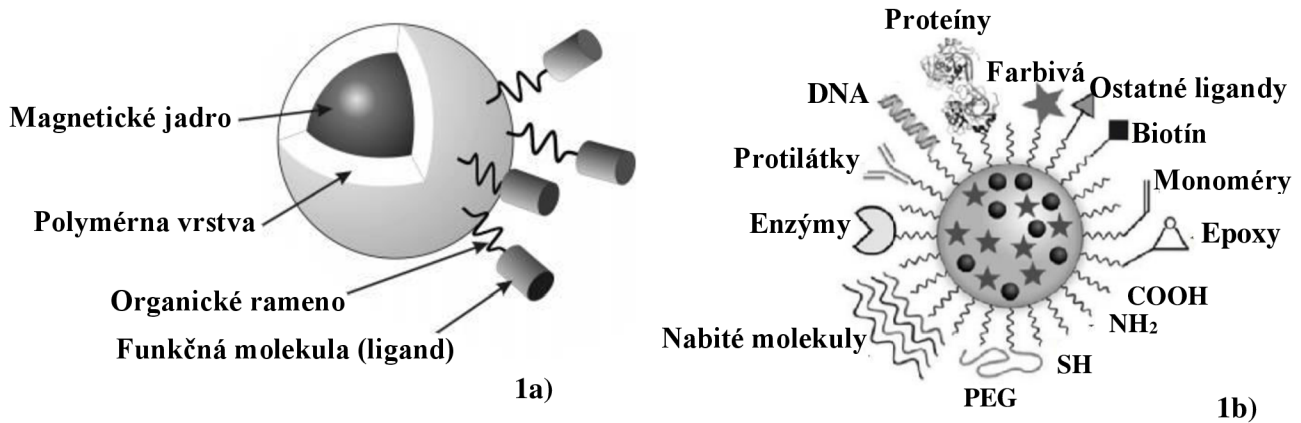
Termín "magnetický" znamená, že nosič získava magnetický moment, keď je umiestnený v magnetickom poli. Častice s magnetickým momentom sa môžu ľahko odstrániť aplikáciou magnetického poľa, napr. pomocou permanentného magnetu. V procese izolácie sa využívajú magnetické nosiče s imobilizovanými afinitnými ligandami alebo nosiče vyrobené z polymérov vykazujúcich afinitu k cieľovej nukleovej kyseline. Mnohé magnetické nosiče sú komerčne dostupné alebo sa môžu vyrobiť priamo v laboratóriu. Môžu to byť častice vyrobené z rôznych syntetických polymérov (biopolyméry, porézne sklo) alebo častice na báze anorganických magnetických materiálov ako je povrchovo modifikovaný oxid železa. Obzvlášť vhodné sú superparamagnetické častice, ktoré pri absencii magnetického poľa navzájom neinteragujú. Tieto častice sa budú magnetizovať pod vplyvom silného magnetického poľa, ale po jeho odstránení sa v nich nebude vykazovať žiadny trvalý magnetizmus [6,29,30,31].

3.1 Zloženie magnetických mikročastíc

Magnetické častice sa skladajú z magnetického jadra, ochrannej vrstvy a funkčného povrchu (viď obrázok 1a) [32]. Jadro magnetických častíc je vyrobené z oxidov železa a to najmä magnetit (FeOFe_2O_3 , resp. Fe_3O_4) a maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) [33]. Aby došlo k ochrane analytu pred stykom s kovom je jadro obalené tenkou ochrannou vrstvou, ktorú najčastejšie tvoria polyméry (polystyrén, polyakrylové deriváty), organické kyseliny, prírodné sacharidy či rôzne anorganické matrice. Výhodou tejto zložky

je, že je diamagnetická a môže byť funkcionalizovaná (viď obrázok 1b) rôznymi skupinami (amínové, karboxylové, thiolové, hydroxylové) či inými látkami (biotín, protilátky, enzýmy) v závislosti na cieľovej molekule, ktorá má byť izolovaná [34].

Priemer magnetických častíc je približne medzi 0,5 a 10 μm . Z hľadiska väzby nukleových kyselín sú vhodné najmä materiály s veľkým povrchom, ktoré napomáhajú k tomu, aby sa DNA lepšie obalila okolo nosiča. Monodisperzné častice majú tú výhodu, že poskytujú veľmi jednotnú reprodukovateľnosť magnetickej separácie [6].



Obrázok 1a): Schéma magnetickej častice [32].

1b): Možnosti funkcionalizácie magnetickej častice [34].

3.2 Magnetická separácia

Proces izolácie DNA z analyzovaných vzoriek je neoddeliteľnou súčasťou viacstupňovej identifikačnej procedúry. Separácia nukleových kyselín pomocou magnetických častíc sa skladá z viacerých dôležitých krokov (viď obrázok 2). Prvým krokom izolácie DNA je naviazanie DNA na magnetické častice v separačnej zmesi. K väzbe nukleových kyselín na nosič s karboxylovými skupinami dochádza v prostredí s vysokou koncentráciou chloridu sodného (NaCl) a polyethylenglykolu (PEG 6000). Magnetický komplex je následne oddelený pomocou magnetického separátora a supernatant je odstránený. Ďalej je tento komplex niekoľko krát prepláchnutý premývacím pufrom aby došlo k odstráneniu nežiadúcich látok, ktoré by mohli inhibovať PCR. Posledným krokom je odseparovanie magnetických častíc pomocou magnetického separátora a elúcia čistej DNA do TE pufu [6,35].



Obrázok 2: Izolácia nukleových kyselín pomocou magnetických častíc [6].

3.3 Magnetické mikročastice P(HEMA-coGMA)

Mikročastice môžu byť vyrobené z veľkého množstva východiskových materiálov, prírodných aj syntetických, a to rôznymi technikami prípravy. Oba východiskové materiály a spôsoby prípravy umožňujú prípravu obrovského množstva mikročastíc rôzneho rozloženia veľkosti, kompozície, zloženia povrchovej chémie, topografie a morfológie [36].

Bežne používanou funkcionalizáciou povrchov častíc je zavedenie karboxylových skupín. Magnetické mikrogulôčky P(HEMA-co-GMA) predstavujú hydrofilné magnetické neporézne mikrosféry poly(2-hydroxyetylmetakrylát-co-glycidylmetakrylát) - P(HEMA-co-GMA) pokryté karboxylovými skupinami. Tieto magnetické mikročastice sa môžu vyrobiť jednostupňovou disperznou kopolymerizáciou HEMA s GMA za prítomnosti koloidného magnetitu stabilizovaného kyselinou olejovou [37,38].

4. Polymerázová reťazová reakcia

Polymerázová reťazová reakcia (PCR) je molekulárno diagnostická metóda, ktorú objavil Dr. Carl Mullis [39] v roku 1983. Za tento objav mu bola v roku 1993 pridelená Nobelová cena za chémiu [40].

4.1 Princíp polymerázovej reťazovej reakcie

Podstatou PCR je cyklicky sa opakujúca enzýmová syntéza vybraných úsekov DNA v smere 5' → 3' pomocou DNA polymerázy. PCR môže produkovať až 10^9 kópií špecifickej DNA alebo cDNA sekvencií v jednoduchom trojstupňovom procese, ktorý pozostáva z denaturácie, hybridizácie a syntézy nových reťazcov DNA. Tento proces denaturácie, hybridizácie a syntézy sa opakovane dodržiava aby sa dosiahlo veľkého množstva amplifikovanej DNA požadovanej veľkosti. Keďže sa počas PCR kopírujú obe vlákna, dochádza tak k exponenciálnemu zvýšeniu počtu kópií – počet cyklov (n) určuje koľko kópií (2^n) je nasynetizovaných. Finálnym krokom je terminácia, kedy sa všetky procesy, ktoré

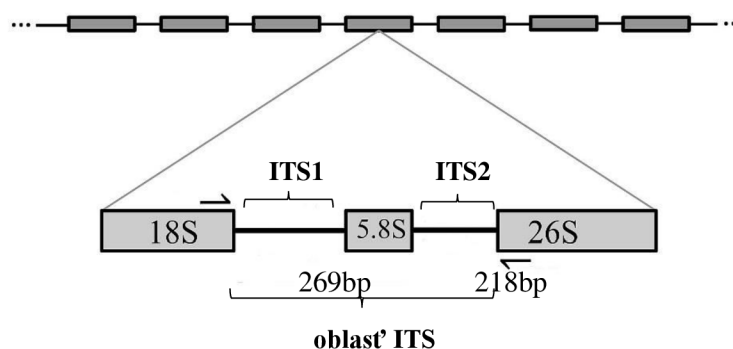
prebiehajú v reakčnej zmesi PCR ukončia. Všeobecne dochádza k poklesu teploty 72°C na 4°C. Produkt generovaný PCR sa ďalej môže detekovať použitím rôznych analyzačných metód. [41- 46].

4.1.2 Špecifické rastlinné priméry

Gény pre ribozomálnu DNA (rDNA) sú prítomné vo všetkých bunkách od baktérií až po človeka. Z evolučného hľadiska sú tieto gény vysoko konzervované. Obsahujú veľmi konzervované úseky, ktoré sa striedajú s veľmi variabilnými úsekmi. Konzervované úseky sa využívajú k detekcii génov na chromozómoch pomocou hybridizačných metód a variabilné úseky sa využívajú k zisteniu fylogenézy [47]. Na molekulárnej úrovni sa rDNA vyznačuje konzervatívnymi sekvenciami a univerzálnou sekundárnou štruktúrou niektorých oblastí 18S a 28S rDNA [48]. V rastlinách s kvasinkách sa nachádza 35S rDNA (obsahuje gény pre 18S, 5.8S a 26S rRNA), u živočíchov je to 45S rDNA (18S, 5.8S a 28S rRNA) [49].

Gény pre rRNA sú usporiadané do tandemov (tandemových repetícií), pričom rámcový počet repetícií býva charakteristický pre daný druh [50]. Variabilné počty rRNA génov kódujúcich 18S-5.8S-26S RNA sa vyskytujú v rôznych rastlinných druhoch (medzi 1000 a 50 000 génmi) [51]. U krytosemenných rastlín sa lokus 35S rDNA skladá z jednotiek dlhých 9-20 kb, ktoré sa opakujú mnoho tisíckrát a nachádza sa na jednom alebo viacerých lokusoch na chromozómoch. Jednotka 35S sa skladá z oblasti génov pre 18S- 5.8S-26S RNA dlhé asi 5 kb a medzigenového medzerníka (IGS), ktorý je veľmi variabilný. Jednotka 5S rDNA je oveľa kratšia. Nahosemenné rastliny majú vo všeobecnosti vyšší počet kópií génov rDNA [49].

Eukaryotická rRNA sa prepisuje ako jedna dlhšia RNA, ktorá v sebe obsahuje úseky pre 3 molekuly rRNA- 18S rRNA, 5.8S rRNA a 28S rRNA, ktoré sú oddelené sekvenciami ITS-1 a ITS-2 (internally transcribed spacer) (viď obrázok 3) [52]. Po vyštípení oblasti ITS sa na ribozóm používajú práve tieto tri molekuly, ktoré sú evolučne veľmi konzervované, čiže sa v nich nájde len minimum zámien i pri porovnávaní dvoch vzdialených druhov. To umožňuje navrhnúť priméry do týchto sekvencií tak, že budú fungovať pre mnoho rôznych druhov. Napriek tomu, univerzálnosť a špecifita PCR primérov pre oblasť ITS nie je až tak uspokojivá, čo má za následok ťažkosti s amplifikáciou a sekvenovaním [53].



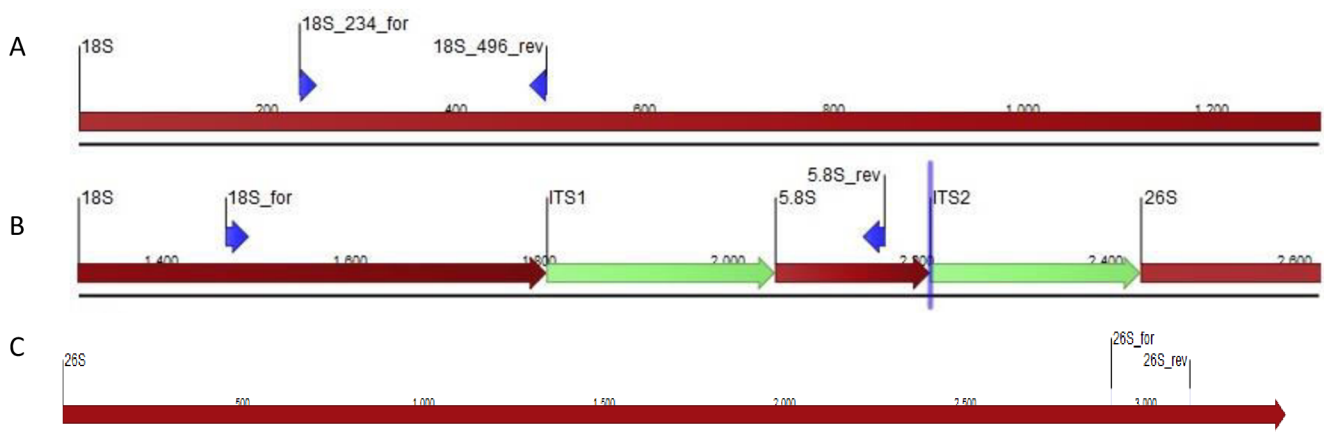
Obrázok 3: rDNA s vyznačením oblasti ITS [52].

4.1.2.1 Sekvencie vybraných rastlinných primérov

Konsenzuálne priméry sú také priméry, ktoré majú schopnosť amplifikovať cieľovú oblasť v širokej škále jedincov v určitej skupine organizmov. Pre rastliny sú takéto univerzálne priméry navrhnuté tak aby sa zamerali na oblasti v jadrovom, mitochondriálnom alebo chloroplastovom genóme [54].

Práve vďaka univerzálnosti a špecifite primérov pre oblasť ITS bolo navrhnutých veľké množstvo primérov. Priméry 18S_for (5'-GCGCTACACTGATGTATTCAACGAG-3') a 5.8S_rev (5' -CGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGA-3') umožňujúce amplifikovať úsek genómu o predpokládanej veľkosti produktu PCR 700 bp boli navrhnuté a použité pri skúmaní spoločnej evolúcie génov rRNA v populáciách *Tragopogon mirus* a *T. miscellus* [55]. Pre výskum štruktúry, intranukleárnej distribúcie a ribozomálnej aktivity DNA (rDNA) v *Nicotiana sylvestris* ($2n = 2x = 24$) a *N. tomentosiformis* v porovnaní s *N. tabacum* (tabak, $2n = 4x = 48$) boli navrhnuté a použité priméry 26Sfor (5'-GAATTCACCCAAGTGTTGGGAT-3') a 26Srev (5'-AGAGGCGTTCAGTCATAATC-3') umožňujúce amplifikovať úsek genómu o predpokládanej veľkosti produktu PCR 220 bp [56]. Obidve sady primérov (18S_for a 18S_rev, 26S_for a 26S_rev) zohrali dôležitú úlohu pri preukázaní DNA zo surovej zeleniny a spracovaných potravín rastlinného pôvodu pomocou magnetických mikročastíc [57].

Medzi novo nasyntetizované priméry patria aj priméry 18S_234_for (5'-GGCCCGTTGCTGCGATGATT-3'; pozícia v génu 234-252) a 18S_496_rev: (5'-AGAGCCCGGTATTGTTATT-3'; pozícia v génu 478-496). Predpokladaná veľkosť produktu PCR je 263 bp. Sekvencie, ku ktorým priméry nasadajú zodpovedá konsenzuálnej sekvencii 18 rDNA tabaku [58]. Sekvencie špecifických primérov pre amplifikáciu DNA sú uvedené na obrázku 4: 18S_234_for a 18S_496_rev (4A); 18S_for a 5,8_S (4B); 26Sfor a 26Srev (4C).



Obrázok 4: Pozície špecifických primérov pre amplifikáciu DNA. Zelenou farbou sú zvýraznené variabilné úseky ITS, hnedou konzervatívne gény pre 18S a 26S rRNA.

5. CIELE PRÁCE

Cieľom diplomovej práce bolo testovanie metódy mikroizolácie a detekcia DNA rastlinného pôvodu v ovocných listoch a plodoch a v technologicky opracovaných potravinách ako sú džemy. Boli optimalizované podmienky amplifikácie DNA pomocou PCR a sledovaný vplyv dĺžky amplikónu na jeho detekciu.

Riešená problematika spočíva v izolácii DNA v kvalite pre PCR z vybraných výrobkov z ovocia, ovocných listov a plodov mikrometódou založenej na magnetických časticiach.

