



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

**OPTIMALIZACE NOVÉ MIKROMETODY
IZOLACE DNA Z POTRAVIN**

OPTIMALISATION OF A NEW MICROMETHOD OF DNA ISOLATION FROM FOODS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Tereza Surá

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

BRNO 2018

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1243/2017
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Tereza Surá**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. RNDr. Alena Španová, CSc.**
Akademický rok: 2017/18

Název diplomové práce:

Optimalizace nové mikrometody izolace DNA z potravin

Zadání diplomové práce:

1. Vyhledání a zpracování literatury k dané problematice
2. Izolace DNA s využitím magnetických částic
3. Ověření kvality izolované DNA
4. Zpracování získaných experimentálních výsledků
5. Vyhodnocení získaných výsledků formou diskuse

Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

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

Bc. Tereza Surá
student(ka)

doc. RNDr. Alena Španová, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Diplomová práce byla zaměřena na optimalizaci mikrometody izolace DNA v kvalitě vhodné pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR) pomocí magnetických mikročástic z potravin rostlinného původu. Pro analýzu byla vybrána červená řepa (čerstvá, mražená, sušená, sterilovaná) a potravinové výrobky obsahující červenou řepu. Byly porovnávány a optimalizovány různé způsoby zpracování homogenátů. Homogenáty byly připraveny v lyzačním pufru s cetyltrimethylamonium bromidem (CTAB) s různým množstvím NaCl bez a s přidavkem organického extrakčního činidla chloroform- oktanolu a isopropanolu. Mikroizolace DNA byla provedena pomocí magnetických částic P(GMA). Byla testována koncentrace NaCl a polyethylenglykolu (PEG) 6000 v separačních směsích. Byl porovnáván vliv na výtěžek a čistotu izolované DNA a navržen optimální poměr množství NaCl v CTAB pufru a koncentrace PEG 6000 v separační směsi. Optimální separační směs pro izolaci DNA z červené řepy byla aplikována na potravinové výrobky obsahující červenou řepu. Amplifikovatelnost DNA byla testována v konvenční PCR, kde byly použity specifické primery pro rostlinnou DNA. Produkty PCR o velikosti asi 700 bp byly detegovány pomocí agarózové gelové elektroforézy.

ABSTRACT

The thesis were focused on the optimalization of micromethod for isolation of DNA in quality for polymerase chain reaction (PCR) using magnetic microparticles from plant food products. There were chosen a red beetroot (fresh, frozen, dried and sterilized) for the analysis and food products containing red beetroot. Different approaches of processing of homogenates were compared and optimized. The homogenates were prepared in lysis buffer with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) with different amounts of NaCl with or without addition of organic extraction agents chloroform-octanol and isopropanol. Microisolation of DNA was performed using magnetic particles P(GMA). The concentration of NaCl and polyethylene glycol (PEG) 6000 in separation mixtures was tested. The influence on quantity and purity of isolated DNA was compared and the optimum amounts of NaCl in CTAB buffer and optimal concentration of PEG 6000 in separation mixtures were compared. The optimized separation mixture for the DNA isolation from red beetroot was applied to food products containing red beetroot. Amplifiability of DNA was tested in conventional PCR using specific primers for plant DNA. PCR products of length 700 bp were detected by agarose gel electrophoresis.

KLÍČOVÁ SLOVA

Izolace DNA, mikrometoda, optimalizace, magnetické mikročástice, PCR, červená řepa, potraviny

KEYWORDS

Isolation of DNA, micromethod, optimalization, magnetic microparticles, PCR, red beetroot, foods

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..

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Touto formou bych ráda poděkovala především vedoucí mé diplomové práce paní doc. RNDr. Aleně Španové, CSc. za odborné vedení, cenné připomínky a čas, který mi věnovala. Zvláštní poděkování patří mé rodině a příteli za podporu a trpělivost během celého studia.

OBSAH

ÚVOD	8
I. TEORETICKÁ ČÁST	9
1 Autenticita potravin	9
1.1 Metody detekce falšování.....	9
1.1.1 Metody založené na analýze DNA.....	9
1.1.2 Chromatografické metody.....	10
1.1.3 Spektroskopické analýzy.....	10
1.1.4 Analýza stabilních izotopů.....	10
2 Přírodní barviva v potravinách	11
2.1 Přibarvování potravin.....	11
2.2 Červená řepa.....	11
2.2.1 Chemické složení	12
3 Izolace rostlinné DNA	13
3.1 Uchovávání vzorků	13
4 Magnetické mikročástice	14
4.1 Vlastnosti mikročástic	14
4.1.1 Materiál magnetických mikročástic	14
4.2 Izolace DNA pomocí magnetických mikročástic.....	15
5 Polymerázová řetězová reakce	16
5.1 Komponenty pro PCR	16
5.2 Amplifikační cyklus	16
5.2.1 Denaturace.....	17
5.2.2 Hybridizace	17
5.2.3 Elongace.....	17
5.3 PCR v reálném čase.....	18
5.4 Inhibitory PCR	18
6 CÍL PRÁCE	19
II. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
7 Materiál a metody	20
7.1 Rostlinný materiál	20
7.2 Chemikálie	22
7.2.1 Magnetické mikročástice.....	23
7.2.2 Komponenty pro PCR	23
7.3 Přístroje a pomůcky.....	23
7.4 Roztoky	23
7.4.1 Roztoky pro izolaci rostlinné DNA.....	24
7.4.2 Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu	24