Pri riešení úloh sa postupovalo nasledovne :

- homogenizácia ovocných listov, plodov a výrobkov pomocou plastového kopistu v pufru s CTAB
- izolácia DNA magnetickými časticami P(HEMA-co-GMA) s využitím magnetického separátoru
- spektrofotometrické stanovenie koncentrácie DNA
- overenie amplifikovateľnosti DNA pomocou PCR

II. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

6. Materiál a metódy

6.1 Rastlinné materiály

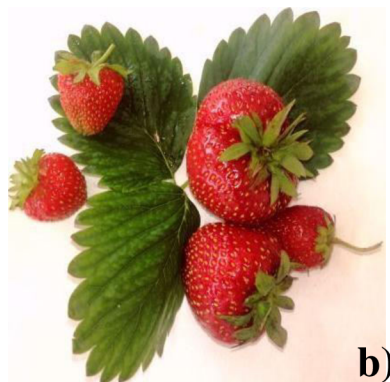
Zdrojom pre rastlinný materiál (ovocie) boli čerstvo natrhané plody a listy zo záhradky, džemy a maliny zakúpené v obchodných sieťach s výnimkou doma pripraveného marhuľového džemu.

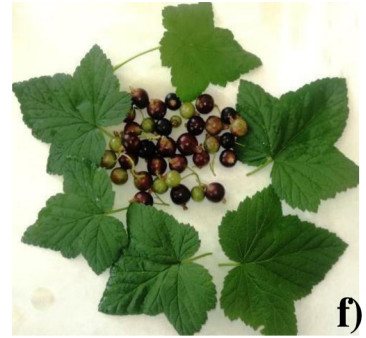
6.1.1 Listy a plody ovocia

Listy a plody použité k izolácii DNA sú uvedené v tabuľke 1a) a na obrázku 5 a). Boli spracované čerstvo natrhané – bez skladovania. Výnimku tvorilo jablko, ktoré pochádzalo z komerčnej siete a bolo skladované po neznámu dobu.

Tabuľka 1 a) : Ovocné listy a plody použité k izolácii rastlinnej DNA.

Názov rastliny slovensky	Názov rastliny latinsky	Názov rastliny anglicky	Názov plodu slovensky	Názov plodu anglicky
Čerešňa vtáčia	<i>Cerasus avium L.</i>	Cherry tree	Čerešňa	Cherry
Jahoda obyčajná	<i>Fragaria vesca L.</i>	European strawberry	Jahoda	Strawberry
Jabloň domáca	<i>Malus domestica L.</i>	Apple tree	Jablko	Apple
Ostružina malinová	<i>Rubus idaeus L.</i>	European raspberry	Malina	Raspberry
Marhuľa obyčajná	<i>Prunus armeniaca L.</i>	Armenian plum	Marhuľa	Plum
Ríbezľa čierna	<i>Ribes nigrum L.</i>	Blackcurrant	Ríbezľa	Blackcurrant





Obrázok 5 a) : Ovocné listy a plody použité pre izoláciu DNA.

a) čerešňa b) jahoda c) jablko d) malina e) marhuľa f) čierne ribezle

6.1.2 Džemy

Džemy použité pre izoláciu DNA sú uvedené na obrázku 5b) a ich zloženie je uvedené v tabuľke 1b).



a)



b)



c)



d)



e)



f)

Obrázok 5 b): Ovocné džemy použité pre izoláciu DNA.

a) čerešňový džem b) jahodový džem c) jablkovo-ribezľový džem d) malinový džem
e) domáci marhuľový džem f) ribezľový džem

Tabuľka 1b) : Zloženie obsahu džemov.

Názov džemu	Výrobca džemu	Zloženie džemu
Čerešňový	CASA DE MATEUS (Portugalsko)	čerešne, glukózo-fruktózový sirup, cukor, želatína (pektín) a regulátor kyslosti (kyselina citrónová)
Jahodový	CASA DE MATEUS (Portugalsko)	jahody, glukózo-fruktózový sirup, cukor, želatína (pektín) a regulátor kyslosti (kyselina citrónová)
Jablko-ríbežový	HAMÉ (Česko)	cukor, jablká (25% hmot.), ríbežle (20% hmot.), regulátor kyslosti, kyselina citrónová, želírujúca látka: pektín, koncentrát z čiernej mrkvi, stabilizátor: chlorid vápenatý
Malinový	Babičina špajza (Česko)	maliny, glukózo-fruktózový sirup, želatína (pektín) a regulátor kyslosti (kyselina citrónová), voda
Marhuľový	Domáci (Česko)	marhule, cukor a želírovací prípravok Quitin
Čierna ríbežľa	RELAX (Česko)	čierno-ríbežľová zložka 65,3% (čierna ríbežľa 76,5%, koncentrovaná šťava z čiernej ríbežle 23,5%), koncentrovaná jablková šťava (34,7%), zahusťovadlo: pektíny

6.2 Chemikálie

- Agaróza pre elektroforézu DNA (Top-Bio, Praha, ČR)
- Cetyl triethylamonium bromid (CTAB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- DNA štandard 100 bp ladder (MALAMITÉ, v.o.s., Moravské Prusy, ČR)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma, St. Louis, USA)
- Ethanol (Penta, Chrudim, ČR)
- Ethidium bromid (10 mg/mL) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Fluorescenčné farbivo Midori green (Ecoli, Bratislava, SR)
- Hydroxid sodný (Penta, Chrudim, ČR)
- Chlorid sodný (Penta, Chrudim, ČR)
- Chloroformoktanol (Penta, Chrudim, ČR)
- Isopropylalkohol (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Penta, Chrudim, ČR)
- Octan sodný (Penta, Chrudim, ČR)
- β -merkptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Polyethylenglykol 6000 (PEG 6000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris-báze) (Amresco, Solon, USA)

Všetky chemikálie boli v čistote p.a.

6.2.1 Komponenty pre PCR

- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- PCR reakčný pufr kompletný pre LA DNA polymerázu (5U/μL) (Top-Bio, Praha, ČR)
- PCR reakčný pufr kompletný pre Taq polymerázu (1U/μL) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Nanášací pufr Yellow load (6xkoncentrovaný) (Top-Bio, Praha, ČR)
- DMSO (10 mM) (Top-Bio, Praha, ČR) (PCR enhancer)
- DNA štandard (100 bp rebríček), obsahuje fragmenty DNA o veľikosti 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1 000, 1 200, 1 500 bp) (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- Zmes dNTP (10 mM) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery : 18S_for a 5,8S_rev (10 pmol/μl) (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)
26S_for a 26S_rev (10 pmol/μl) (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)
18S_234 for a 18S_496 rev (10 pmol/μl) (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)
- Taq DNA polymeráza (5U/μL) (Top-Bio, Praha, ČR)
- LA DNA polymeráza (5U/μL) (Top-Bio, Praha, ČR)
- EliZyme FAST Taq polymeráza (5U/μL) (ELISABETH PHARMACON, Brno, ČR)
- PCR reakčný pufr kompletný pre EliZyme FAST Taq polymerázu (ELISABETH PHARMACON, Brno, ČR)
- qPCR 2x SYTO-9 Master Mix (Top-Bio, Praha, ČR)
- PCR voda pre qPCR master Mix (Top-Bio, Praha, ČR)

6.2.2 Magnetické častice

Boli použité magnetické mikročastice poly(2-hydroxyethylmethakrylát-co-glycidylmethakrylát) - P(HEMA-co-GMA) (Ing. D. Horák, CSc., Akademie věd, Praha, ČR). Vlastnosti častíc sú uvedené v tabuľke 2.

Tabuľka 2: Vlastnosti magnetických častíc P(HEMA-co-GMA).

Vlastnosti		Jednotky
Obsah železa v jadre (Fe)	10,02	[%]
Priemer častíc (Dn)	2,23	[μm]
Priemerná hmotnosť (Dw)	2,24	[μg]
Index polydisperzity (PDI)	1,81	-
Funkčné skupiny -COOH	0,76	[mM g ⁻¹]

6.3 Prístroje

- Centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
- Eppendorfove skúmavky (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
- Laboratórne váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New Jersey, USA)
- Magnetický separátor Dynal (Oslo, Nórsko)
- Mikrovlnná rúra PROLINE SM117 (SENCOR, ČR)
- Mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Varšava, Polsko)
- NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA)

- PCR box UVC/T-AR, DNA/RNA, UV-cleaner box (bioSan, Riga, Litva)
- Pipety automatické 1 000 µl, 200 µl, 20 µl, 10 µl
- Thermal cycler DNA Engine (BIO-RAD Lab., USA)
- Thermocycler Minicycler™ (BIO-RAD Lab., USA)
- Thermo shaker TS-100C (Biosan, Riga, LV)
- Thermocycler MJ RESEARCH (WATERTOWN, MA)
- Transilluminátor TVR- 3121 (Spectroline, Albany, USA)
- Zariadenie pre elektroforézu (OWL Buffer Puffer™, Loughborough, UK)
- Zdroj elektrického napätia pre elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA)

6.4 Roztoky

- 0,5 M EDTA (186,1 g EDTA, 800 ml destilovanej vody, NaOH pre úpravu pH na 8,0)
- 1 M Tris-HCl (Tris-báza 121 g, 80 ml destilovanej vody, koncentrovaná HCl pre úpravu pH na 7,8)
- 5xTBE pufr (54 g Tris-báza, 27,5 g kyseliny borité, 600 ml destilovanej vody, 20ml 0,5M EDTA (pH 8,0)). Pred použitím bol 10x nariedený.
- Lyzační roztok s CTAB s 1,5 M NaCl (CTAB 1 g, 10 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 8), 16 ml 5 M NaCl, 2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), 42 ml destilovanej vody)
- Lyzační roztok s CTAB s 2,5 M NaCl (1 ml 5 M NaCl, 4 ml CTAB s 1,5 M NaCl) a tesne pred použitím bolo pridaný 0,2% 2-merkaptóethanol (1-2µl/1 ml pufru))
- TE pufr pH 7,8 (1 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,8), 200 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 98,8 ml destilovanej vody)
- Zmes chloroform-oktanol (chloroform a oktanol v pomere 24:1)
- 70% ethanol (70 ml 96% ethanolu a 26 ml destilované vody)
- Roztok chloridu sodného (5 M) (87,66 g NaCl rozpustený v 300 ml destilovanej vode)
- Roztok 40% polyethylénglykolu 6000 (40 g PEG 6000 rozpustený v 60 ml destilovanej vody. Objem bol doplnený do 100 ml destilovanej vody).

6.5 Príprava homogenátov v pufru s CTAB

6.5.1 Príprava homogenátov s použitím kopistu

Pri prevádzaní homogenácie rastlinného materiálu v pufru s CTAB sa postupovalo podľa nasledujúcich bodov:

1. Do 1,5 mL eppendorfky sa sterilne navážilo 0,1 g prípadne 0,2g rastlinnej vzorky (nakrájanej na drobné kúsky sterilným skalpelom).
2. K naváženej vzorke sa pridalo 500 µL lyzačného roztoku s CTAB s 2,5M NaCl a 1 µL merkaptóethanolu (0,2 %).
3. Pomocou plastového kopistu vo vymrazenom bločku bola prevedená homogenizácia.
4. Zhomogenizovaná vzorka sa inkubovala po dobu 30 minút pri teplote 60 °C.
5. Po inkubácii bola prevedená centrifugácia po dobu 10 minút pri otáčkach 14500 ot./min.
6. Do čistej eppendorfovej skúmavky bola odpipetovaná vrchná fáza obsahujúca DNA.

6.5.2 Homogenáty s prídavkom chloroform-oktanolu

Po inkubácii zhomogenizovanej vzorky bol pridaný roztok chloroform-oktanolu (24:1) o objeme 500 μL . Obsah skúmavky sa kývavým pohybom premiešaval 4 minúty. Nasledovala centrifugácia po dobu 10 minút pri otáčkach 14 500/min. Supernatant obsahujúci DNA sa odobral do čistých skúmaviek a bol použitý pre izoláciu DNA magnetickými časticami.

6.5.3 Prezrážanie DNA v homogenáte isopropanolom

Po homogenácii s prídavkom chloroform-oktanolu sa odobraný supernatant prezrážal isopropanolom v nasledujúcich krokoch :

1. Zmerial sa objem supernatantu v eppendorfovej skúmavke a pridala sa 0,6 objemu isopropanolu.
2. Obsah sa premiešal kývavým pohybom, 4 minúty.
3. Centrifugácia po dobu 5 min, pri 14500 ot/min.
4. DNA je v sedimentu, supernatant odstránime. Pridáme 70% ethanol, 500 μL (2x250 μL).
5. Centrifugácia po dobu 5 min, pri 14500 ot/min.
6. DNA je v sedimentu, supernatant sa odstránil a v exikátore sa vysušil zvyšný obsah isopropanolu – približne 10 minút.
7. DNA sa eluovala do TE pufru (100 μL).

6.5.4 Prezrážanie DNA ethanolom

1. Pomocou automatickej pipety sa zmerial objem vzorky DNA a celkový objem sa upravil TE pufrom na 400 μL .
2. K vzorke DNA sa pridala 1/20 objemu 3M octanu sodného (20 μL). Obsah skúmavky sa premiešal.
3. Pridal sa 1 mL (2,5 násobok objemu) 96% ethanolu vychladeného na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následne sa zmes premiešala.
4. DNA sa zrážala vo vymrazenej doske pri teplote $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 minút.
5. Zmes sa centrifugovala pri 14 500 ot/min po dobu 15 minút. Supernatant sa opatrne odlial. Ďalej sa pracovalo so sedimentom, ktorý sa opláchol 70 % ethanolom (500 μL) a zmes sa znova centrifugovala pri 14 500 ot/min po dobu 15 minút.
6. Sediment sa usušil v exikátore (približne 10 minút).
7. DNA sa rozpustila v 100 μL TE pufru (pH= 7,8)

6.6 Príprava separačnej zmesi a izolácia DNA magnetickými časticami

Izolácia rastlinnej DNA z homogenátov v CTAB pufru s 2,5 M NaCl bola prevedená pomocou magnetických častíc P(HEMA-co-GMA) s využitím magnetického separátora. Pri príprave separačnej zmesi sa postupovalo podľa diplomovej práce Tereza Surá, 2017/2018 . Zloženie a príprava separačnej zmesi sú popísané v tabuľke 3:

Tabuľka 3: *Separáčna zmes (250 µl) pre izoláciu DNA z homogenátu s 2,5M NaCl [59].*

Por.	Zložky	Objem (µL)
1.	Homogenát s 2,5 M NaCl	175
2.	40% PEG	50
3.	Magnetické častice (2 mg/ml)	25
	Výsledný objem	250

Po zmiešaní zložiek v uvedenom poradí sa separáčna zmes inkubovala po dobu 30 minút pri teplote 25 °C v termomixéri. Po inkubácii bola prevedená separácia nosičov s naviazanou DNA na magnete. Zmes sa separovala 15 minút a následne sa odpipetoval supernatant. Magnetické mikročastice sa premyli 500 µL (2x 250 µL) 70% ethanolom. Po minúte bol supernatant odobraný a zvyšný ethanol sa nechal odpariť. Rastlinná DNA bola eluovaná do 100 µL TE pufru (pH = 7,8). Po 30 minútach boli častice odseparované na magnetickom separátore a eluát obsahujúci DNA bol odobraný do čistých eppendorfových skúmaviek pre spektrofotometrické stanovenie a pre PCR.

6.7 Spektrofotometrické stanovenie DNA

Koncentrácia izolovanej DNA bola stanovená spektrofotometricky. Pomocou prístroja Nanophotometer boli odčítané hodnoty absorbancií pri vlnových dĺžkach 230 nm (absorpčné maximum fenolov), 260nm (absorpčné maximum nukleových kyselín) a 280 nm (absorpčné maximum proteínov). Ako referenčná vzorka bol použitý TE pufr, prípadne separáčna zmes bez DNA (slepá vzorka). Čistota DNA bola stanovená pomerom absorbancií 260/280 nm a 260/230 nm [60].

6.8 Príprava zmesí pre PCR, podmienky amplifikácie a detekcia produktov PCR

Pred prípravou zmesi boli všetky komponenty PCR premiešané a zcentrifugované. Pripravila sa zmes komponentov, tzv. Master mix. Master mix sa pripravil zmiešaním jednotlivých reakčných komponentov vynásobeným počtom vzoriek a kontrol. Ďalej bola prevedená amplifikácia podľa daných podmienok.

6.8.1 Príprava zmesí s rôznymi polymerázami

Komponenty pre jednotlivé PCR boli zmiešané v nasledujúcom množstve podľa použitej DNA polymerázy a primérov (tabuľka 4 a, b, c).

Tabuľka 4 a) : PCR zmes pre LA DNA polymerázu a Taq polymerázu (5U/μL).

		DNA polymeráza/ Priméry/ Veľkosť produktov PCR	
		LA DNA polymeráza (5U/μL)	Taq polymeráza (5U/μL)
Por.	Komponenty	18S_for , 5.8S_rev (700 bp)	18S_for , 5.8S_rev (700 bp)
		26S_for, 26S_rev (220 bp)	26S_for, 26S_rev (220 bp)
		Objem (μl)	Objem (μl)
1.	Voda pre PCR	18,3	18,3
2.	Reakčný pufoer kompletný 10x	2,5	2,5
3.	DMSO	0,5	0,5
4.	Zmes dNTP (10 mM)	0,5	0,5
5.	1. Primer (10 pmol/μl)	0,5	0,5
6.	2. Primer (10 pmol/μl)	0,5	0,5
7.	LA DNA polymeráza (5U/μl)	0,2	0,2
8.	DNA matrica (10ng/μl)	2,0	2,0
Celkom		25,0	25,0

Tabuľka 4 b): PCR zmes pre termostabilnú polymerázu v SYTO-9 master mixu.

		Priméry/ Veľkosť produktov PCR	
		1.primer - 18S_for 2.primer - 5.8S_rev 700 bp	1.primer - 26S_for 2.primer - 26S_rev 220 bp
Por.	Komponenty	Objem (μl)	Objem (μl)
1.	Voda pre Master Mix	8,5	8,5
2.	qPCR 2x SYTO-9 Master Mix s DNA polymerázou	12,5	12,5
3.	1. Primer (10 pmol/μl)	1,0	1,0
4.	2. Primer (10 pmol/μl)	1,0	1,0
5.	DNA matrica (10ng/μl)	2,0	2,0
Celkom		25,0	25,0

Tabuľka 4 c) : PCR zmes pre FAST Taq DNA polymerázu (5U/μL).

		Priméry/ Veľkosť produktov PCR	
Por.	Komponenty	1.primér - 18S_for 2.primér – 18S_rev 263 bp	1.primér - 18S_for 2.primér - 5.8S_rev 700 bp
		Objem (μl)	Objem (μl)
1.	Voda pre PCR	21,50	21,50
2.	Reakčný pufor kompletný	2,50	2,50
3.	Zmes dNTP (10 mM)	0,20	0,20
4.	MgCl ₂	0,50	0,50
5.	1. Primer (10 pmol/μl)	0,15	0,15
6.	2. Primer (10 pmol/μl)	0,15	0,15
7.	Fast Taq polymeráza	0,50	0,50
8.	DNA matrica (10ng/ μl)	1,00	1,00
Celkom		26,50	26,50

6.8.2 Podmienky amplifikácie

Amplifikácia bola prevedená podľa programu 700RO35 alebo 700/200/RO40 a podľa programu Its-1.

Tabuľka 5 a): Podmienky amplifikácie pre programy 700RO35, 700/200/RO40.

		Program	
Kroky	Teplota	700RO35	700/200RO40
1.	95 °C	34 x krok 2 - 4	39 x krok 2 - 4
2.	95 °C		
3.	52 °C		
4.	72 °C		
5.	Go to step 2		
6.	72 °C		
7.	10 °C		

Tabuľka 5 b): Podmienky amplifikácie pre program *Its-1*.

Kroky	Teplota	Doba (m:s)	Go to
1.	92 °C	03:00	
2.	92 °C	00:20	
3.	57 °C	00:20	
4.	72 °C	00:30	39x krok 2-4
5.	72 °C	05:00	
6.	16 °C	∞	

6.8.3 Špecifické primery

Pre PCR zmes boli použité primery 18S_for a 5.8S_rev produkt PCR predpokladanej dĺžky 700bp, 26S_for a 26S_rev (220 bp) a 18S_234_for a 18S_496_rev (263 bp). Sekvencie primerov sú uvedené v tabuľke 6. Všetky komponenty vhodné pre PCR boli pred použitím rozmrazené, premiešané a zcentrifugované. Ako pozitívna kontrola bola použitá DNA *N.tabacum* a *B. oleacea* (10 ng/μl, Dr. Kovařík, Csc) a ako negatívna kontrola bola použitá PCR zmes bez prídania DNA.

Tabuľka 6: Špecifické priméry.

Primery	Sekvencie primerov (5' - 3')	Veľkosť produktu PCR	Citácia
18S_for	GCG CTA CAC TGA TGT ATT CAA CGA G	700 bp	[55]
5.8S_rev	CGC AAC TTG CGT TCA AAG ACT CGA		
26S_for	GAA TTC ACC CAA GTG TTG GGA T	220 bp	[56]
26S_rev	AGA GGC GTT CAG TCA TAA TC		
18S_234_for	GGC CCG TTG CTG CGA TGA TT	263 bp	[58]
18S_496_rev	AGA GCC CGG TAT TGT TAT T		

6.8.4 Detekcia produktov PCR

Produkty PCR boli detegované pomocou gélovej agarózovej elektroforézy (1,2% v 0,5x TBE pufru s prídavkom 1 μl fluorescenčného farbiva Midori Green). Bol použitý štandard 100 bp rebríček s fragmentami DNA. Štandard obsahoval fragmenty DNA dĺžky 1500 bp, 1200 bp, 1000 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp a 100bp.

Elektroforéza prebiehala pri napätí 60V po dobu približne 2 hodiny. Produkt PCR bol pozorovaný na transiluminátore v UV svetle a zdokumentovaný fotograficky.

7. VÝSLEDKY

7.1 Spracovanie vzoriek

Homogenáty boli pripravené z rastlinných vzoriek ovocných listov, plodov a výrobkov z ovocia – džemov. Postup prípravy homogenátov je uvedený v nasledujúcich kapitolách a zdokumentovaný na obrázku 6.

7.1.1 Spracovanie listov

Pre prípravu homogenátov z listov ovocných stromov a kerov bolo použitých 100 mg vzorky pre každý druh ovocia.

Listy boli pred navážením dostatočne upravené – premyté destilovanou vodou, ošetrené ethanolom a nadrobno nakrájané sterilným skalpelom. Homogenácia bola prevedená podľa kapitoly 6.5.1. Homogenáty boli prečistené chloroform-oktanolom podľa postupu uvedeného v kapitole 6.5.2 a prezrážané ethanolom, podľa postupu v kapitole 6.5.4.

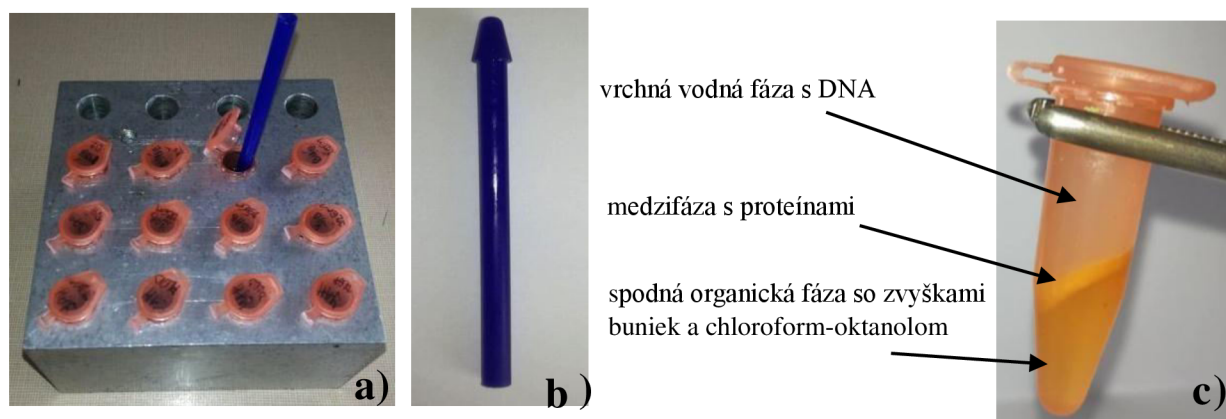
7.1.2 Spracovanie plodov

Pre prípravu homogenátov z plodov ovocia bolo použitých 100 mg vzorky pre každý druh ovocia. Vzorky boli pred navážením dostatočne upravené – premyté destilovanou vodou, ošetrené ethanolom a nadrobno nakrájané. Pred homogenáciou bola vzorka roztláčená v roztieradle. Homogenácia bola prevedená podľa kapitoly 6.5.1. Homogenáty boli prečistené chloroform-oktanolom podľa postupu uvedeného v kapitole 6.5.2 a prezrážané ethanolom podľa postupu v kapitole 6.5.4.

7.1.3 Spracovanie džemov

Pre prípravu homogenátov z džemov, bolo použitých 200 mg vzorky pre každý výrobok. Homogenácia bola prevedená podľa postupu v kapitole 6.5.1. Homogenáty boli prečistené chloroform-oktanolom podľa postupu uvedeného v kapitole 6.5.2 a prezrážané isopropanolom podľa postupu v kapitole 6.5.3 alebo ethanolom, podľa postupu v kapitole 6.5.4.

Použitie kopistu pri príprave homogenátov je demonštrované na obrázku 6 a), b), c). Po zcentrifugovaní homogenátu s prídavkom chloroform-oktanolu sa v eppendorfovej skúmavke vytvorili 3 časti, z ktorých vrchná fáza obsahujúca DNA bola odobraná (obrázok 6c) a použitá pre izoláciu DNA magnetickými časticami.



Obrázok 6:

a) vymrazený bloček s eppendorfovými skúmavkami

b) kopist

c) homogenát s pufrom s CTAB a s prídavkom chloroform-oktanolu; rozdelenie fází po centrifugácii

Prečistené homogenáty boli použité pre izoláciu DNA.

7.2 Izolácia DNA z homogenátov magnetickými mikročasticami P(HEMA-co-GMA)

Rastlinná DNA sa izolovala pomocou mikročastíc P(HEMA-co-GMA). Pri izolácii sa postupovalo podľa kapitoly 6.6. Pri izolácii bolo použitých 175 μ L homogenátu prečistených chloroform-oktanolom. DNA bola eluovaná do 100 μ L TE pufru. Koncentrácia DNA bola stanovená spektrofotometricky. Izolácia bola prevedená v 4 opakovaníach. Vzhľadom k tomu, že DNA bola izolovaná v malých koncentráciách, boli vzorky spojené, DNA bola prečistená chloroform-oktanolom a zakonzentrovaná ethanolom podľa postupu v kapitole 6.5.2 a kapitole 6.5.4.

7.2.1 Izolácia DNA z listov

DNA sa izolovala z listov zo 6 druhov ovocia v 4 opakovaníach. Výsledky sú uvedené v tabuľke 7.

Tabuľka 7: Hodnoty spektrometricky nameraných koncentrácií DNA izolovaných z listov v 4 opakovaníach (bez prezrážania).

	DNA - List	Koncentrácia (ng/ μ L)	A 260/280	A 260/230	Celkové množstvo DNA (ng)
1	Marhuľa 1	0,50	-	3,63	50
2	2	0,30	0,55	0,03	30
3	3	1,60	-	0,32	160
4	4	0,90	2,88	0,12	90
5	Čerešňa 1	2,00	1,31	4,52	200
6	2	2,00	1,35	0,76	200
7	3	2,10	1,31	1,27	210

8	4	2,80	1,21	1,64	280
9	Jablko 1	0,90	2,61	0,23	90
10	2	1,20	1,00	0,22	120
11	3	14,0	1,10	0,92	140
12	4	3,00	1,31	3,19	300
13	Jahoda 1	3,60	1,31	0,59	360
14	2	0,60	0,64	0,07	60
15	3	0,20	0,84	0,12	20
16	4	0,30	0,74	0,09	30
17	Malina 1	0,00	-	-	-
18	2	0,60	1,05	0,18	60
19	3	0,20	0,44	0,05	20
20	4	0,30	0,78	0,03	30
21	Ríbezľa 1	8,10	1,47	0,66	810
22	2	4,50	1,45	0,99	450
23	3	5,20	1,53	1,30	520
24	4	6,00	1,39	0,63	600

DNA z listov bola izolovaná v malých koncentráciách. V priemere zo 4 opakovaní: marhuľa 0,83 ng/ μ L; čerešňa 2,23 ng/ μ L; jablko 4,78 ng/ μ L; jahoda 1,18 ng/ μ L; malina 0,37 ng/ μ L; ríbezľa 5,95 ng/ μ L.

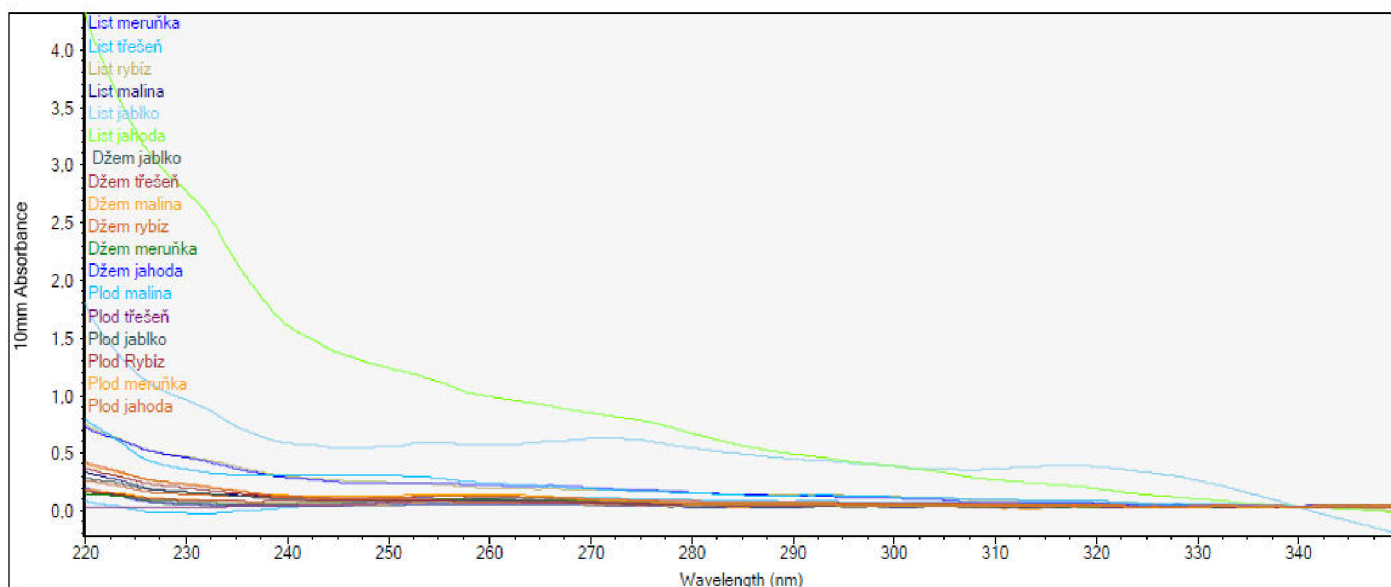
7.2.1.1 Prečistenie a zakoncentrovanie DNA

Vzorky DNA boli spojené a zakoncentrované prezrážaním ethanolom podľa kapitoly 6.5.4. Výsledky sú uvedené v tabuľke 8. Hodnoty závislosti absorpcie na vlnovej dĺžke sú znázornené na grafe 1.

Tabuľka 8: Hodnoty koncentrácií DNA izolovanej z listov (po prečistení a zakoncentrovaní ethanolom).

	DNA - List	Koncentrácia (ng/ μ L)	A 260/280	A 260/230	Celkové množstvo DNA (ng)
1	Marhuľa	2,00	1,40	0,54	200
2	Čerešňa	4,40	1,45	0,46	440
3	Jablko	8,00	1,57	0,70	800
4	Jahoda	2,90	1,41	1,16	290
5	Malina	3,40	1,33	0,46	340
6	Ríbezle	1,80	1,46	0,60	180

Graf 1: Závislosť absorpcie na vlnovej dĺžke DNA z listov, plodov a džemov po prežrážaní ethanolom z tabuliek (8, 10 a 12). Meranie oproti TE pufru.



DNA po prežrážaní ethanolom bola izolovaná v koncentráciách od 1,80 po 8,00 ng/μL v závislosti na druhu listu. DNA bola znečistená (hodnoty absorpcie A 260/280 od 1,33 po 1,57 a A 260/230 od 0,46 po 1,16).

Koncentrácie DNA izolovaných z listov vzhľadom na najvyššie hodnoty sú nasledovné: jablko > čerešňa > malina > jahoda > marhuľa > ríbezle.

7.2.2 Izolácia DNA z plodov

DNA sa izolovala zo 6 rôznych druhov plodov v 4 opakovaníach. Koncentrácia izolovanej DNA je uvedená v tabuľke 9.

Tabuľka 9: Hodnoty spektrometricky nameraných koncentrácií DNA izolovaných z plodov (bez prežrážania).

	DNA – Plod	Koncentrácia (ng/μL)	A 260/280	A 260/230	Celkové množstvo DNA (ng)
1	Marhuľa 1	6,50	1,48	0,59	650
2	2	1,20	1,04	0,78	120
3	3	8,70	1,57	0,50	870
4	4	1,60	0,99	0,58	160
5	Čerešňa 1	5,20	2,48	0,47	520
6	2	0,20	0,55	0,24	20
7	3	1,60	2,64	1,58	160

8	4	2,80	1,63	1,70	280
9	Jablko 1	0,30	-	2,75	30
10	2	0,40	3,97	0,29	40
11	3	0,40	1,37	0,43	40
12	4	0,20	0,49	0,10	20
13	Jahoda 1	2,70	1,88	0,58	270
14	2	2,10	2,37	0,62	210
15	3	4,50	1,71	0,44	450
16	4	5,10	1,51	0,55	510
17	Malina 1	1,00	2,58	0,55	100
18	2	3,10	1,49	0,46	310
19	3	0,60	1,72	0,31	60
20	4	0,50	-	3,10	50
21	Ríbežľa 1	4,20	1,51	0,60	420
22	2	0,90	-	0,48	90
23	3	2,70	1,78	0,40	270
24	4	1,70	2,37	0,55	170

DNA z plodov bola izolovaná v malých koncentráciách. V priemere zo 4 opakovaní: marhuľa 3,18 ng/ μ L, čerešňa 1,35 ng/ μ L; jablko 0,35 ng/ μ L ; jahoda 3,60 ng/ μ L; malina 1,30 ng/ μ L; ríbezle 2,38 ng/ μ L. DNA bola znečistená.