7.5	Metody	24
7.5.1	Homogenizace a příprava homogenátů z rostlinných buněk pro izolaci DNA....	24
7.5.1.1	Homogenizace lyzačním roztokem s CTAB	24
7.5.1.2	Přídavek chloroform-oktanolu	24
7.5.1.3	Přídavek isopropanolu.....	25
7.5.2	Izolace DNA magnetickými mikročásticemi	25
7.5.3	Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA.....	27
7.5.4	Příprava směsí pro PCR a podmínky amplifikace	27
7.5.5	Gelová elektroforéza produktů PCR	28
8	Výsledky	30
8.1	Zpracování rostlinného materiálu pro analýzu.....	30
8.1.1	Homogenizace a příprava homogenátů	30
8.2	Množství a kvalita DNA izolované pomocí magnetických mikročástic.....	31
8.2.1	Stanovení koncentrace a čistoty DNA	31
8.2.2	Amplifikace DNA pomocí PCR.....	32
8.3	Izolace DNA z čerstvé, zmražené, sušené a sterilované červené řepy.....	34
8.3.1	Stanovení koncentrace a čistoty DNA	34
8.3.2	Amplifikace DNA pomocí PCR.....	35
8.4	Testování množství homogenátu a NaCl v separační směsi	37
8.4.1	Eluce DNA do stejného objemu elučního pufru jako byl objem homogenátu.....	37
8.4.1.1	Amplifikace DNA pomocí PCR.....	38
8.4.2	Eluce DNA do objemu elučního pufru 25 µl	40
8.4.2.1	Amplifikace DNA pomocí PCR.....	41
8.5	Testování izolace DNA z homogenátů s různým množstvím NaCl.....	43
8.5.1	Izolace DNA z homogenátů v CTAB s 1,5 M NaCl.....	43
8.5.1.1	Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA.....	43
8.5.1.2	Amplifikace DNA pomocí PCR.....	44
8.5.2	Izolace DNA z homogenátů v CTAB s 2 M NaCl.....	46
8.5.2.1	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA	46
8.5.2.2	Amplifikace DNA pomocí PCR.....	47
8.5.3	Izolace DNA z homogenátů v CTAB s 2,5 M NaCl.....	48
8.5.3.1	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA	48
8.5.3.2	Amplifikace DNA pomocí PCR.....	49
8.5.4	Izolace DNA z homogenátů v CTAB s 3 M NaCl.....	51
8.5.4.1	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA	51
8.5.4.2	Amplifikace DNA pomocí PCR.....	52
8.5.5	Porovnání množství a kvality izolované DNA.....	53
8.5.5.1	Množství izolované DNA.....	53
8.5.5.2	Kvalita DNA	54
8.5.5.3	Amplifikace DNA v PCR.....	56
8.6	Optimalizace teploty a doby eluce	56
8.6.1	Stanovení koncentrace a čistoty DNA	56
8.6.2	Amplifikace DNA pomocí PCR.....	58
8.7	Izolace rostlinné DNA z potravinových výrobků obsahujících červenou řepu	59
8.7.1	Stanovení koncentrace a čistoty DNA	59
8.7.1.1	Amplifikace DNA v PCR.....	60
8.7.2	Přečištění DNA přesrážením isopropanolem	60
8.7.3	Amplifikace DNA pomocí PCR.....	61

8.7.3.1	PCR s primery 18S_for a 5,8S_rev	61
8.7.3.2	PCR s primery 26S_for a 26S_rev	63
9	Diskuze	64
9.1	Zpracování rostlinného materiálu pro analýzu DNA	64
9.2	Množství a kvalita DNA izolované pomocí magnetických mikročastic	64
9.3	Izolace DNA z čerstvé, zmražené, sušené a sterilované červené řepy	64
9.4	Testování množství homogenátu a NaCl v separační směsi	65
9.4.1	Eluce DNA do stejného objemu elučního pufru jako byl objem homogenátu.....	65
9.4.2	Eluce DNA do objemu elučního pufru 25 µl	65
9.5	Testování izolace DNA z homogenátů s různým množstvím NaCl.....	66
9.6	Optimalizace teploty a doby eluce	66
9.7	Izolace rostlinné DNA z potravinových výrobků obsahujících červenou řepu	66
	ZÁVĚR.....	68
	Seznam použitých zdrojů.....	69
	Seznam použitých zkratk.....	74
	Příloha	75

ÚVOD

V posledních letech se autenticita potravinářských výrobků stala zásadní otázkou, neboť byly odhaleny častější případy falšování potravin. Potravinu mohou být náhodně nebo úmyslně kontaminovány chemickými či fyzikálními látkami, které by neměly být přítomny z právních nebo jiných důvodů. Zneužití potravinových výrobků pro ekonomický zisk nahrazením levnějšími surovinami či chemickými látkami by mohlo představovat vážné ohrožení zdraví spotřebitelů. Byly zaznamenány případy falšování koření barvivem nebo přítomnost nezákonných antibiotik v medu. Známa je také kauza irské vepřové krize, kdy bylo staženo vepřové maso z oběhu v důsledku kontaminace dioxinem. Také falšování olivového oleje olejem z lískových ořechů způsobuje ekonomickou ztrátu několika milionů eur ročně. [1] Nejčastěji jsou falšovány drahé a luxusní potraviny (lihoviny, víno, koření) nebo potraviny, které jsou prodávány ve velkých objemech (masné a mléčné výrobky, tuky a oleje, ovocné šťávy). [2] Důraz je také kladen na potvrzení pravosti potravin, aby se zachovala kvalita a spokojenost spotřebitelů a zamezilo se tak potravinovým podvodům.

S narůstajícími trendy v oblasti falšování potravin je zapotřebí rychlých, spolehlivých a kompetentních analytických metod k řešení problémů autentizace a zajištění kvality produktů. Pro odhalení falšování a detekci pravosti v potravinách a zemědělských komoditách se používá řada fyzikálních a chemických metod. [1] Jedním ze způsobů detekce jsou metody založené na analýze DNA, které se využívají k rozlišení druhů nebo detekci geneticky modifikovaných organismů v potravinách. Molekulárně diagnostické metody patří mezi moderní techniky, které se v posledních letech těší velké popularitě především díky své rychlé, citlivé a specifické analýze. Mezi nejznámější metody detekce se řadí polymerázová řetězová reakce (PCR), založená na amplifikaci specifické sekvence DNA.

Důležitým krokem před amplifikací je izolace DNA v kvalitě vhodné pro PCR. Izolace rostlinné DNA je komplikovaná zejména kvůli obsahu celé řady metabolitů, jako jsou polysacharidy, polyfenoly nebo proteiny. Tyto látky mohou inhibovat v PCR a nepříznivě tak ovlivnit výsledek reakce. Proto je nezbytné snížit jejich množství na minimum a připravit optimální postup pro izolaci rostlinné DNA.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 AUTENTICITA POTRAVIN

Potravinu lze označit za autentické pouze tehdy, jsou-li vyrobeny podle stanovených postupů, a když všechny kroky výroby potravin a dodavatelského řetězce přesně respektují daná kritéria. Na molekulární úrovni to znamená, že výrobek má chemické složení, které je pro danou potravinu odpovídající. [3]

S falšováním potravin se setkáváme již od dob, kdy začaly být vyráběny za účelem prodeje. Nejčastěji šlo o nahrazování drahých surovin levnějšími. [2] Dnes se mimo to označuje za falšování potravin také nedodržení deklarovaného technologického postupu, uvádění vyššího než skutečného obsahu složky, nesprávné uvádění geografického původu nebo způsobu produkce, zneužití známé značky či přítomnost nedeklarovaných složek. [2] Potravinový podvod je globální problém, který poškozují pověst firem, narušuje trhy a důvěru spotřebitelů. Za nejčastěji falšované potraviny jsou uváděny v mezinárodních databázích koření a byliny, olivový olej, mořské plody, mléčné výrobky, maso a jiné oleje a tuky. [5]