7.2.2.1 Prečistenie a zakoncentrovanie DNA

Vzorky DNA boli spojené a zakoncentrované prezrážaním ethanolom podľa kapitoly 6.5.4. Výsledky sú uvedené v tabuľke 10. Hodnoty závislosti absorbancie na vlnovej dĺžke sú znázornené na grafe 1.

Tabuľka 10: Hodnoty koncentrácií DNA izolovanej z plodov (po prečistení a zakoncentrovaní ethanolom).

	DNA- Plod	Koncentrácia (ng/ μ L)	A 260/280	A 260/230	Celkové množstvo DNA (ng)
1	Marhuľa	8,20	1,69	0,95	820
2	Čerešňa	2,50	1,41	0,43	250
3	Jablko	0,90	5,05	0,77	90
4	Jahoda	8,40	1,69	0,71	840
5	Malina	0,60	4,52	1,08	60
6	Ríbezle	2,30	1,85	0,48	230

DNA po prezrážaní bola izolovaná v koncentráciách od 0,60 po 8,40 ng/ μ L v závislosti na druhu plodu. DNA bola znečistená (hodnoty absorbancie v rozmedzí A_{260/280} od 1,41 po 5,05 a A_{260/230} od 0,43 po 1,08).

Koncentrácie DNA izolovaných z plodov vzhľadom na najvyššie hodnoty:

jahoda > marhuľa > čerešňa > ríbezle > jablko > malina.

7.2.3 Izolácia DNA z džemov

DNA sa izolovala zo 6 rôznych druhov džemov v 4 opakovaníach. Koncentrácia izolovanej DNA je uvedená v tabuľke 11.

Tabuľka 11: Hodnoty spektrometricky nameraných koncentrácií DNA izolovaných z džemov (bez prezrážania).

	DNA - Džem	Koncentrácia (ng/ μ L)	A 260/280	A 260/230	Celkové množstvo DNA (ng)
1	Marhuľa 1	3,10	1,76	0,43	310
2	2	3,00	1,44	0,72	300
3	3	3,40	1,70	0,74	340
4	4	4,40	1,55	0,62	440
5	Čerešňa 1	8,00	1,53	0,45	800
6	2	4,40	1,81	0,48	440
7	3	3,30	1,47	0,66	330
8	4	4,10	1,72	0,43	410
9	Jablko 1	1,40	2,88	0,55	140
10	2	2,50	1,77	0,45	250
11	3	0,90	2,31	1,19	90
12	4	2,60	1,68	0,45	260
13	Jahoda 1	2,70	1,37	0,60	270
14	2	3,20	1,25	0,49	320
15	3	3,10	1,46	0,62	310
16	4	5,60	1,38	0,43	560
17	Malina 1	3,70	1,44	0,65	370
18	2	3,60	1,71	0,56	360
19	3	2,70	1,66	0,56	270
20	4	4,10	1,72	0,50	410
21	Ríbezľa 1	2,40	1,75	0,44	240
22	2	2,10	1,31	0,49	210
23	3	2,40	1,50	0,44	240
24	4	0,90	1,98	0,245	90

DNA z džemov bola izolovaná v malých koncentráciách. V priemere zo 4 opakovaní: marhuľa 3,48 ng/ μ L, čerešňa 4,95 ng/ μ L; jablko 1,85 ng/ μ L; jahoda 3,65 ng/ μ L; malina 3,53 ng/ μ L; ríbezle 1,95 ng/ μ L. DNA bola znečistená.

7.2.3.1 Prečistenie a zakoncentrovanie DNA

Vzorky DNA boli spojené a zakoncentrované prezrážaním ethanolom podľa kapitoly 6.5.4. Výsledky sú uvedené v tabuľke 12. Hodnoty závislosti absorpcie na vlnovej dĺžke sú znázornené na grafe 1.

Tabuľka 12: Hodnoty koncentrácií DNA izolovanej z džemov (po prečistení a zakonzentrovaní ethanolom).

	DNA - Džem	Koncentrácia (ng/μL)	A 260/280	A 260/230	Celkové množstvo DNA (ng)
1	Marhuľa	5,10	1,64	0,66	510
2	Čerešňa	2,10	1,67	0,46	210
3	Jablko	2,30	1,55	0,57	230
4	Jahoda	2,70	1,42	0,51	270
5	Malina	6,00	1,51	0,49	600
6	Ríbezle	4,10	1,46	0,35	410

DNA po prezrážaní bola izolovaná v koncentráciách od 2,10 po 6,00 ng/μL v závislosti na druhu džemu. DNA bola znečistená (hodnoty absorbancie v rozmedzí A 260/280 od 1,42 po 1,67 a A 260/230 od 0,35 po 0,66).

Koncentrácie DNA izolovaných z džemov vzhľadom na najvyššie hodnoty:
malina > marhuľa > ríbezle > jahoda > jablko > čerešňa.

7.2.4 Izolácia DNA z džemu z čiernych ríbezlí so zrníčkami a bez zrníčok

V džemu čiernych ríbezlí (Relax) boli zreteľné časti obsahujúce zrníčka (semená) a časti, ktoré ich neobsahovali. Za účelom porovnania množstva izolovanej DNA bol prevedený nasledujúci experiment.

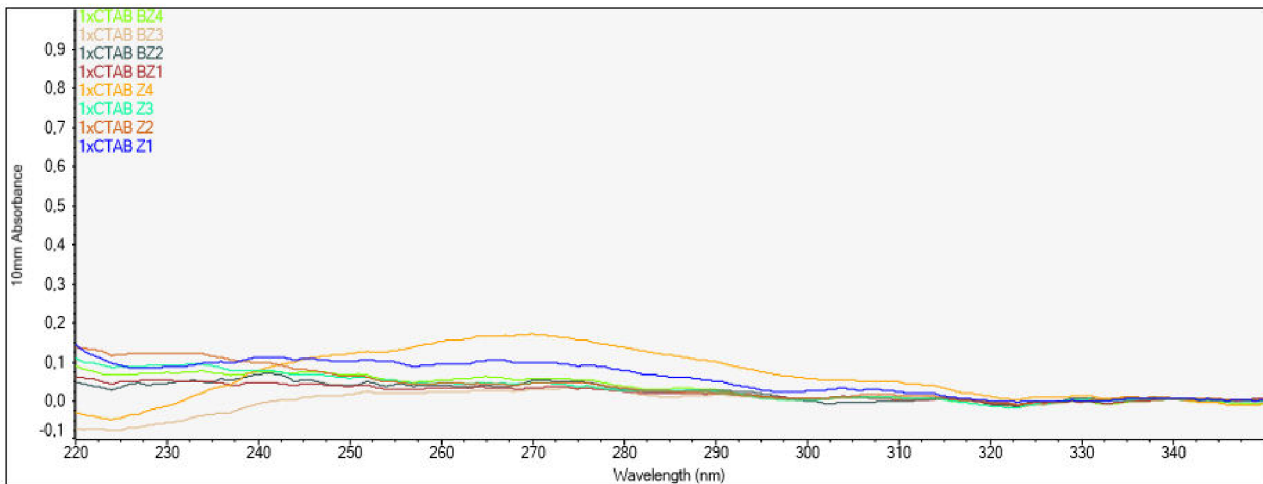
DNA bola izolovaná v 4 opakovaníach z džemu z čiernych ríbezlí so zrníčkami a bez zrníčok. Postupovalo sa podľa postupu 6.5.1 s výnimkou v bode 2, kde sa pridali 2μL merkptoethanolu. Homogenáty boli prečistené chloroform-oktanolom podľa kapitoly 6.5.2. Pri izolácii DNA sa postupovalo podľa kapitoly 6.6. Koncentrácie DNA sú uvedené v tabuľke 13. Závislosť absorbancie DNA na vlnovej dĺžke je uvedené v grafe 2.

Tabuľka 13: Hodnoty koncentrácií DNA izolovanej z džemu z čiernych ríbezlí (4 opakovania so zrníčkami a 4 opakovania bez zrníčok).

	DNA – Džem	Koncentrácia (ng/μL)	A 260/280	A 260/230	Celkové množstvo DNA (ng)
1	Z1	4,4	1,24	1,10	440
2	Z2	1,9	1,48	0,33	190
3	Z3	1,9	1,97	0,45	190
4	Z4	7,3	1,,1	-	730
5	BZ1	1,3	1,53	0,57	130
6	BZ2	1,7	1,44	0,88	170
7	BZ3	0,8	0,91	-	80
8	BZ4	2,4	1,58	0,74	240

Z- so zrníčkami ; BZ- bez zrníčok

Graf 2: Závislosť absorbancie na vlnovej dĺžke DNA z džemu z čiernych ríbezlí v 4 opakovaniach so zrníčkami a bez zrníčok. Meranie oproti TE pufru.

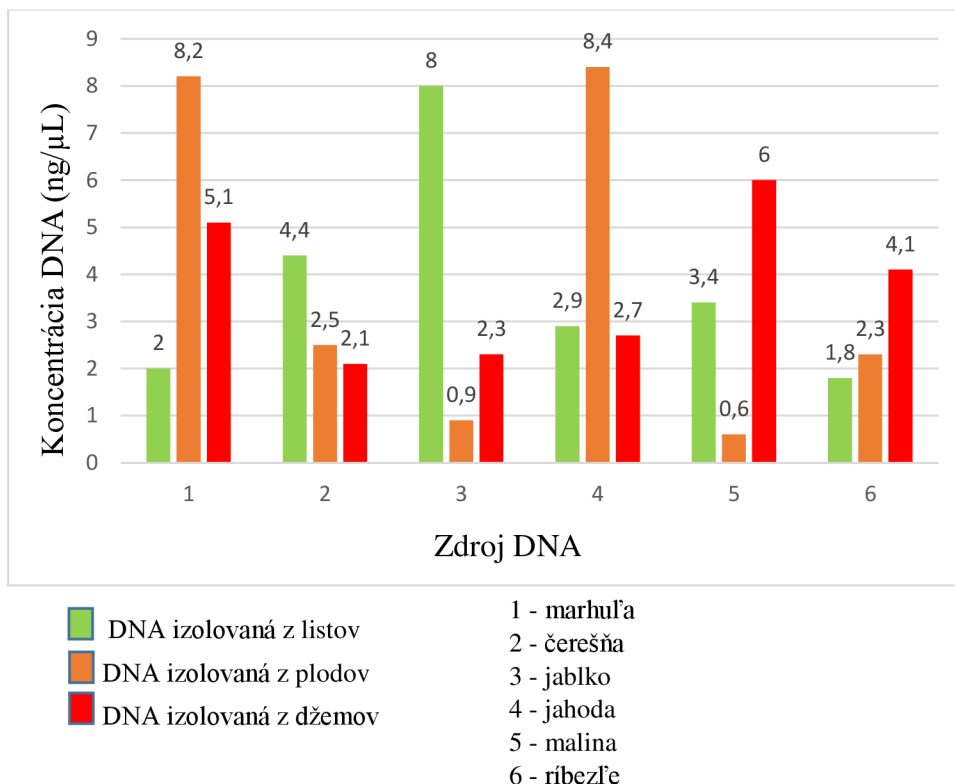


Z džemu z čiernych ríbezlí s obsahom zrníčok (semien) bolo izolované väčšie množstvo DNA (v priemere 3,9 ng/ μL) než z džemu bez obsahu zrníčok (v priemere 1,6 ng/ μL). DNA bola znečistená.

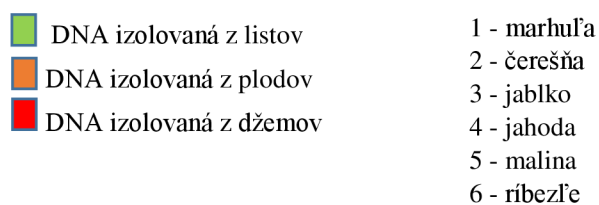
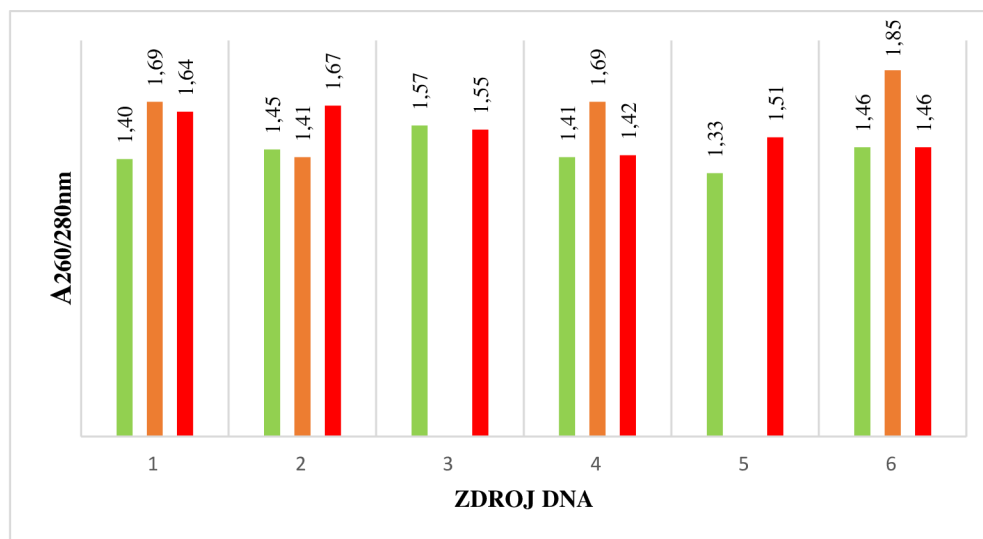
7.2.5 Porovnanie množstva DNA izolovaného z listov, plodov a džemov

Porovnanie množstva DNA izolovanej z listov, plodov a džemov po prečistení chloroform-oktanolom a zakonzentrovaní ethanolom je uvedená na grafe 3a) . Porovnanie kvality DNA z hľadiska znečistenia inhibujúcimi látkami sú uvedené v tabuľkách 3b) a 3c).

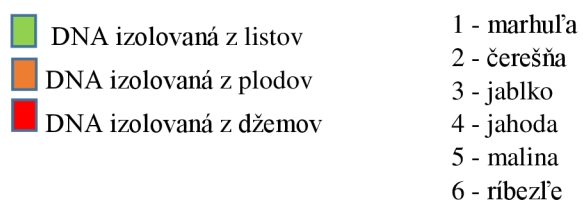
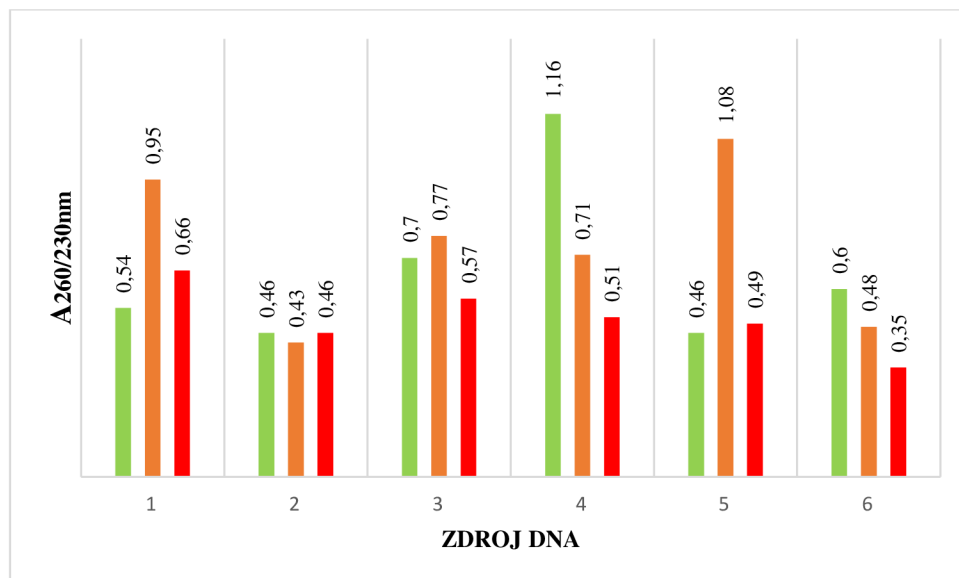
Graf 3a) : Porovnanie množstva DNA izolovanej z listov, plodov a džemov.



Graf 3 b): Porovnanie kvality DNA ($A_{260/280nm}$) izolovanej z listov, plodov a džemov.



Graf 3 c): Porovnanie kvality DNA ($A_{260/230nm}$) izolovanej z listov, plodov a džemov.



Z grafu 3a) môžeme vidieť, že DNA vyizolovaná z listov bola v najväčšom množstve u jablka; u plodov z jahody a u džemov z maliny. Poradie bolo nasledujúce:

- Listy: jablko > čerešňa > malina > jahoda > marhuľa > ríbezle
- Plody: jahoda > marhuľa > čerešňa > ríbezle > jablko > malina
- Džemy: malina > marhuľa > ríbezľa > jahoda > jablko > čerešňa

Z grafu 3b) môžeme usúdiť, že vyizolovaná DNA je znečistená proteínami v nasledujúcej intenzite.

- Listy: jablko > ríbezle > čerešňa > jahoda > marhuľa > malina
- Plody: ríbezle > jahoda = marhuľa > čerešňa
- Džemy: čerešňa > marhuľa > jablko > malina > ríbezle > jahoda

Očakávaný pomer hodnôt absorpcií pri vlnovej dĺžke 260 nm a 280 nm (A_{260nm}/A_{280nm}) by sa mal pohybovať v rozmedzí 1,8 až 2,0. Ak je tento pomer menší než 1,75 svedčí o prítomnosti kontaminujúcich bielkovín.

Z grafu 3c) je vidieť, že vyizolovaná DNA zo všetkých druhov bola značne znečistená polyfenolami a to v nasledovnom poradí:

- Listy: jahoda > jablko ríbezle > marhuľa > malina = čerešňa
- Plody: malina > marhuľa > jablko > jahoda > ríbezle > čerešňa
- Džemy: marhuľa > jablko > jahoda > malina > čerešňa > ríbezle

DNA sa považuje za čistú, bez prítomnosti polyfenolov ak je hodnota pomeru A_{260}/A_{230} okolo 2,0. V prípade, že je pomer nižší spolu s DNA boli izolované aj polyfenolické látky.

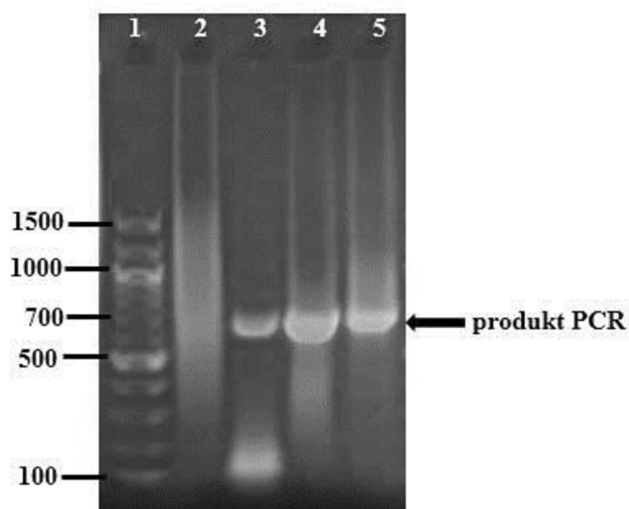
7.3 Testovanie amplifikácie kontrolnej DNA

Cieľom testovania amplifikácie kontrolnej DNA *N.tabacum* o rôznych priméroch bolo experimentálne overenie amplifikovateľnosti podľa daných predpokladov s použitím rôznych Taq DNA polymeráz a cyklérov. Kontrolná DNA bola izolovaná klasickou CTAB metódou Dr. Kovaříkom, CSC.

7.3.1 Testovanie rôzneho množstva Taq DNA polymerázy (5U/ μ L)

Testovala sa Taq DNA polymeráza (5U/ μ L) a pufo 10x Taq buffer complete. Ako matrica DNA bola použitá DNA *N. tabacum* (10 ng / μ L). Zmes pre PCR bola pripravená podľa tabuľky 4a) s priméry 18S_for a 5,8S_rev a amplifikovaná podľa tabuľky 5 a). Amplifikácia bola prevedená podľa PCR programu 700RO40. Výsledky sú uvedené na obrázku 7.

Obrázok 7: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR (700bp) špecifických pre rastlinnú DNA. Amplifikovaná bola DNA *N. tabacum* (10 ng/ μ L) s využitím rôzneho množstva Taq polymerázy (5U/ μ L).



Beh	DNA	Množstvo DNA (ng)/ PCR zmes	Detekcia produktu PCR
1	Rebriček		
2	Negatívna kontrola	0	-
3	Taq polymeráza 0,1 μ L (1U)	20	+
4	Taq polymeráza 0,5 μ L (2,5U)	20	+++
5	Taq polymeráza 1 μ L (5U)	20	++

+, ++, +++ produkty PCR s rôznou intenzitou

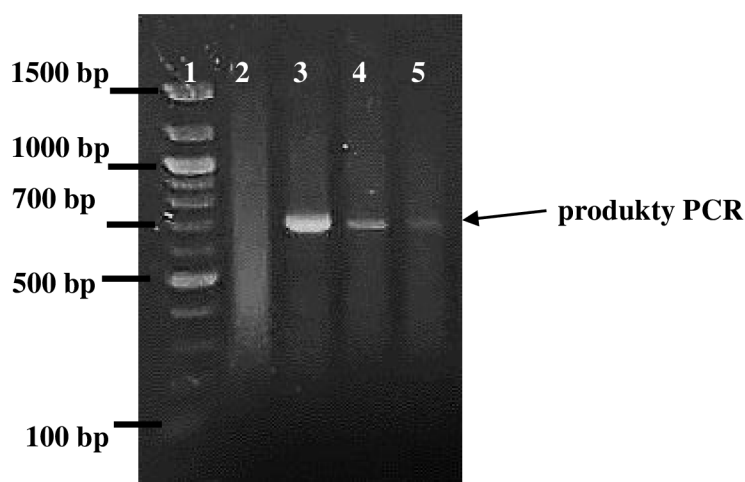
- nedetegované produkty PCR

DNA sa amplifikovala v PCR. Boli detegované produkty PCR predpokladanej dĺžky (700 bp). Najintenzívnejší produkt PCR bol pri použití 2,5 U Taq DNA polymerázy.

7.3.2 Testovanie rôznej koncentrácie DNA a LA polymerázy (5U/ μ L)

Testovala sa kontrolná DNA *N. tabacum* o rôznych koncentráciách. DNA bola riedená v TE pufru. Použitá bola LA polymeráza (5U/ μ L). Zmes pre PCR bola pripravená podľa tabuľky 4 a) s priméry: 18S_for a 5,8S_rev. Amplifikácia prebiehala podľa programu 700RO40 v tabuľke 5 a) na DNA Engine, Peltier thermal Cycler. Výsledky sú uvedené na obrázku 8.

Obrázok 8: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR (700 bp) špecifických pre rastlinnú DNA. Amplifikovaná bola DNA *N. tabacum* o rôznych koncentráciách s LA polymerázou (5U/μL).



Beh	DNA	Koncentrácia DNA (pg/ μL)	Množstvo DNA (pg)/ PCR zmes	Detekcia produktu PCR
1	rebríček			
2	negatívna kontrola	0	0	-
3	<i>N. tabacum</i>	100	200	++
4	<i>N. tabacum</i>	10	20	+
5	<i>N. tabacum</i>	1	2	+

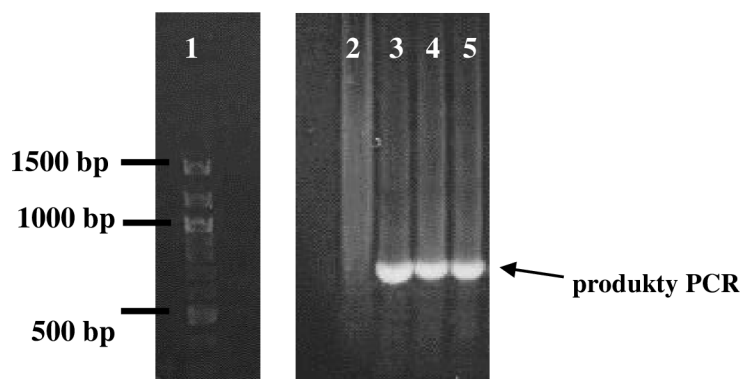
+, ++, +++ produkty PCR s rôznou intenzitou
 - nedetegované produkty PCR

DNA sa amplifikovala v PCR. Po amplifikácii boli detegované produkty PCR rôznej intenzity v závislosti na množstve DNA v zmesiach pre PCR. Intenzívny produkt PCR bol detegovaný po amplifikácii 200 pg DNA. Produkt PCR v slabšej intenzite bol detegovaný po amplifikácii 20 a 2 pg DNA.

7.3.3 Testovanie DNA polymerázy v SYTO-9 master mixu

Testovala sa kontrolná DNA *N. tabacum* o rôznych koncentráciách. Použitá bola DNA polymeráza v SYTO-9 master mixu. DNA bola riedená v TE pufre. Zmes pre PCR bola pripravená podľa tabuľky 4 b) s priméry: 18S_for a 5,8S_rev. Amplifikácia prebiehala podľa programu 700RO40 v tabuľke 5 a) na DNA Engine, Peltier thermal Cycler. Výsledky sú uvedené na obrázku 9.

Obrázok 9 : Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR (700 bp) špecifických pre rastlinnú DNA. Amplifikovaná bola DNA *N. tabacum* o rôznych koncentráciách s polymerázou v SYTO-9 Master mixe. (5U/ μ L).



Beh	DNA	Koncentrácia DNA (ng/ μ L)	Množstvo DNA (ng)/ PCR zmes	Detekcia produktu PCR
1	rebríček			
2	negatívna kontrola	0	0	-
3	<i>N. tabacum</i>	30	60	+++
4	<i>N. tabacum</i>	10	20	+++
5	<i>N. tabacum</i>	12	24	+++

+, ++, +++ produkty PCR s rôznou intenzitou

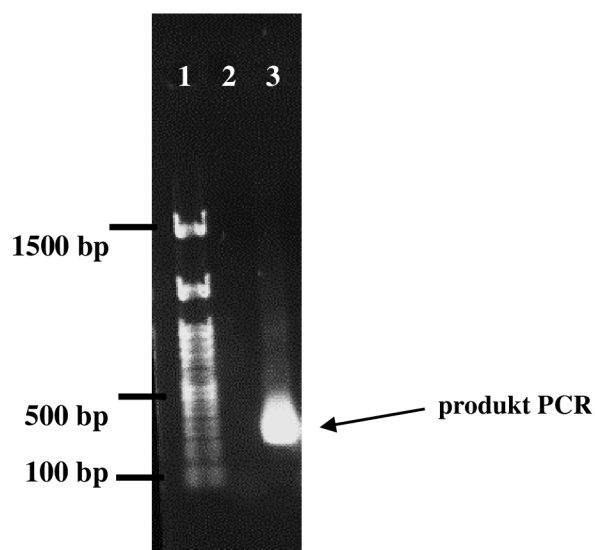
- nedetegované produkty PCR

Boli detegované produkty PCR rôznej intenzity v závislosti na množstve DNA v zmesiach pre PCR.

7.3.4 Testovanie rôznej koncentrácie Fast Taq polymerázy a ďalších primérov

Testovala sa kontrolná DNA *B. oleracea*. Zmes pre PCR bola pripravená podľa tabuľky 4 c) s priméry: 18S_234_for a 18S_496_rev. Amplifikácia prebiehala podľa programu Its-1 podľa tabuľky 5b) na thermocykléri MJ Research. Výsledky sú uvedené na obrázku 10.

Obrázok 10: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR (263 bp) špecifických pre rastlinnú DNA. Amplifikovaná bola DNA *B.oleracea* s Fast Taq polymerázou (5U/ μ L).



Beh	DNA	Koncentrácia DNA (ng/ μ L)	Množstvo DNA (ng)/ PCR zmes	Detekcia produktu PCR
1	rebríček			
2	Negatívna kontrola	0	0	-
3	Pozitívna kontrola <i>B.oleracea</i>	65	65	+++

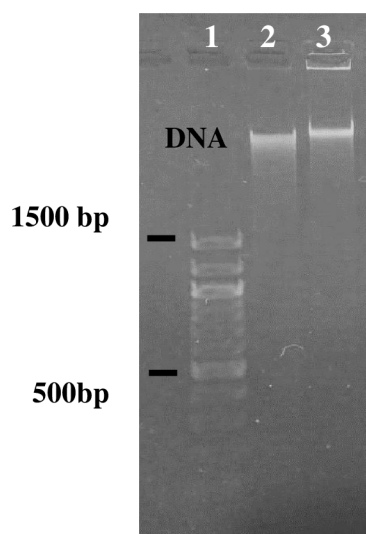
+, ++, +++ produkty PCR s rôznou intenzitou
 - nedetegované produkty PCR

DNA sa amplifikovala v PCR. Bol detegovaný produkt PCR v silnej intenzite.

7.3.4 Overenie intaktnosti kontrolnej DNA

Bola testovaná kontrolná DNA *N. tabacum* o koncentracii 10 ng/ μ L a 12 ng/ μ L . Na géľ (0,8%) bolo nanesených 20 μ L DNA. Výsledky sú uvedené na obrázku 11.

Obrázok 11: Agarózová gélová elektroforéza kontrolnej DNA *N.tabacum*.



Beh	DNA	Koncentrácia DNA (ng/ μ L)	Množstvo DNA na géli (ng)	Detekcia DNA	Degradácia DNA
1	rebríček				
2	<i>N. tabacum</i>	10	200	áno	mierna
3	<i>N. tabacum</i>	12	240	áno	mierna

+, ++, +++ DNA s rôznou intenzitou

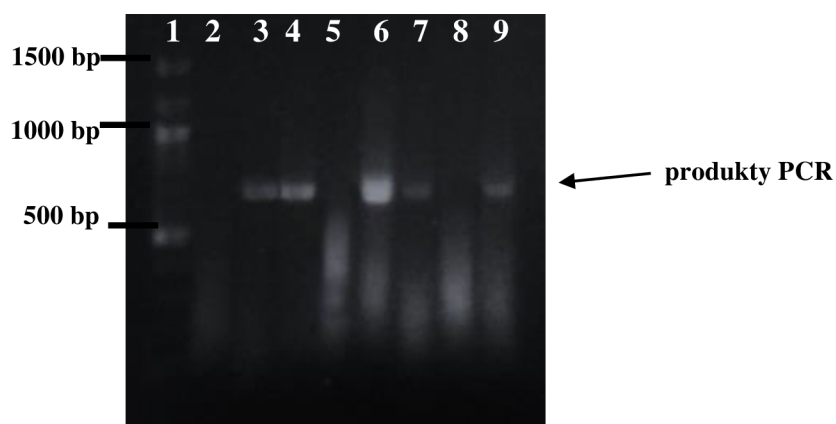
DNA *N.tabacum* (20 μ L) o koncentrácii 10 ng/ μ L a 12 ng/ μ L bola detegovaná na géli. Kontrolná DNA bola relatívne intaktná a mierne degradovaná.

7.4 Amplifikácia rastlinnej DNA v PCR

7.4.1 Amplifikácia DNA izolovanej z listov

DNA bola izolovaná podľa kapitoly 6.6 z homogenátov prečistených chloroform-oktanolom podľa kapitoly 6.5.2 a zakonzentrovaná ethanolom podľa kapitoly 6.5.4. PCR zmesi boli pripravené podľa tabuľky 4a) s priméry na 700 bp 18S_for a 5,8S_rev v kapitole 6.8.1. DNA bola zriedená 10x. Bol použitý program 700RO35 (kapitola 6.8.2, tabuľka 5a)). Použil sa termocyklér DNA Engine, Peltier Thermal Cycler. Výsledky sú uvedené na obrázku 12.

Obrázok 12: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR (700bp). Amplifikovaná bola DNA izolovaná z listov ovocných stromov a kerov.



Beh	DNA – Listy	Množstvo DNA (ng) / PCR zmes	Detekcia produktu PCR
1	rebriček		
2	negatívna kontrola	0	-
3	pozitívna kontrola <i>N.tabacum</i>	20	+
4	Marhuľa	10,2	++
5	Malina	12,0	-
6	Jablko	4,6	++
7	Čerešňa	4,2	+
8	Ríbezľa	8,2	-
9	Jahoda	5,4	++

+,++,+++ produkty PCR s rôznou intenzitou

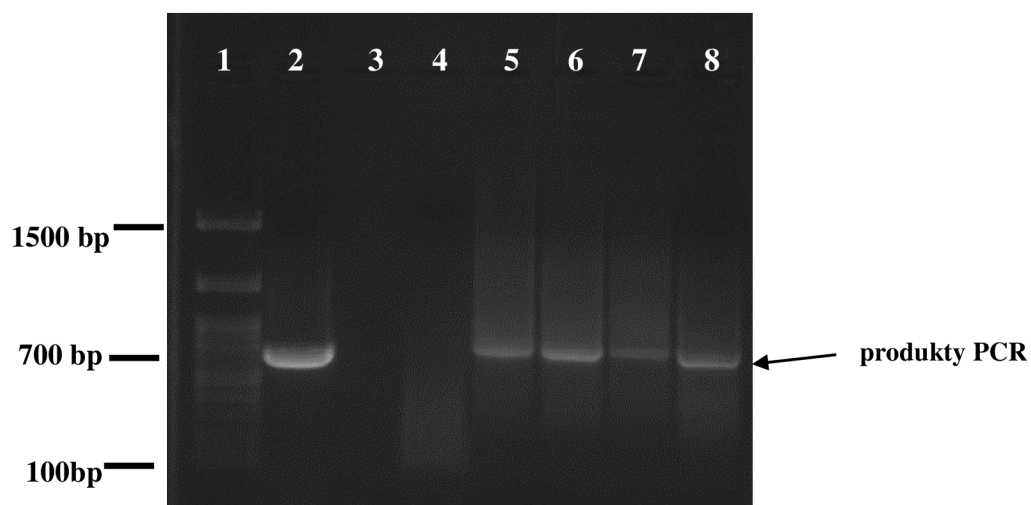
- nedetegované produkty PCR

Produkty PCR boli na géli detegované v rôznej intenzite. Amplikón bol detegovaný po amplifikácii DNA izolovanej z listov marhuly, jablka, čerešne a jahody. Amplikón nebol detegovaný po amplifikácii DNA izolovanej z listov maliny a ríbezle.