Náhodná či záměrná substituce cenných složek potravin jinými složkami s nižší hodnotou může vést ke zdravotním komplikacím nebo alergiím. S důrazem na ochranu spotřebitele souvisí vývoj vhodných a robustních analytických metod pro rutinní hodnocení pravosti. Zejména identifikace druhů se stala hlavním problémem při ověřování potravin. Identifikaci druhů lze provést stanovením charakteristických malých molekul, pomocí testů založených na bílkovinách (imunochemické metody) nebo pomocí testů založených na DNA. [4]

1.1 Metody detekce falšování

Postupy detekce falšování zahrnují dva přístupy, které se v principu prolínají. Vycházejí ze skutečnosti, že autentický produkt obsahuje charakteristické látky v určitém množství odpovídajícím použitým surovinám a technologiím. První přístup zahrnuje ověření hypotézy o určitém konkrétním způsobu falšování, které je potvrzováno analýzou konkrétních markerů a souvisí s předpokládaným postupem falšování. Druhý přístup obsahuje analýzu více složek obvykle většího souboru vzorků potravin. Získané výsledky jsou analyzovány statistickými metodami, nejčastěji metodou analýzy hlavních komponent nebo shlukovou analýzou. [2]

Vývoj metod hodnocení autenticity potravin a detekce falšování je stále se rozvíjející proces. Objevují se nové možnosti zejména instrumentálních postupů a současné analýzy tak mohou probíhat rychleji, levněji a s vyšší citlivostí. Jedná se však o trvalý souboj s velmi kompetentní protistranou nepoctivých výrobců. Tito výrobci velmi rychle po zavedení postupů odhalující určitý způsob falšování, tento postup falšování zdokonalí, aby nebyl stávající metodou zjištělný. [2]

1.1.1 Metody založené na analýze DNA

Metody založené na analýze DNA využívají jedinečnosti ve struktuře DNA pro autentizaci potravin. Využívá se detekce jednonukleotidového polymorfismu, polymorfismu délky restričních fragmentů, délky sekvence v PCR, včetně použití PCR v reálném čase. [2, 6] Výhodou těchto metod je fakt, že DNA je přítomna ve všech buňkách organismu a tím se usnadňuje odběr vzorků. DNA je extrahovaná z vybrané potravinu a cílový fragment DNA je amplifikován pomocí metody PCR. Amplikony, které jsou amplifikovány, jsou následně

analyzovány např. agarózovou gelovou elektroforézou, sekvencováním nebo pomocí HRM analýzy. [2, 7, 8, 9]

Tyto metody se používají např. k detekci druhů brambor, detekci „exotických“ druhů masa, rozlišení pstruha mořského a lososa, identifikaci masa lososa nebo tuňáka v konzervách, identifikaci basmati rýže ve směsích rýže, detekci pšenice seté v těstovinách nebo k identifikaci použitých druhů ovoce. [2]

1.1.2 Chromatografické metody

Chromatografické metody jsou standardně používány k autentizaci potravin. Nejčastěji používané metody jsou plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) a kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) pro analýzu konkrétních markerů při průkazech předpokládaného způsobu falšování. Zejména s využitím GC jsou používány „fingerprint“ metody nebo analýzy profilů těkavých látek, profilů mastných kyselin, sterolů, vysokoteplotní GC triacylglycerolů, HPLC profily sacharidů, RP-HPLC profily extraktů sýrů atd. [2]

1.1.3 Spektroskopické analýzy

Dalšími metodami k analýze potravin včetně autentizace a detekce falšování jsou tradičně využívány techniky infračervené spektroskopie (IČ). Z oblasti spekter vyplývají informace o chemických vazbách a o typech molekul v potravině. IČ spektrometrie je příkladem chemometrických postupů, kdy jsou analyzované vzorky porovnávány s databází. Z dalších spektroskopických technik je popsáno např. použití Ramanovy spektroskopie a chemometrické analýzy pro detekci různých hladin falšování olivového oleje lískovým olejem. [2]

1.1.4 Analýza stabilních izotopů

Základní prvky se v živých materiálech nacházejí ve dvou hlavních stabilních izotopech a analýza poměrů izotopů ($^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) je využívána při hodnocení autenticity potravin. Je analyzován poměr stabilních izotopů uhlíku, poměr je závislý na typu metabolického procesu a způsobu využívání vzdušného oxidu uhličitého. [2]

Díky rozvoji instrumentálních metod jako hmotnostní spektrometrie izotopových poměrů a místně specifická frakcionace přirozených izotopů byla umožněna aplikace těchto metod zejména při autentizaci vín, prokazování ředění vín vodou [11] nebo přídavků hydrolyzátů kukuřičného škrobu do medu. Dále je možné například rozlišení kvasného a syntetického octa, kvasného a syntetického lihu nebo určení geografického původu různých rostlin a jejich produktů. [12]

2 PŘÍRODNÍ BARVIVA V POTRAVINÁCH

Potraviny, zejména ovoce a zelenina, obsahují přírodní barviva z převážně čtyř skupin pigmentů. Jsou to zelené chlorofyly, žlutooranžově červené karotenoidy, purpurové antokyany a červený betanin. Tyto sloučeniny si v posledních letech získaly značnou pozornost nejen jako přírodní barviva, ale především díky svým zdraví prospěšným účinkům. Použití přírodních barviv je současný trend zejména kvůli nedůvěře spotřebitelů ohledně bezpečnosti umělých potravinových barviv. Přítomnost přírodních barviv v potravinách však vyžaduje více pozornosti. Jsou obvykle méně stabilní, dražší, nejsou tak snadno použitelné jako umělá barviva, potřebují více materiálu k dosažení ekvivalentní barvy a mají omezený rozsah odstínů. [13]

2.1 Přibarvování potravin

Přibarvování se v potravinářství využívá k vylepšení schopnosti potravin zachovat si kvalitu a stálost, případně k zlepšení organoleptických vlastností. Barviva potravinám dodávají jejich přirozenou barvu, kterou ztratily při zpracování. Především u potravin zpracovaných pomocí hydrotermické operace dochází ke značným změnám barvy. Přibarvováním můžeme zajistit estetické vylepšení výrobku, aby co nejdříve připomínal zpracovanou surovinu v čerstvém stavu. Při zpracování různých odrůd a surovin v rozdílném stavu zralosti lze rovněž dosáhnout jejich přibarvením lepší barvy a získat tím atraktivní vzhled potraviny. Existují okolnosti, kdy se přibarvením odstraní rozdíly vyvolané sezónními výkyvy, např. u másla. Přibarvování potravin je legislativně upraveno a barviva nelze přidávat v případě, že se jedná o zastírání zjevné vady kvality, hygienické závady nebo případně nežádoucí postupy a techniky. Taktéž se barviva nesmí používat u nezpracovaných produktů, např. mléka, masa, medu apod. [22, 13] V případě výrobků z červeného a modrého ovoce jsou povolena barviva a barvicí potraviny uvedené v Tabulce 1.