7.4.1.1 Amplifikácia DNA izolovanej z mrazených listov čiernej ríbezle

DNA bola izolovaná podľa kapitoly 6.6 z homogenátov z mrazených listov čiernej ríbezle. Homogenáty boli prečistené chloroform-oktanolom podľa kapitoly 6.5.2. PCR zmes bola namiešaná podľa tabuľky 4 c) s primery 18S_for a 5.8S_rev. Bol použitý program Its-1, podľa tabuľky 5b) na thermocykléry MJ Research. Výsledky sú uvedené na obrázku 13.

Obrázok 13: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR (700bp). Amplifikovaná bola DNA prečistená chloroform-oktanolom z homogenátov pripravených zo zmrazených listov keru čiernej ríbezle.



Beh	DNA - Listy - čierne ríbezle	Množstvo DNA(ng) / PCR zmes	Detekcia produktu PCR
1	rebríček		
2	pozitívna kontrola <i>B.oleracea</i>	65,25	+ ++
3	-	-	-
4	negatívna kontrola	0	-
5	1	8,1	++
6	2	4,5	++
7	3	5,2	++
8	4	6,0	++

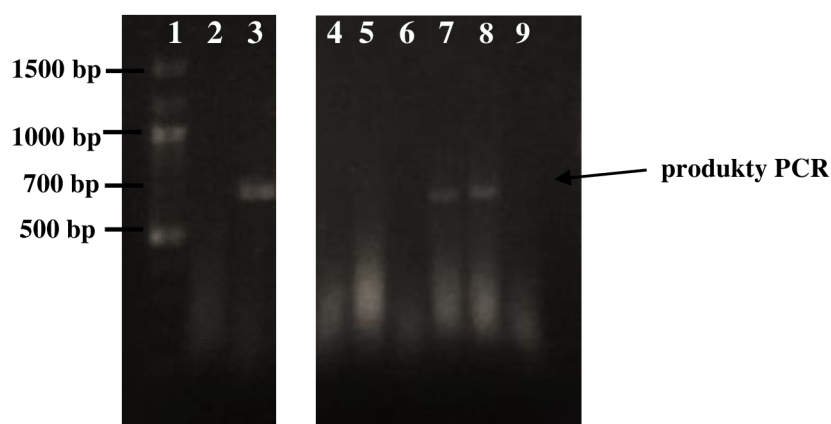
+ ,++ ,+++ produkty PCR s rôznou intenzitou
 - nedetegované produkty PCR

Amplikóny boli prítomné v behoch 5 až 8. DNA (4,5-8,1 ng) izolovaná zo zmrazených listov keru čiernych ríbezlí sa amplifikovala v PCR narozdiel od DNA izolovanej z čerstvých listov (viď obrázok 12, beh 8).

7.4.2 Amplifikácia DNA izolovaná z plodov

Boli pripravené homogenáty z plodov podľa postupu 6.5.2 a zakoncentrovaná ethanolom podľa kapitoly 6.5.4. Pri izolácii DNA sa postupovalo podľa kapitoly 6.6. Boli použité PCR zmesi podľa kapitoly 6.8.1 a tabuľky 4 a) s primery 18S_for a 5,8S_rev. DNA bola zriedená 10x. Bol použitý PCR program 700RO35 podľa tabuľky 5 a). Výsledky sú uvedené na obrázku 14.

Obrázok 14: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR (700 bp). Amplifikovaná bola DNA izolovaná plodov.



Beh	DNA - Plody	Množstvo DNA (ng) / PCR zmes	Detekcia produktu PCR
1	rebríček		
2	negatívna kontrola	0	-
3	pozitívna kontrola <i>N.tabacum</i>	20,0	++
4	Čerešňa	5,0	-
5	Ríbezľa	4,6	-
6	Malina	1,2	-
7	Marhuľa	16,4	++
8	Jahoda	16,8	++
9	Jablko	1,8	-

+, ++, +++ produkty PCR s rôznou intenzitou

- nedetegované produkty PCR

Produkty PCR v dĺžke 700 bp boli detegované po amplifikácii DNA izolovanej z plodov marhule a jahody (viď beh 7 a 8). V behoch 4, 5, 6 a 9 po amplifikácii DNA izolovanej z plodov čerešne, ríbezle maliny a jablka neboli produkty PCR detegované.

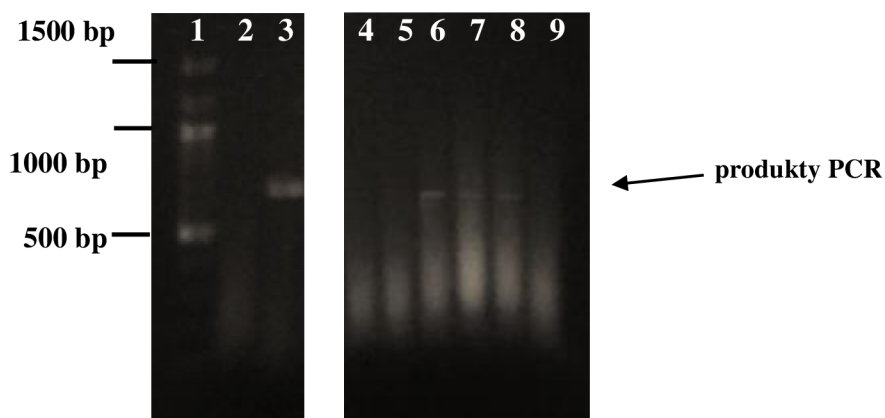
7.4.3 Amplifikácia DNA izolovaná z džemov

V amplifikácii boli detegované rôzne priméry, ktoré dávali produkty PCR rôznej dĺžky.

7.4.3.1 Primery pre 700 bp

Boli pripravené homogenáty z džemov podľa postupu 6.5.1. Pri izolácii DNA sa postupovalo podľa kapitoly 6.6. Boli použité PCR zmesi podľa kapitoly 6.8.1 a tabuľky 4 a) s priméry 18S_for a 5.8S_rev. Bol použitý PCR program 700RO35 podľa kapitoly 6.8.2 tabuľky 5 a). Bol použitý thermocyklér - DNA Engine, Peltier Thermal Cycler. Výsledky sú uvedené na obrázku 15.

Obrázok 15: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR (700 bp). Amplifikovaná bola DNA izolovaná z džemov .



Beh	DNA - Džemy	Množstvo DNA (ng) / PCR zmes	Detekcia produktu PCR
1	rebriček		
2	negatívna kontrola	0	-
3	pozitívna kontrola <i>N.tabacum</i>	20	++
4	Marhuľa	10,2	-
5	Ríbezľa	8,2	-
6	Čerešňa	4,2	+
7	Malina	12,0	+
8	Jahoda	5,4	+
9	Jablko	4,6	-

+, ++, +++ produkty PCR s rôznou intenzitou

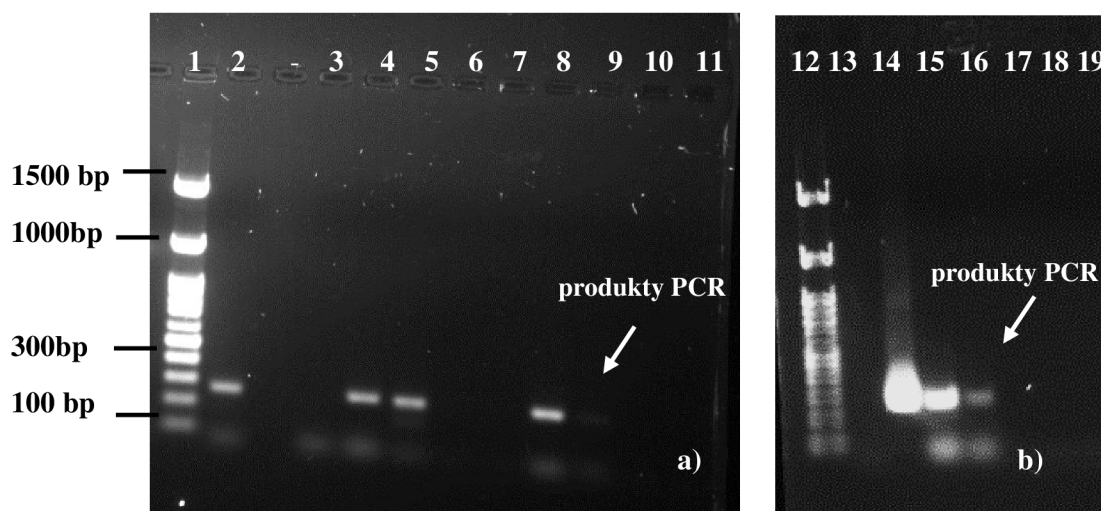
- nedetegované produkty PCR

Produkty PCR slabšej intenzity boli detegované po amplifikácii v behoch 6,7 a 8 (džem čerešňa, malina a jahoda). DNA bola degradovaná, v malom množstve, prípadne obsahovala inhibitory PCR.

7.4.3.2 Primery pre 263 bp

Boli pripravené homogenáty z džemu z čiernych ríbezlí (vzorky so zrnčkami a bez zrnčok) a rôznych druhov ovocia podľa postupu 6.5.1 s výnimkou v bode 2 (pre čierne ríbezle), kde sa pridali 2 μ L merkptoethanolu. Homogenáty boli prečistené chloroform-oktanolom podľa kapitoly 6.5.2. Pri izolácii DNA sa postupovalo podľa kapitoly 6.6. Boli použité PCR zmesi podľa tabuľky 4c) s priméry 18S_234_for a 18S_496 rev . Bol použitý PCR program Its - 1 podľa tabuľky 5 b) na thermocykléri MJ Research. Výsledky sú uvedené na obrázku 16.

Obrázok 16 : Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR (263 bp). Amplifikovaná bola DNA izolovaná z : a) džemu z čiernych ríbezlí, b) džemu z rôznych druhov ovocia.



BEH	DNA - Džem čierne ríbezle	Množstvo DNA (ng) / PCR zmes	Detekcia
1	Rebríček		
2	Pozitívna kontrola – list rybízu	6,0	++
3	Negatívna kontrola	-	-
4	Z1	4,4	++
5	Z2	1,9	++
6	Z3	1,9	-
7	Z4	7,3	-
8	BZ1	1,3	++
9	BZ 2	1,7	+
10	BZ 3	0,8	-
11	BZ 4	2,4	-
BEH	DNA - Džemy	Množstvo DNA (ng) / PCR zmes	Detekcia
12	Rebríček		
13	Negatívna kontrola		
14	Pozitívna kontrola – <i>B.oleracea</i>	62,5	+++
15	Marhuľa	10,20	+++
16	Čerešňa	4,20	++
17	Jahoda	5,40	-
18	Malina	12,00	-
19	Jablko	4,60	-

- +,,+,+++ produkty PCR s rôznou intenzitou
- nedetegované produkty PCR
- Z- džem so zrnčkami, BZ -džem bez zrnčiek

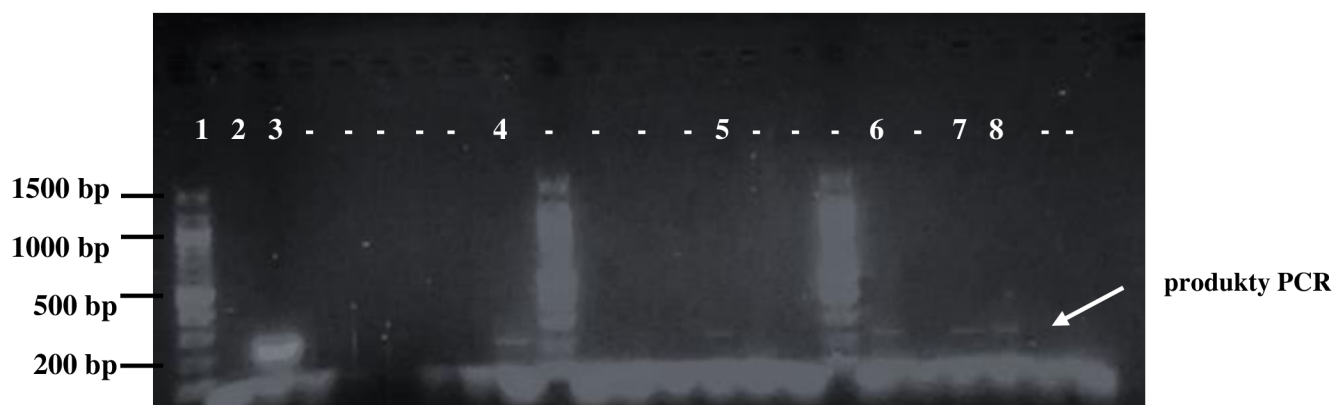
Produkty PCR (obrázok 16 b) boli detegované po amplifikácii v behoch 15 a 16 (DNA izolovaná z džemov - marhuľa a čerešňa). DNA bola degradovaná, v malom množstve a obsahovala inhibitory PCR. DNA sa v porovnaní s priméry na 700 bp (obrázok 15) amplifikovala lepšie.

7.4.3.3 Primery na 220 bp

Vzhľadom k možnej prítomnosti inhibítorov PCR boli testované rôzne spôsoby prípravy (prečisťovania) homogenátov použitých pre izoláciu DNA.

Boli pripravené homogenáty džemov podľa kapitoly 6.5.1, v prípade prečistenia chloroform-oktanolom podľa kapitoly 6.5.2, v prípade prezrážania isopropanolu podľa kapitoly 6.5.3. Pri izolácii DNA sa postupovalo podľa separačnej zmesi z kapitoly 6.6. Amplifikovaná bola DNA z homogenátov po prečistení chloroform-oktanolom, po následnom prečistení isopropanolom, riedená a neriedená. Tiež bola pripravená separačná zmes, ktorá neobsahovala magnetické guľičky. PCR zmes bola namiešaná podľa kapitoly 6.8.1 a tabuľky 4 a) s priméry 26S_for a 26S_rev. PCR program bol použitý 220RO40 podľa kapitoly 6.8.2 a tabuľky 5 a). Bol použitý termocyklér - DNA Engine, Peltier Thermal Cycler. Výsledky sú uvedené na obrázku 17.

Obrázok 17: Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov (220 bp). Amplifikovaná bola DNA izolovaná z malinového, marhuľového a jahodového džemu. Do PCR zmesi sa pridávalo 2 μ L DNA.



Beh	DNA - Džem	Chloroform-oktanol	Isopropanol	Magnetické častice	Riedenie 10x	Množstvo DNA (ng) / PCR zmes	Detekcia produktu PCR
1	rebríček						
2	negatívna kontrola					0	-
3	Pozitívna kontrola <i>N.tabacum</i>					20	+++
4	Malina	+	+	-	+	2,96	+
5	Marhuľa	+	-	+	+	2,84	+
6	Jahoda 1	-	-	+	-	1,40	+
7	2	+	-	+	-	3,20	+
8	3	-	-	+	+	0,40	+

+, ++, +++ produkty PC s rôznou intenzitou
- nedetegované produkty PCR

Boli detegované produkty PCR veľmi slabej intenzity. DNA prečistená prezrážaním isopropanolom (bez separácie magnetickými časticami) sa tiež amplifikovala.

7.4.3.4 Zhrnutie amplifikácie DNA izolovanej z analyzovaných vzoriek DNA

Detekcia produktov PCR detegovaných po amplifikácii DNA izolovanej z listov, plodov a džemov zo 6 druhov ovocia s rôznymi priméry. Zhrnutie výsledkov je uvedené v tabuľke 14.

Tabuľka 14: Súhrn amplifikácie DNA – detekcia produktov PCR.

	Produkt PCR	Ovocie					
DNA	Veľkosť(bp)	Marhuľa	Malina	Jablko	Čerešňa	Ríbezle	Jahoda
List	700	+		+	+	+	+
Plod	700	+					+
Džem	700		+		+		+
	263	+			+	+	
	220	+	+				+

DNA v kvalite vhodnej pre PCR bola izolovaná z listov, plodov a džemov marhule a jahody. Ďalej z listov a džemov u ríbezlí a čerešne; z listov u jablka; z džemov u maliny.

8. DISKUSIA

Diplomová práca bola zameraná na testovanie mikrometód izolácie DNA rastlinného pôvodu v technologicky spracovaných potravinách ako sú džemy ale aj rastlinných materiáloch ako sú listy a plody. Hlavnou problematikou bola izolácia DNA z vybraných potravinových produktov mikrometódou založenou na magnetických časticách.

Cieľom bolo izolovať DNA v kvalite pre PCR. Boli optimalizované podmienky amplifikácie DNA, zvlášť bol sledovaný vliv dĺžky amplicónu na jeho preukázanie gélovou elektroforézou na agaróze.