Tabulka 1: Barviva a barvicí potraviny ve výrobcích z červeného a modrého ovoce. [22]

Druh výrobku	Povolená přidaná barviva	Barviva použitelná s omezením	Další možnosti přibarvování
100% ovocné šťávy	žádná	žádná	neuvedeno
Extra džemy a rosoly	žádná	žádná	červené ovocné šťávy
Dětská výživa	žádná	žádná	neuvedeno
Džemy, pomazánky, zmrzliny, ochucené nápoje	karoteny (E 160a), paprikový extrakt (E 160c), betanin (E 162), anthokyany (E 163), košenila (E 120), azorubin (E 122), ponceau 4R (E 124), allura red AC (E 129)	E 120, E 122, E 124 a E 129 mají určený maximální stanovený limit	červené ovocné šťávy, šťáva z červené řepy

2.2 Červená řepa

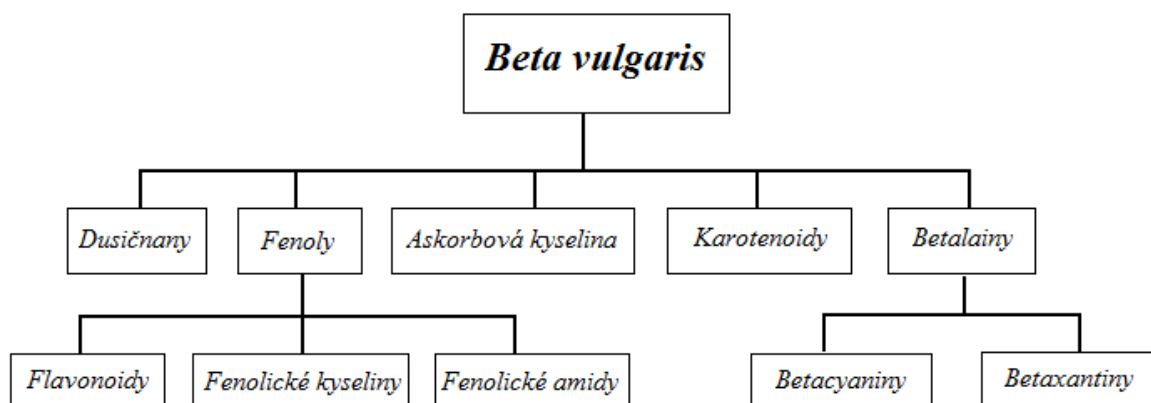
Červená řepa (*Beta vulgaris rubra*) je kořenová zelenina z čeledi *Chenopodiaceae*, která se běžně konzumuje v tradiční západní kuchyni a má dlouhou historii použití v lidové medicíně. Tato zelenina představuje rychle obnovitelný a levný zdroj živin. Moderní farmakologie ukazuje, že červená řepa obsahuje sekundární metabolity, tzv. betalainy. Tyto

metabolity obsahují dva hlavní pigmenty, konkrétně červený betacyanin (obsahující především betanin) a žlutý betaxantin (s hlavní složkou vulgaxanthin I). Využití našly především jako přírodní barviva v potravinářském průmyslu. Vykazují také účinnou antioxidační, protizánětlivou a protinádorovou aktivitu. Z tohoto hlediska může být červená řepa považována za funkční potravinu. [31] Řepa je významným zdrojem dusičnanů a proto je přirozeným prostředkem pro zvýšení oxidu dusnatého v těle. Pravidelný příjem řepy se ukázal jako možná strategie při prevenci a odhalování chorob spojených se sníženou biologickou dostupností oxidu dusnatého, zejména zvýšeného krevního tlaku a endotelových dysfunkcí. [33]

2.2.1 Chemické složení

Největší podíl složek v bulvě červené řepy zaujímá voda. Řepa dále obsahuje sacharidy, bílkoviny, vlákninu, minerální látky a vitamíny. Mezi nejvíce zastoupené minerální látky můžeme zařadit draslík 2 410 mg/kg, sodík 860 mg/kg a fosfor 450 mg/kg. Červená řepa se považuje také za dobrý zdroj manganu 7,0 mg/kg, železa 8,9 mg/kg a jódu 0,066 mg/kg. Vysoký podíl železa pozitivně ovlivňuje produkci červených krvinek a s tím spojené okysličování tkání. Největší obsah vitamínů v červené řepě zaujímá vitamín C 114 mg/kg, dále jsou to vitamíny B₆ 2,24 mg/kg, B₂ 0,50 mg/kg a B₉ 1,5 mg/kg, které jsou známy svými preventivními ochrannými účinky. [31, 14, 15, 16, 17, 18]

Řepa je bohatým zdrojem fytochemických sloučenin (Obrázek 1), který zahrnuje kyselinu askorbovou, karotenoidy, fenolové kyseliny a flavonoidy. Červená řepa je také jednou z mála zelenin, která obsahuje skupinu vysoce bioaktivních pigmentů známých jako betalainy. Tyto pigmenty (betacyaninové a betaxantiové) způsobují červeno-fialové a žluto-oranžové zbarvení červené řepy a jsou především schopny působit jako prevence před oxidačním stresem a chronickým zánětem, artritidou a dokonce i rakovinou. [33]



Obrázek 1: Složení červené řepy, upraveno dle [33]

3 IZOLACE ROSTLINNÉ DNA

Při izolaci DNA z tkání buněk nastává řada problémů zejména s použitím rostlin jako výchozího materiálu. Odlišné charakteristiky rostlin, jako je přítomnost tuhé polysacharidové buněčné stěny, pigmenty nebo sekundární metabolity, vyžadují při izolaci zvláštní pozornost. [26] Polyfenoly a polysacharidy se mohou pevně vázat na nukleové kyseliny během izolace DNA a zasahovat do následných reakcí. K dispozici je řada metod, které se vyvíjejí pro izolaci nukleových kyselin z rostlin. Protože však rostliny obsahují velké množství různých látek, nelze použít jednotnou metodu izolace nukleové kyseliny vhodnou pro všechny rostliny. [28]