8.1 Príprava homogenátov

Rastlinné pletivá majú pevnejšiu bunkovú stenu ako živočísné pletivá a tak sa z nich DNA izoluje ťažšie. Pred samotnou izoláciou je potrebné si pripraviť homogenáty v dostatočnej kvalite [5].

Homogenácia spočíva v rozrušení bunkovej steny a následnej lýze buniek. Homogenizoval sa rastlinný materiál s prídavkom lyzačného roztoku s CTAB s 2,5M NaCl a 1 μ L merkptoethanolu (0,2 %) (na základe optimalizácie zloženia CTAB v DP Terezy Surej, 2018) [59].

Metóda je založená na schopnosti CTAB (cetyltrimetylamoniumbromid) vytvárať komplex s nukleovými kyselinami, ktorý je pri vysokej koncentrácii solí rozpustný a zároveň pôsobí ako detergent, ktorý uvoľňuje DNA z membrán a proteínov [3,4]. Na základe rozpustnosti CTAB v porovnaní s DNA je možné oddeliť a získať dostatočne čistú rastlinnú DNA. Prídavok merkptoethanolu pomáha redukovať vo vyššej miere obsah proteínov. Koncentrácia NaCl sa mení v závislosti od druhu zdroja rastlín [24].

Prvý krok homogenizácie prebiehal pomocou plastového kopistu vo vymrazenom bločku a postupovalo sa podľa kapitoly 6.5.1. Homogenáty s DNA boli prečistené od detergentov a ostatných zložiek lyzačného roztoku, proteínov, solí a ďalších nečistôt chloroform-oktanolom v pomere 24:1, isopropanolom a ethanolom [5].

Merkptoethanolu sa v procese homogenácie pridávalo po 1 μ L, avšak pri nových homogenátoch z džemu z čiernych ríbezlí sa použili 2 μ L, čo mohlo pozitívne ovplyvniť množstvo a čistotu vyizolovanej DNA [26].

Pri homogenizácii boli zaznamenané rozdiely aj pri spracovaní čerstvých vzoriek listov a vzoriek listov číených ríbezlí a zmrazených vzoriek. DNA vyizolovaná z čerstvých listov sa nedostatočne amplifikovala v PCR a produkt PCR nebol detegovaný na géli (viď obrázok 12, beh 8) narozdiel od DNA vyizolovanej z mrazených listov, kde amplifikácia prebehla a amplicóny boli detegované vo všetkých behoch (viď obrázok 13, behy 5-8). Dôvodom môže byť ten, že vzorka sa lepšie spracováva a homogenizuje, keď je zmrazená [3, 19, 20].

8.2 Izolácia DNA z homogenátov magnetickými časticami P(HEMA-co-GMA)

Pri analýze DNA metódami molekulárnej biológie je nevyhnutné izolovať čistú relatívne nedegradovanú DNA v kvalite a kvantite vhodnej pre PCR. V súčasnosti existuje mnoho metodík pre izoláciu DNA, ktoré sa neustále optimalizujú aby dosiahli čo najvyššiu účinnosť [23]. DNA z rastlinných pletív sa izoluje ťažšie v porovnaní so živočísnymi tkanivami, kvôli ich pevnej bunkovej stene. Pri ovocných výrobkoch ako napr. u džemov musíme brať do úvahy aj fakt, že DNA sa tepelným spracovaním degraduje. Množstvo izolovanej DNA sa líši v závislosti na zdroji DNA (listy, plody, džemy) i na druhu rastliny [3].

V diplomovej práci bola DNA z homogenátov izolovaná pomocou mikrometódy s využitím magnetických častíc P(HEMA-co-GMA) [37], z toho dôvodu, že umožňuje izolovať relatívne čistú DNA amplifikovateľnú v PCR. Bolo to preukázané pri izolácii DNA z rôznych typov komplexných vzoriek obsahujúcich inhibitory PCR [35]. K väzbe nukleových kyselín na nosič s karboxylovými skupinami dochádza v prostredí s vysokou koncentráciou NaCl a polyethylénglykolu (PEG 6000). Magnetické častice sa separovali pomocou magnetického separátora zo separačnej zmesi, ktorá sa namiešala na základe optimalizácie zloženia CTAB v DP Terezy Surej, 2018 [59].

DNA sa izolovala aj bez pomoci magnetických častíc z homogenátov malinového džemu s prídavkom a bez prídavku chloroform-oktanolu a isopropanolu avšak zaznamenané výsledky ukazujú vyššiu efektivitu PCR pri použití magnetických častíc. Dôležitú rolu zohrávalo aj prečistenie vyizolovanej DNA organickými rozpúšťadlami – chloroformom-oktanol a isopropanol [5].

8.3 Spektrofotometrické stanovenie DNA

Pre zistenie koncentrácie a čistoty izolovanej DNA boli pomocou NanoDropu 2000 spektrofotometricky zmerané absorbancie v rozpätí vlnových dĺžok 230–320 nm. Pomer absorbancií A_{260}/A_{280} sa pre čistotu DNA pohybuje medzi 1,8-2,0. Pokiaľ je pomer absorbancií nižší ako 1,8, DNA je pravdepodobne znečistená proteínmi, prípadne ďalšími látkami. Ak je pomer absorbancií vyšší než 2,0 jedná sa o znečistenie RNA. Ďalším ukazovateľom čistoty DNA je pomer absorbancií A_{260}/A_{230} , ktorá by mala byť väčšia ako 1. Nižší pomer signalizuje znečistenie DNA najmä polyfenolmi [60].

Pomery hodnôt absorbancií A_{260}/A_{280} nm izolovanej DNA zo vzoriek listov boli namerané v rozsahu 1,33 až 1,57 u listov; 1,41 až 1,85 u plodov; 1,42 až 1,67 u džemov. Hodnoty pomerov absorbancií A_{260}/A_{230} nm sa pohybovali v rozmedzí od 0,46 až 1,16 u listov; u plodov 0,43 až 1,08; u džemov 0,35 až 0,66. Namerané pomery absorbancií sa od očakávaných pomerov hodnôt absorbancií pri vlnovej dĺžke A_{260}/A_{280} nm a A_{260}/A_{230} nm značne odlišujú, čo naznačuje prítomnosť proteínov, polyfenolov a ďalších látok. Jednoduchým postupom, ktorý umožňuje znížiť množstvo nežiadúcich látok koextrahovaných s DNA, je DNA vyriediť [30].

Dôvodom prečo sa z marhule izolovala DNA v najväčšom množstve môže byť fakt, že je to dužinaté ovocie, ktoré sa od bobuľového líši rozdielnym zložením látok. Odlišné charakteristiky ako sú tuhá polysacharidová bunková stena, pigmenty alebo sekundárne metabolity vyžadujú pri izolácii zvláštnu pozornosť. Bobuľové ovocie ako sú čierne ríbezle alebo maliny sú bohaté na antioxidačné látky, ktoré môžu inhibovať PCR [12].

8.4 Amplifikácia DNA v PCR a detekcia produktov

Na amplifikáciu DNA vyizolovanej z rastlín, ovocia a ovocných výrobkov bola využitá metóda PCR (polymerázová reťazová reakcia). Princíp tejto metódy spočíva v namnožení špecifických úsekov DNA. Úseky DNA, ktoré chceme amplifikovať sú špecificky označené oligonukleotidmi – priméry. [41].

Boli použité priméry 18S_for a 5,8S_rev (veľkosť amplikónu 700bp), 18S_234_for a 18S_496_rev (veľkosť amplikónu 263bp) a 26S_for a 26S_rev (veľkosť amplikónu 220bp). Boli popísané Dr. Kovaříkom [55,56,58]. Priméry 26S_for a 26S_rev použil aj Trojánec vo svojej diplomovej práci, ktorá sa venovala izolácii DNA zo zeleniny [57].

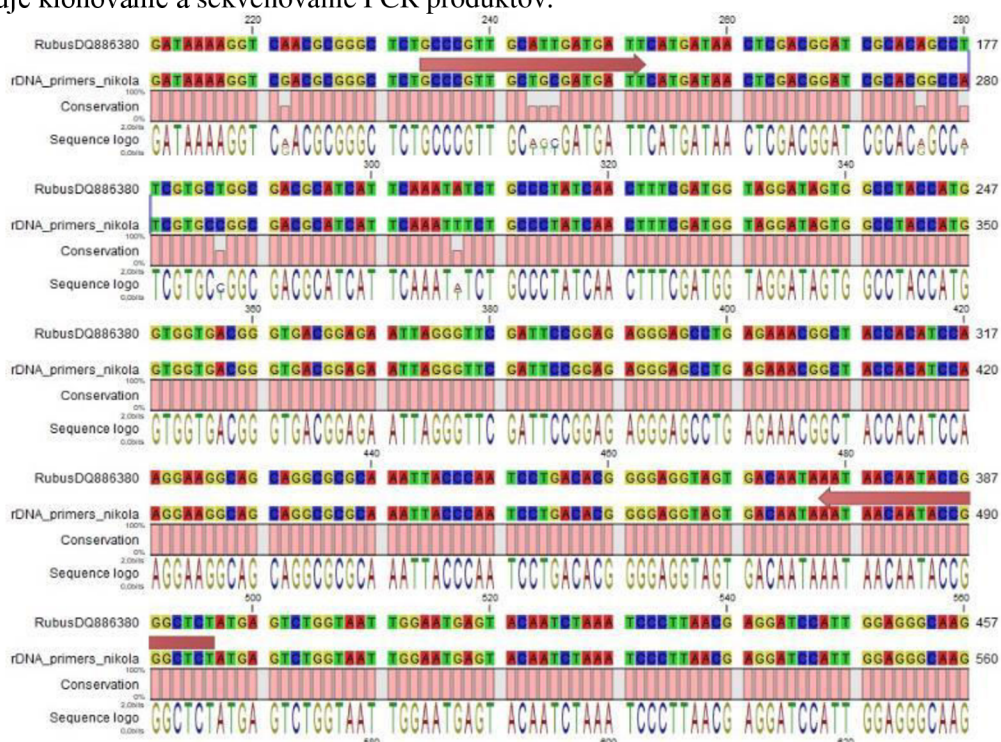
DNA izolovaná z listov sa amplifikovala [3] pri použití primérov 18S_for a 5,8S_rev. Boli detegované amplikóny po amplifikácii DNA izolovanej z listov marhule, jablka, čerešne a jahody na rozdiel od maliny a čiernych ríbezlí, čo mohlo súvisieť aj so spôsobom spracovania a skladovania

vzoriek [19, 20]. Totiž pri ďalšom experimente boli na géli vizualizované amplikóny DNA izolovanej z mrazených listov čiernych ribezlí. Boli použité priméry 18S_234_for a 18S_496_rev [58].

U džemov bola amplifikácia náročnejšia, nakoľko DNA v ovocných výrobkoch je už z väčšej časti zdegradovaná. Môžeme tu sledovať, že vplyv dĺžky amplikónu má vplyv na amplifikáciu a detekciu produktov PCR. Pri použití primerov 18S_for a 5,8S_rev (veľkosť produktu PCR 700bp) [55] amplifikácia buď vôbec neprebehla alebo prebehla ale detegované amplikóny boli slabšej intenzity (DNA z džemov čerešne, maliny a jahody). Naopak pri použití primérov 18S_234_for a 18S_496_rev [58] boli detegované amplikóny po amplifikácii DNA izolovanej z džemov maliny a jahody. Významnú rolu vedľa množstva a kvality DNA zohráva aj program amplifikácie, termocyklér a DNA polymeráza. Najviac sa osvedčil program Its-1 a DNA polymeráza Fast Taq. Z hľadiska celkového množstva vyizolovanej DNA z druhov ovocia boli hodnoty koncentrácií najvyššie u marhule, čo dokazujú aj PCR produkty po amplifikácii DNA izolovanej z listov, z plodov a domáceho džemu. Mikrometódy je treba optimalizovať pre jednotlivé typy vzoriek.

8.4.1 Porovnanie sekvencií 18S rDNA *Nicotiana tabacum* (tabak) a *Rubus ideaus* (Ostružina malinová / Maliník obecný)

Porovnávala sa sekvencia 18S rRNA génu *Nicotiana tabacum* (riadok rDNA_primers_nikola) podľa ktorej boli navrhnuté priméry 18S_for a 18S_rev so sekvenciou *Rubus ideaus* (Ostružina malinová / Maliník obecný) z databázy GenBank. Na obrázku 18 je vidieť, že sekvencie oboch druhov sú všeobecne veľmi podobné a líšia sa iba v niekoľkých bodových mutáciách. Tieto polymorfne pozície sú znázornené krátkymi stĺpčkami v riadku "Conservation" a v riadku "Sequence logo" potom alternatívnymi písmenami skratiek nukleotidových bázi (ACTG). Veľké písmená v obrázku znamenajú 100% zhodu. Pozície primérov sú vyznačené tlstými šípkami medzi sekvenciami. Je zrejmé, sekvencia v mieste 18S_for priméru obsahuje 3 bodové zámenny, avšak táto divergencia nijako neovplyvňuje nasadenie priméru na sekvenciu 18S rDNA maliny v PCR reakcii. Párové priradenie bolo vytvorené programom CLCgenomics workbench (Qiagen, Nemecko). Sekvenčné polymorfizmy by mohli byť využité pre identifikáciu pôvodu potravinárskych produktov rastlinného pôvodu. Tento prístup však vyžaduje klonovanie a sekvenovanie PCR produktov.



Obrázok 18: Sekvencie 18S rDNA *Nicotiana tabacum* a *Rubus ideaus*.

ZÁVER

Testovanou mikrometódou bola izolovaná DNA z listov, plodov a džemov zo 6 druhov ovocia. Najviac DNA bolo izolovanej z listov. Bolo preukázané, že DNA izolovaná zo všetkých listov sa amplifikovala v PCR s priméry 18S_for a 5,8S_rev (700 bp amplikón) s výnimkou listov maliny. DNA izolovaná z plodov marhule a jahody sa amplifikovala v PCR narozdiel od plodov maliny, čerešne, jablka a čiernych ríbezlí. DNA izolovaná z džemov sa amplifikovala v rôznej kvalite a intenzite s primérmý 18S_for a 5,8S_rev (700 bp amplikón), 26S_for a 26S_rev (220 bp amplikón) a 18S_234_for a 18S_496_rev (236 bp amplikón) až na výnimku džemu z jablka. Testovanú mikrometódu je treba ďalej optimalizovať pre jednotlivé typy vzorkov.

Výsledky tejto diplomovej práce zameranej na testovanie mikrometódy môžu pomôcť pri izoláciách DNA použitím magnetických častíc z rastlinného materiálu alebo prispieť k sledovaniu vplyvu dĺžky amplikónu na jeho preukázanie na agarózovom géli pre širšie spektrum rastlinného materiálu a džemov.

ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

[1] LOHUMI, S., LEE, S., LEE, H., CHO, B-K. A review of vibrational spectroscopic techniques for the detection of food authenticity and adulteration. *Trends in Food Science & Technology* [online]. Elsevier 2015, [cit. 19.08.2015], 46 (1), 85-98. DOI: 10.1016/j.tifs.2015.08.003. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092422441500196X>.

[2] AHMED, I., ISLAM, M., ARSHAD, W., MANNAN, A., AHMAD, W., MIRZA, B. High-quality plant DNA extraction for PCR: an easy approach. *Journal of Applied Genetics* [online]. Springer-Verlag, 2009, [cit. 16.12.2008], 50 (2), 105-107. DOI: 10.1007/BF03195661. Dostupné tiež z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19433907>. ISSN : 1234-1983.

[3] DOYLE, J. J., DOYLE, J. L. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 1987, 19, 11–15.

[4] DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 1990, 12, 13-15.

[5] VARMA, A., PADH, H., SHRIVASTAVA, N., DR. Plant genomic DNA isolation: An art or a science. *Biotechnology journal* [online]. 2007, [cit. 12.03.2007], 2(3), 386-392. DOI: 10.1002/biot.200600195. Dostupné tiež z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/biot.200600195>. ISSN: 1860-6768.