Pro izolaci rostlinné DNA se nejčastěji používá lyzační pufr s cetyltrimethylamonium bromidem (CTAB), obsahující CTAB, NaCl, EDTA a Tris-HCl. [34] Použití lyzačního pufru s CTAB umožňuje rychlou a spolehlivou homogenizaci rostlinné DNA obsahující polysacharidy a sekundární metabolity, které snižují výtěžek DNA. Přítomnost polysacharidů v izolované DNA se vyznačuje tvorbou vysoce viskózního roztoku, který může inhibovat enzymatickou aktivitu Taq polymerázy a restriktáz. Oxidovanou formu polyfenolů kovalentně vázaných na DNA lze rozpoznat na základě hnědého zbarvení. [26, 35] Při izolaci DNA pomocí CTAB metody bylo potvrzeno, že přidavek antioxidantu β -merkптоethanolu k lyzačnímu pufru úspěšně odstraňuje polyfenoly. Použití vysoké koncentrace NaCl napomáhá odstranit polysacharidy. [26, 35, 36] Použití chloroform- oktanolu napomáhá odstranit proteiny, stejně jako přesrážení DNA isopropanolem.

3.1 Uchovávání vzorků

Důležitým prvkem je také správná manipulace a skladování rostlinné tkáně. Pro izolaci DNA se rostlinný materiál obvykle shromažďuje čerstvý a přímo se zpracovává. V případě potřeby delšího uchovávání se skladuje při teplotě -18°C , -80°C nebo v kapalném dusíku. Zmrazením dochází k zastavení nukleázové aktivity, která DNA degraduje. Další volbou jsou vzorky uložené ve formě lyofilizované tkáně, které mohou být skladovány po dobu několika let jen s malou ztrátou kvality DNA. [26]

4 MAGNETICKÉ MIKROČÁSTICE

Poprvé byly mikročástice použity kolem roku 1970 ve farmaceutickém průmyslu jako součást perorálně podávaného léčiva, avšak většího rozvoje se metoda mikročástic dočkala až v posledních letech. Technologie separace pomocí magnetických částic je rychlá a snadná metoda pro citlivé a spolehlivé zachycení specifických proteinů, genetického materiálu (DNA) a dalších biomolekul. [32, 53]

Ve srovnání s jinými metodami je výhodou technik využívajících magnetismus nízké mechanické namáhání zkoumaného materiálu, vyšší účinnost, zkrácení doby analýzy, menší spotřeba vzorku, možnost automatizace a miniaturizace metody. Díky své finanční nenáročnosti našla magnetická separace uplatnění v mnoha biologických odvětvích, jako jsou diagnostika, molekulární biologie, izolace a purifikace buněk, radioimunoanalýza nebo purifikace nukleových kyselin. [32, 53]

4.1 Vlastnosti mikročástic

Většina současně používaných částic vykazuje superparamagnetické vlastnosti. Ty způsobují, že částice mezi sebou vzájemně nereagují v nepřítomnosti magnetického pole. Magnetizují se jen v silném magnetickém poli a po odstranění pole nezachovávají žádný zbytkový magnetismus. [32, 39]

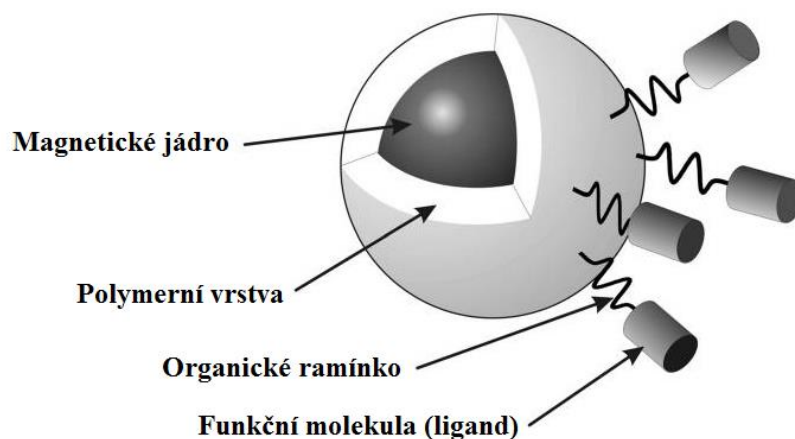
Průměr částic se pohybuje mezi 0,5 až 10 μm . Pro vazbu nukleových kyselin jsou výhodné materiály s velkým povrchem. Z tohoto důvodu se částice vyskytují nejčastěji ve tvaru koule, vzhledem k větší vazebné kapacitě. [39]

4.1.1 Materiál magnetických mikročástic

Mikročástice jsou složeny z magnetického jádra, polymerní vrstvy a funkčního povrchu, viz Obrázek 2. Podstatu tvoří feromagnetické složky, zodpovědné za interakci s vnějším magnetickým polem, a složky nemagnetické, zajišťující požadovanou interakci s biomolekulami. [29, 39]

Mikročástice mohou být vyráběny z mnoha různých výchozích materiálů, přírodních i syntetických. Mnohé materiály s magnetickými vlastnostmi, např. kobalt nebo chrom, jsou vysoce toxické. Není tedy pravděpodobné, že budou použity jako biomedicínská činidla *in vivo*. Nejčastějšími materiály pro přípravu magnetických částic jsou magnetické oxidy železa, magnetit a maghemit, a také různé typy feritů ve formě prášků nebo magnetických kapalin. [30, 32, 39]

Unikátní magnetické vlastnosti částic spolu s jejich velkým povrchem, umožňujícím navázat nemalé množství ligandů, jsou podstatou jejich využití coby efektivních nosičů pro rychlou a účinnou imobilizaci a separaci biologicky aktivních látek. [39]



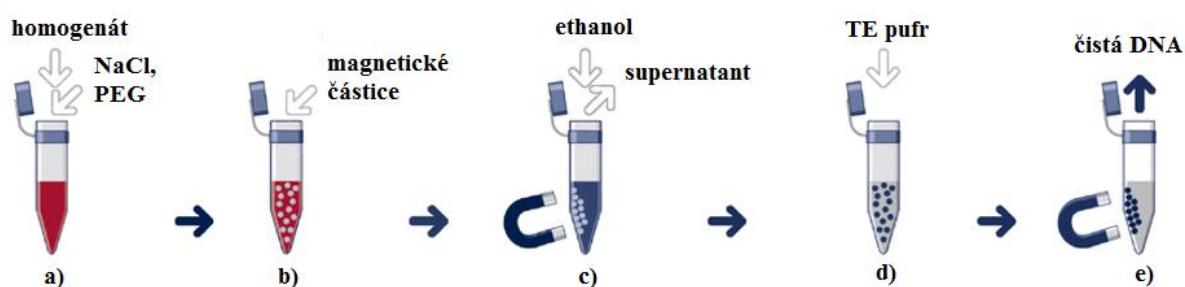
Obrázek 2: Schéma magnetické částice, upraveno dle [30]

4.2 Izolace DNA pomocí magnetických mikročástic

Izolace DNA je důležitým krokem v molekulární diagnostice mikroorganismů a virů, v genomovém profilování, manipulaci s geny, lékařské diagnostice, v potravinářství atd. Vysoká kvalita izolované DNA je nezbytná pro amplifikaci v PCR. [37]

Separace nukleové kyseliny z analyzovaných vzorků je vždy nedílnou součástí vícestupňové identifikační procedury. Hlavní kroky separace nukleových kyselin jsou znázorněny na Obrázku 3. Izolace DNA zahrnuje navázání DNA na magnetické částice v separační směsi a následné umístění zkumavky do magnetického separátoru, kde dochází k propláchnutí promývacím pufrům. Zde dochází k čištění a odstranění látek způsobujících kontaminaci. DNA je poté eluována do TE pufru a za pomoci separátoru jsou vyjmuty magnetické částice. [37, 38, 39]

Klasický postup izolace genomové DNA zahrnuje fenol-chloroformovou extrakci a srážení DNA v ethanolu. Metoda extrakce fenol-chloroformem je však časově náročná a z důvodu mnoha přenosů se zvyšuje pravděpodobnost kontaminace. [37, 38]



Obrázek 3: Izolace nukleových kyselin, upraveno dle [39]

5 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

Objevení principu polymerázové řetězové reakce (PCR) mělo zásadní dopad na rozvoj molekulárně diagnostických technik. Za objevitele principu PCR je považován Dr. Kary Mullis, který obdržel za tento významný počin v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii. [40]

Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza vybraných úseků DNA ve směru 5' → 3' pomocí DNA polymerázy. Jedná se o poměrně rychlou a přesnou metodu založenou na specifických sekvencích primerů, které hybridizují s komplementárními sekvencemi DNA matrice. K syntéze DNA se používají termostabilní DNA polymerázy odolávající vyšším teplotám. Jednou z nich je např. Taq DNA polymeráza purifikována z anaerobní bakterie *Thermus aquaticus*, žijící v horkých pramenech. [41, 42, 43]

5.1 Komponenty pro PCR

Reakční směs pro PCR se skládá z matrice DNA, oligonukleotidových primerů, DNA polymerázy, deoxynukleosid trifosfátů (dNTP), Mg^{2+} iontů, pufru a vody pro PCR. Každá z uvedených složek je nedílnou součástí reakční směsi a svými jedinečnými vlastnostmi se navzájem doplňují. [19, 41]

Matrice DNA slouží jako předloha pro následující amplifikaci a může se jí stát téměř každý úsek DNA. Oligonukleotidové primery jsou sekvencně specifické, obsahují 18–30 nukleotidů a 40–60 % GC párů bází. DNA polymeráza je termostabilní polymeráza syntetizující nové sekvence DNA ve směru 5' → 3'. Deoxynukleosid trifosfáty jsou základní stavební jednotky při syntéze nových řetězců DNA. Mg^{2+} ionty, obsažené v pufru pro PCR, jsou potřebné pro aktivitu DNA polymerázy a jejich koncentrace závisí na použité kombinaci primerů a matrice DNA. Puftr vytváří ideální pH prostředí pro DNA polymerázu a PCR voda slouží na doplnění směsi do požadovaného objemu. [19, 41]

Výše uvedené složky se smísí v Eppendorfově zkumavce a poté se umístí do termocycleru, který umožňuje opakovanou amplifikaci DNA. Termocycler zvyšuje a snižuje teplotu bloku v diskretních, přesných a předem naprogramovaných krocích. [45]

5.2 Amplifikační cyklus

V analýze PCR jsou v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídány tři základní kroky (amplifikační cyklus): denaturace, hybridizace a elongace (Obrázek 4). S každým opakováním těchto tří kroků se počet zkopírovaných molekul DNA zdvojnásobí. Tyto kroky probíhají ve 30–40 po sobě se následujících cyklech. Po 35 cyklech se teoretické množství cílové DNA blíží k $3,4 \times 10^{10}$ kopií. [41, 45]

Výsledné produkty PCR nazýváme amplikony. Jsou to úseky DNA o definované délce a velikosti několik desítek až tisíců párů bází (bp). Analýza produktů PCR v reakční směsi bývá nejčastěji dokazována pomocí elektroforézy na agarosovém nebo polyakrylamidovém gelu nebo kvantitativním měřením množství produktu v reálném čase. Elektroforéza na agarózovém gelu spočívá na oddělení produktů PCR na základě velikosti a náboje. Umožňuje tak stanovení přítomnosti, a v případě použití vhodného DNA standardu, velikosti produktu PCR. [19, 45]