[6] BERENSMEIER, S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. Springer-Verlag, 2006, [cit. 25.11.2006], 73(3), 495-504. DOI: 10.1007/s00253-006-0675-0. ISSN 0175-7598. Dostupné tiež z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-006-0675-0>

[7] RENAULT T., ARZUL I., LIPART C. Development and use of an internal standard for oyster herpesvirus 1 detection by PCR. *Journal of Virological Methods* [online]. Elsevier, 2004, [cit. 24.07.2004], 121(1), 17-23. DOI: 10.1016/j.jviromet.2004.05.017. Dostupné tiež z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15350728>

[8] Vyhláška č. 157/2003 Sb.: Vyhláška, kterou se stanoví požadavky pro čerstvé ovoce a čerstvou zeleninu, zpracované ovoce a zpracovanou zeleninu, suché skořápkové plody, houby, brambory a výrobky z nich, jakož i další způsoby jejich označování. In: *Sbírka zákonů České republiky*. 2003, částka 59. Dostupné tiež z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2003-157>

[9] SOVOVÁ, T., KŘÍŽOVÁ, B., OVESNÁ, J. Determining the Optimal Method for DNA Isolation from Fruit Jams. *Czech J. Food Sci* [online]. 2018, 36, 126-132. DOI: [10.17221/340/2017-CJFS](https://doi.org/10.17221/340/2017-CJFS). Dostupné tiež z: https://www.agriculturejournals.cz/web/cjfs.htm?type=article&id=340_2017-CJFS. ISSN: 1212-1800

[10] SKROVANKOVA, S., SUMCZYNSKI, D., MLCEK, J., JURIKOVA, T., SOCHOR, J. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *Int. J. Mol. Sci* [online]. 2015, [cit. 16.10.2015], 16, 24673-24706, DOI:10.3390/ijms161024673. Dostupné tiež z: <https://www.mdpi.com/1422-0067/16/10/24673>. EISSN: 1422-0067

[11] DEL BO', C., MARTINI, D., PORRINI, M., KLIMIS-ZACAS D., RISO, P. Berries and oxidative stress markers: an overview of human intervention studies. *Food Funct.* [online]. 2015, [cit. 20.07.2015], 6, 2890. DOI: 10.1039/C5FO00657K. Dostupné tiež z : <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/fo/c5fo00657k>.

- [12] Wu, J., Gao, H., Zhao, L., Liao, X., Chen, F., Wang, Z., Hu, X. Chemical compositional characterization of some apple cultivars. *Food Chem.* [online]. Elsevier, 2007, [cit. 6.10.2006] 103, 88–93. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.07.030.
Dostupné tiež z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814606006157?via%3Dihub>
- [13] GATTI, E., DEFILIPPI, B.G., PREDIERI, S., INFANTE, R. APRICOT (*Prunus armeniaca* L.) quality and breeding perspectives. *J Food Agric Environ* [online]. 2009, [cit. 3.10.2009], 7:573–580. Dostupné tiež z: <https://www.researchgate.net/publication/237360019>.
- [14] DRAGOVIC-UZELAC, V., LEVAJ, B., MRKIC, V., BURSAC, D., BORAS, M. The content of polyphenols and carotenoids in three apricot cultivars depending on stage of maturity and geographical region. *Food Chem* [online]. Elsevier, 2007, [cit. 18.04.2006], 102 (3), 966–975. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.04.001.
Dostupné tiež z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814606002962?via%3Dihub>
- [15] SOONG, Y-Y., BARLOW, P.J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry* [online]. Elsevier, 2004, [cit. 18.03.2004], 88:414–417. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.02.003.
Dostupné tiež z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814604001293>.
- [16] CARLSEN, MH., HALVORSEN, BL., HOLTE, K., et al. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutrition Journal* [online]. 2010, [cit. 22.01.2010], 9 (3). DOI: 10.1186/1475-2891-9-3.
Dostupné tiež z: <https://nutritionj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2891-9-3>
- [17] SCHRADER, C., SCHIELKE, A., ELLERBROEK, L., JOHNE, R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol* [online]. 2012, [cit. 2.07.2012], 113(5), 1014-26. DOI:10.1111/j.1365-672.2012.05384.x.
Dostupné tiež z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22747964>
- [18] GILMARTIN, P. M., BOWLER, C. (EDS.). *Molecular Plant Biology*. 2002, vol 1, 274. Oxford University Press, Oxford. ISBN 0-19-963876-4
- [19] ALJANABI, S. M., MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res* [online]. 1997, [cit. 15.11.1997], 25 (22), 4692–4693. PMID: 9358185. Dostupné tiež z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9358185>
- [20] JOFUKU, K. D., GOLDBERG, R. B., Analysis of plant gene structure, in: Shaw, C. H. (Ed.). *Plant molecular biology, a practical approach*, IRL Press, Oxford. 1988, 37–41.
- [21] BHATTACHARJEE, R., KOLESNIKOVA-ALLEN, M., AIKPOKPODION, P., TAIWO, S. ET ALL. An improved semiautomated rapid method of extracting genomic DNA for molecular marker analysis in *Cocoa, Theobroma cacao* L. *Plant Mol. Biol. Rep* [online]. Springer-Verlag, 2004, [cit. 03.09.2012], 22(4), 435–436. DOI: 10.1007/BF02772686. Dostupné tiež z: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02772686#citeas>. ISSN: 0735-9640.
- [22] Henry, R.J., Plant DNA extraction [online]. 2001. DOI: 10.1079/9780851995151.0239. Dostupné tiež z: <https://www.researchgate.net/publication/37357649> Plant DNA extraction.

- [23] GRYSOŇ, N. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review *Anal Bioanal Chem* [online]. Springer-Verlag, 2010, [cit. 15.12.2009], 396(6), 2003-2022. DOI: 10.1007/s00216-009-3343-2. Dostupné tiež z: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00216-009-3343-2#citeas>. ISSN: 1618-2642.
- [24] LODHI, M. A., YE, G. N., WEEDEN, N. F., REISCH, B. I., A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis*. *Plant Mol. Biol Rep.* [online]. Springer Netherlands, 1994, 12 (1), 6–13. DOI: 10.1007/BF02668658. Dostupné tiež z: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02668658#citeas>. ISSN: 0735-9640.
- [25] RECHNER, A. R., KUHNLE, G., BREMNER, P., HUBBARD, G. P., MOORE, K. P., RICE-EVANS, C. A. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic Biol Med* [online]. Elsevier, 2002, [cit. 02.07.2002], 33 (2), 220-235. DOI: 10.1016/S0891-5849(02)00877-8. Dostupné tiež z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584902008778?via%3Dihub>.
- [26] JOHN, M. E., An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Res* [online]. 1992, [cit. 03.02.1992], 20 (9), 2381. Dostupné tiež z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC312364/pdf/nar00083-0172.pdf>
- [27] SENEYI A, WIDDER K., CZERLINSKI. Magnetic guidance of drug carrying microspheres. *J Appl Phys.* 1978, 49; 3578-83.
- [28] WIDDER, KJ., SENEYEL, A.E., ACARPELLI, GD. Magnetic microspheres: a model system of site specific drug delivery in vivo. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1978, 158:141-6.
- [29] SAIYED, ZM, SD TELANG a CN RAMCHAND. Application of magnetic techniques in the field of drug discovery and biomedicine. *Biomagnetic Research and Technology* [online]. BioMed Central, 2003, 1, 2-2 [cit. 18.09.2003]. DOI: 10.1186/1477-044X-1-2. Dostupné tiež z: <https://biomagres.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-044X-1-2>
- [30] RITTICH, B., ŠPANOVÁ, A. SPE and purification of DNA using magnetic particles. *Journal of Separation Science* [online]. 2013, [cit. 30.03.2013], 36(15), 2472–2485. DOI: 10.1002/jssc.201300331. Dostupné tiež z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201300331>.
- [31] PEČOVÁ, A., ZAJONCOVÁ, L., POLÁKOVÁ, K., et al. Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich využití v biochemii a biotechnologii. *Chemické listy.* 2011, (105), 524-530.
- [32] DOBSON, J., McBAIN, S. C., YIU, HP. H. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2008, [cit. 06.06.2008], 3(2), 169-180. DOI: 10.2147/IJN.S1608. Dostupné také z: <https://www.dovepress.com/magnetic-nanoparticles-for-gene-and-drug-delivery-peer-reviewed-article-IJN>
- [33] KAPIČKA, A., PETROVSKÝ, E.. Magnetické mikročástice kolem nás. *Vesmír* 90. 2011, 336,6. Dostupné tiež z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2011/cislo-6/magneticke-mikrocastice-kolem-nas.html>
- [34] KUČÍRKOVÁ, L., KRÁLOVEC, K., HAVELEK, R., BRČKOVÁ, L., SEDLÁK, M. Toxicita magnetických nanočastic. *Chemické listy.* 2015, (109), 693-700.

- [35] ŠAFARÍK, I., ŠAFARÍKOVÁ, M. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *BioMagnetic Research and Technology* [online]. 2004, [cit. 26.11.2004], 2:7. DOI: 10.1186/1477-044X-2-7. Dostupné také z: <https://biomagres.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-044X-2-7>.
- [36] KAWAGUCHI, H. Functional polymer microspheres. *Prog Polym Sci.* 2000;25(8):1171–210. Dostupné tiež z: http://www.mit.edu/course/10/10.569/www/Funct_polym_microsphr.pdf
- [37] HORÁK, D., RITTICH, B., ŠPANOVÁ, A., BENEŠ, M. J.: Magnetic microparticulate carriers with immobilized selective ligands in DNA diagnostics. *Polymer* [online]. Elsevier, 2005, [cit. 02.12.2004], vol. 46 (4), 1245-1255. DOI: 10.1016/j.polymer.2004.11.049. Dostupné tiež z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386104011553>
- [38] HORÁK, S., SEMENYUK, N., LEDNICKÝ, F.: Effect of the reaction parameters on the particle size in the dispersion polymerization of 2-hydroxyethyl and glycidyl methacrylate in the presence of ferrofluid. *Journal of Polymer Science. Part A: Polymer Chemistry* [online].2003, vol. 41, 1848-1863. DOI: 10.1002/pola.10728. Dostupné tiež z : https://www.researchgate.net/journal/1099-0518_Journal_of_Polymer_Science_Part_A_Polymer_Chemistry.
- [39] MULLIS, K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *SCI AM.* 1990 , 262(4):56-61, 64-5. Dostupné tiež z: <https://pdfs.semanticscholar.org/14bf/9cc89c9885d7ad46a384d0e5661ac07c752f.pdf>
- [40] LISBY, G. Application of nucleic acid amplification in clinical microbiology. *Mol Biotechnol* [online]. Humana Press, 1999, 12(1), 75-99. DOI: 10.1385/MB:12:1:75. Dostupné tiež z: <https://link.springer.com/article/10.1385%2FMB%3A12%3A1%3A75>. ISSN: 1073-6085.
- [41] SINGH, A., SINGH, N.P., SHARMA, V., VERMA, H.N., Arora K. *Molecular Techniques. Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications.* 2012, Pages 407-461. DOI: 10.1016/B978-0-12-384862-8.00013-3. Dostupné tiež z: <https://www.sciencedirect.com/book/9780123848628/chemical-analysis-of-food-techniques-and-applications>
- [42] CHIEN, A., EDGAR, D.B., TRELA, J.M. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol.* 1976 Sep; 127(3): 1550–1557. Dostupné tiež z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC232952/?page=1>
- [43] JOSHI, M., DESHPANDE, J.D. POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION. *International Journal of Biomedical Research.* 2010, 2(1), 81-97. DOI: 10.7439/ijbr.v2i1.83. Dostupné také z: <http://ssjournals.com/index.php/ijbr/article/view/640>
- [44] ŠPANOVÁ, A., RITTICH, B. Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. ISBN 978-80214-4004-3.
- [45] GARIBYAN, L., AVASHIA, N. Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Invest Dermatol* [online]. Elsevier, 2013, [cit. 08.12.2015], 133(3), 1-4. DOI: 10.1038/jid.2013.1. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X1536139X>.

- [46] WALKER, J.M., RAPLEY, R.. Principles and Medical Applications of the Polymerase Chain Reaction. Molecular biotechnology handbook. 2nd ed. / Totowa, NJ: Humana Press, c2008, s. 29-40. Dostupné tiež z: <https://www.springer.com/fr/book/9781603273701#aboutBook>. ISBN 978-1-60327-374-9
- [47] LIMA-FILHO, P.A., BERTOLLO, L.A.C., CIOFFI, M.B., COSTA, G.W.W.F., MOLINA, W.F. Karyotype Divergence and Spreading of 5S rDNA Sequences between Genomes of Two Species: Darter and Emerald Gobies (*Ctenogobius*, Gobiidae). *Cytogenet Genome Res* [online]. 2014, [cit. 13.03.2014], 142,197-203. DOI:10.1159/000360492. Dostupné tiež z: <https://www.karger.com/Article/Abstract/360492>. ISSN: 1424-8581.
- [48] KUPRIYANOVA, N.S., KIRILENKO, K.M., NETCHVOLODOV, K.K., RYSKOV, A.P. Preferential Cleavage Sites for *Sau3A* Restriction Endonuclease in Human Ribosomal DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. Elsevier, 2000, [cit. 25.05.2002], 274 (1), 11-15. DOI: 10.1006/bbrc.2000.3088. Dostupné tiež z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X00930882>.
- [49] SOCHOROVÁ a spol. J. databáza živočíšné rDNA. Brno. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2019. 92s. Vedoucí disertační práce RNDr. Aleš Kovařík, CSc.
- [50] IDE, S., MIYAZAKI, T., MAKI, H., KOBAYASHI, T. Abundance of ribosomal RNA gene copies maintains genome integrity. *Science*. 2010, 327(5966), 693-696. DOI: 10.1126. Dostupné tiež z: <http://science.sciencemag.org/content/327/5966/693.long>
- [51] HEMLEBEN, V., ZENTGRAF, U. 1994. Structural organisation and regulation of transcription by RNA polymerase I of plant nuclear ribosomal gene. *Plant Promoters and Transcription Factors* [online]. Springer, Berlin, Heidelberg, 1994, 3-24. DOI: 10.1007/978-3-540-48037-2_1. Dostupné tiež z: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-48037-2_1#citeas. ISBN: 978-3-662-22304-8.
- [52] ZHANG, W., YUAN, Y., YANG, S., HUANG, J., HUANG, L. ITS2 Secondary Structure Improves Discrimination between Medicinal “*Mu Tong*” Species when Using DNA Barcoding. 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0131185. Dostupné tiež z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131185>
- [53] CHENG, TAO & XU, CHAO & LEI, LI & LI, CHANGHAO & ZHANG, YU & ZHOU, SHILIANG. Barcoding the kingdom Plantae: New PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. *Molecular ecology resources*. 2016, 16(1), 138-49. DOI:10.1111/1755-0998.12438. Dostupné tiež z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26084789>.
- [54] HEINZE B. A database of PCR primers for the chloroplast genomes of higher plants. *Plant Methods*. 2007; 3 (4). DOI:10.1186/1746-4811-3-4. Dostupné tiež z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1821018/?report=reader>
- [55] KOVARIK, A. a spol. Rapid Concerted Evolution of Nuclear Ribosomal DNA in Two *Tragopogon* Allopolyploids of Recent and Recurrent Origin. *Genetics*. 2005, 169 (2), 931-944. DOI: 10.1534/genetics.104.032839. Dostupné tiež z: http://www.genetics.org/content/169/2/931?panels_ajax_tab_tab=jnl_genetics_cite_apa&panels_ajax_tab_trigger=.

[56] YOONG LIM, K., A. KOVARIK, R. MATYÁŠEK, M. BEZDĚK, C. P. LICHTENSTEIN a A. R. LEITCH. Gene conversion of ribosomal DNA in *Nicotiana tabacum* is associated with undermethylated, decondensed and probably active gene units. *Chromosoma*. Springer-Verlag, 2000, 109 (3), 161-172. DOI: 10.1007/s004120050424. ISSN 0009-5915.

Dostupné tiež z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s004120050424>.

[57] TROJÁNEK, Z., KOVAŘÍK, A., ŠPANOVÁ, A., MAROŠIOVÁ, K., HORÁK, D., RITTICH, B. Application of magnetic polymethacrylate-based microspheres for the isolation of DNA from raw vegetables and processed foods of plant origin. *Journal of food processing and preservation*. 2017, 42(1). DOI: 10.1111/jfpp.13384.

[58] LUNEROVÁ a spol. *Plant Systematics and Evolution*. 2017, 303, 1043-1060.

[59] SURÁ, T. Optimalizace nové mikrometody izolace DNA z potravin. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 75 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc..

[60] SOBOLEV., ANATOLY, P., CIRCI, S., CAPITANI, D., INGALLINA, C., MANNINA L. Molecular fingerprinting of food authenticity. *Current Opinion in Food science*[online]. Elsevier, 2017, [cit. 14.08.2017], 16, 59-66. DOI: 10.1016/j.cofs.2017.08.002. Dostupné tiež z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214799317300541>.

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

BAC	<u>B</u> io <u>A</u> ctive <u>C</u> ompounds (Bioaktívne zlúčeniny)
bp	pár bází (base pair)
cDNA	complementary DNA (komplementárna DNA)
CTAB	cetyl triethylamónium bromid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
DTT	dithiothreitol
EDTA	etyléndiamintetraoctová kyselina
EFSA	<u>E</u> uropean <u>F</u> ood <u>S</u> afety <u>A</u> uthority (Európsky úrad pre bezpečnosť potravín)
FDA	<u>F</u> ood and <u>D</u> rug <u>A</u> ministration
GMA	glycidylmethakrylát
HEMA	hydroxyethylmethakrylát
ITS	<u>i</u> nternally <u>t</u> ranscribed <u>s</u> pacer
NaCl	chlorid sodný
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PEG	polyethylénglykol
rDNA	ribozomálna DNA
rRNA	ribozomálna ribonukleová kyselina
SDS	laurylsíran sodný
P(HEMA-co-GMA)	magnetické častice poly(2-hydroxyethylmethakrylát-co-glycidylmethakrylát)
PVP / PVPP	polyvinylpyrolidón / polyvinylpolypyrolidón
TBE	Tris-borát-EDTA
TE	Tris-EDTA