5.2.1 Denaturace

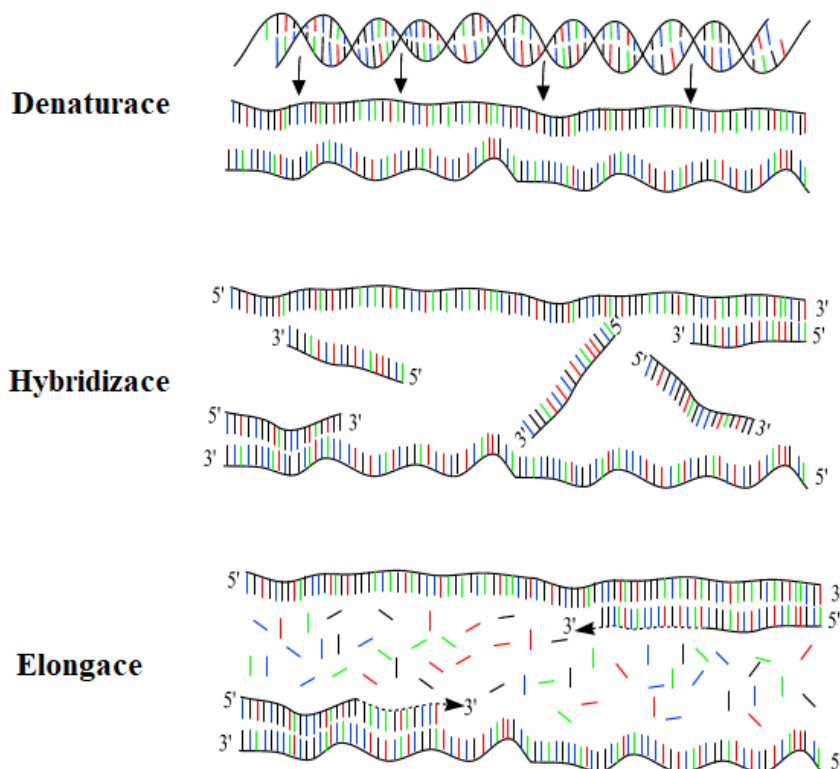
Prvním krokem je denaturace templátové DNA, kde dochází k oddělení dvouvláknové šroubovice DNA (dsDNA). Teplota denaturace (90–94°C) přerušuje vodíkové vazby mezi páry bází adeninem (A) a thyminem (T) a mezi cytosinem (C) a guaninem (G). Doba a teplota požadovaná pro denuraci dsDNA je závislá především na délce templátové DNA. DNA s velkým počtem GC párů bází vyžaduje vyšší teplotu tání kvůli většímu počtu vodíkových vazeb. V prvním cyklu bývá většinou denaturace templátu prodloužena, aby proběhla kompletně. [41, 46]

5.2.2 Hybridizace

Po denuraci se teplota sníží na hodnotu 55–60°C, aby se primery navázaly na jednořetězcové DNA. Primery jsou krátké jednořetězcové oligonukleotidy. Primery jsou navrženy tak, aby se vážaly na komplementární úseky na obou řetězcích templátové DNA svým 3' koncem směrem dovnitř. Tyto primery slouží jako výchozí bod pro kopírování DNA. PCR může selhat v případě, že sady primerů jsou chybně navrženy, což by nevedlo k syntéze nebo by vedlo k výskytu chyb v párování. Zásadní je zde délka primeru, teplota tání, obsah GC párů, velikost cílové DNA a tvorba sekundárních struktur. [41]

5.2.3 Elongace

V posledním kroku dochází k syntéze nových řetězců DNA, jedná se o prodloužení připojených primerů DNA polymerázou. K rostoucímu řetězci DNA jsou napojeny nukleotidy ve směru 5' → 3'. Teplota závisí na teplotním optimu použité DNA polymerázy, většinou se pohybuje v rozmezí 70–75°C. [41, 47]



Obrázek 4: Průběh PCR, upraveno dle [48].

5.3 PCR v reálném čase

PCR v reálném čase (qPCR) je metoda používaná v mnoha odvětvích pro diagnostické a potravinářské aplikace. Tato technologie spojuje polymerázovou řetězovou reakci s využitím fluorescenčních sond či barviv za účelem sledování produkce amplifikačních produktů v průběhu každého cyklu PCR reakce zvýšením fluorescence. Tato unikátní kombinace vynikající citlivosti a přesnosti spojená s nízkým rizikem kontaminace učinila z qPCR hojně využívanou metodu. [50]

Výhodou qPCR oproti konvenční PCR je schopnost kvantifikace, určení počátečního množství kopií cílové matrice DNA. [51]

Kvantitativní PCR v reálném čase může být použita pro určení množství konkrétního izolovaného genu, ale také pro analýzu jednotlivých buněk nebo kvantifikaci jakékoli kombinace DNA a mRNA. [45]

5.4 Inhibitory PCR

PCR je velmi citlivá metoda, kde je k amplifikaci zapotřebí pouze stopové množství DNA. Tato technika umožňuje připravit dostatek kopií k analýze v běžných laboratorních podmínkách. [45, 38]

Vzhledem k citlivosti PCR metody, může jakákoli forma kontaminace DNA vést k nesprávným nebo falešně pozitivním výsledkům. Tyto látky, tzv. inhibitory, mohou snížit účinnost a reprodukovatelnost metody. [34, 52] Pro odstranění inhibitorů nebo pro jejich redukci existuje řada metod. Problémy s inhibitory lze předcházet vhodným navržením metody pro zpracování a extrakci nukleových kyselin. Také ředěním DNA lze snížit koncentraci inhibitorů, a tím zlepšit účinnost PCR. Nicméně inhibitory PCR snižují citlivost PCR. [34]

6 CÍL PRÁCE

Cílem experimentální části diplomové práce bylo optimalizovat novou metodu mikroizolace rostlinné DNA ze zeleniny (čerstvá, sušená, sterilovaná a mražená červená řepa) a z vybraných druhů potravin rostlinného původu obsahujících červenou řepu v kvalitě vhodné pro polymerázovou řetězovou reakci. DNA byla izolována pomocí magnetických částic P(GMA).

Testovány byly různé způsoby zpracování homogenátů zeleniny v CTAB pufru (bez přídavku a s přídavkem chloroform- oktanolu, přídavek isopropanolu, množství NaCl v CTAB pufru, množství homogenátů a koncentrace PEG 6000 v separačních směsích). Množství a kvalita izolované DNA byla ověřována spektrofotometricky a amplifikací v konvenční PCR.

II. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7 MATERIÁL A METODY

7.1 Rostlinný materiál

K izolaci rostlinné DNA byla použita červená řepa (*Beta vulgaris* var. *rubra*) v podobě a) čerstvé, b) sušené, c) sterilované a d) mražené, viz Obrázek 5.



Obrázek 5: a) čerstvá [49], b) sušená, c) sterilovaná červená řepa.

Dále byly použity potravinové výrobky obsahující červenou řepu. Jedná se o dmBio pomazánku z červené řepy vegan (Obrázek 6), dětský příkrm HiPP obsahující červenou řepu s jablky a hovězím masem (Obrázek 7) a 100% bio šťávu z červené řepy a jablka lisovanou za studena (Obrázek 8).



Obrázek 6: dmBio pomazánka z červené řepy (45 %) a křenové pasty (12 %), vegan.



Obrázek 7: Dětský příkrm HiPP s červenou řepou, jablky a hovězím masem.



Obrázek 8: 100% bio šťáva z jablek (60 %) a červené řepy (40 %), lisována za studena. Ošetřena šetrnou pasterací.

7.2 Chemikálie

- Agaróza pro elektroforézu (Serva, Heidelberg, SRN)
- Cetyl triethylamonium bromid (CTAB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- Ethanol p.a. (Penta, Chrudim, ČR)
- Ethidium bromid ($5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Hydroxid sodný (Penta, Chrudim, ČR)
- Chlorid sodný (Penta, Chrudim, ČR)
- Chloroform (Penta, Chrudim, ČR)
- Isoamylalkohol (Penta, Chrudim, ČR)
- Isopropanol (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Penta, Chrudim, ČR)
- Octan sodný (Penta, Chrudim, ČR)
- Oktanol (Penta, Chrudim, ČR)
- β -merkapt ethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Polyethylenglykol 6000 (PEG 6000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris-báze) (Amresco, Solon, USA)

7.2.1 Magnetické mikročástice

Pro izolaci rostlinné DNA byly použity magnetické mikročástice P(GMA) uváděné také pod označením Fkol B 100 ox (Ing. D. Horák, CSc., Akademie věd, Praha, ČR). Vlastnosti těchto částic jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2: Vlastnosti magnetického polymerního nosiče P(GMA)

Polymer	Fe [% hm]	Průměr nosiče [μm]	PDI	-COOH [$\text{mM} \cdot \text{g}^{-1}$]
P(GMA)	5,36	0,70	1,16	0,67

P(HEMA-co-GMA)– poly(2-hydroxyethylmethakrylát-co-glycidylmethakrylát), PDI– index polydisperzity (poměr hmotnosti a počtu mikročástic o průměrné velikosti)

7.2.2 Komponenty pro PCR

- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- PCR reakční pufr kompletní pro Taq polymerázu 1.1 (Top-Bio, Praha, ČR)
- Směs dNTP (10 mM) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery 18S_for a 5,8S_rev; 26S_for a 26S_rev (10 pmol/ μl) (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)
- Taq DNA polymeráza 1.1 (1U/ μl) (Top-Bio, Praha, ČR)

7.3 Přístroje a pomůcky

- Centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Eppendorfovy zkumavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Laboratorní váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New Jersey, USA)
- Magnetický separátor Dynal (Oslo, Norsko)
- Mikrovlnná trouba 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 MinicyclerTM (BIO-RAD Lab., USA)
- Transilluminátor TVR- 3121 (Spectroline, Albany, USA)
- Zařízení pro elektroforézu (OWL Buffer PufferTM, Loughborough, UK)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA)
- Další laboratorní pomůcky (laboratorní sklo, špičky z umělé hmoty, kopist, umělohmotný materiál, atd.)

7.4 Roztoky

Lyzační roztok s CTAB s 1,5 M NaCl pro izolaci rostlinné DNA byl připraven RNDr. A. Kovaříkem, CSc. z Biofyzikálního ústavu AV ČR v.v.i, v Brně. Roztoky pro purifikaci DNA magnetickými částicemi a pro agarózovou gelovou elektroforézu byly připraveny podle postupů k laboratorním cvičením Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie. [19]

7.4.1 Roztoky pro izolaci rostlinné DNA

- 0,5 M EDTA (186,1 g EDTA, 800 ml destilované vody, NaOH pro úpravu pH na 8,0)
- 1 M Tris-HCl (Tris-báze 121 g, 80 ml destilované vody, koncentrovaná HCl pro úpravu pH na 7,8)
- 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 destilované vody a těsně před použitím přidán 0,2% 2-merkapt ethanol (1 µl/1 ml pufru))
- Lyzační roztok s CTAB s 2 M NaCl (1 ml 5 M NaCl, 9 ml CTAB s 1,5 M NaCl)
- Lyzační roztok s CTAB s 2,5 M NaCl (1 ml 5 M NaCl, 4 ml CTAB s 1,5 M NaCl)
- Lyzační roztok s CTAB s 3 M NaCl (1 ml 5 M NaCl, 2,3 ml CTAB s 1,5 M NaCl)
- 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 destilované vody)
- Směs chloroform-oktanol (chloroform a oktanol v poměru 24:1)
- 70% ethanol (70 ml 96% ethanolu a 26 ml destilované vody)
- Roztok chloridu sodného (5 M) (87,66 g NaCl rozpuštěn v 300 ml destilované vody)
- Roztok 40% polyethylenglykolu 6000 (40 g PEG 6000 rozpuštěn v 60 ml destilované vody. Objem byl doplněn do 100 ml destilovanou vodou.)

7.4.2 Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu

- 5×TBE pufr (54 g Tris-báze, 27,5 g kyseliny borité, 600 ml destilované vody, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)). Před použitím byl 10× naředěn
- Barvicí lázeň (100 µl roztoku ethidiumbromidu 5 mg/ml, 500 ml destilované vody)
- DNA standard (100 bp žebříček), obsahuje fragmenty DNA o velikosti 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1 000, 1 200, 1 500 bp) (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- Nanášecí pufr Yellow load (6×koncentrovaný, obsahuje barvivo Orange G) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Fluorescenční barvivo Midori Green (Ecoli, Bratislava, SR)

7.5 Metody

7.5.1 Homogenizace a příprava homogenátů z rostlinných buněk pro izolaci DNA

7.5.1.1 Homogenizace lyzačním roztokem s CTAB

Z rostlinného materiálu, rozkrájeného na malé kousky, bylo do 1,5 ml Eppendorfových zkumavek sterilně odváženo 300 mg vzorku. Dále bylo do Eppendorfovy zkumavky přidáno 500 µl lyzačního roztoku s CTAB a 1 µl merkapt ethanolu (0,2%). Pomocí plastového kopistu byla za stálého chlazení provedena homogenizace rostlinného materiálu. Zhomogenizovaný vzorek byl inkubován v termomixeru při 60 °C/30 min.

Po inkubaci s lyzačním roztokem s CTAB byla provedena centrifugace 1400 ot./10 min. Do čisté Eppendorfovy zkumavky bylo odebráno asi 200 µl vrchní fáze, obsahující DNA. K izolaci DNA pomocí magnetických částic bylo použito 125–175 µl homogenátu.

7.5.1.2 Přídavek chloroform-oktanolu

Při další purifikaci bylo k homogenátu po inkubaci v roztoku s CTAB přidáno 500 µl chloroform-oktanolu. Směs byla 5 minut promíchávána a pak centrifugována při 1400 ot./10 min. Pro separaci magnetickými nosiči bylo odebráno 125–175 µl supernatantu.

7.5.1.3 Přídavek isopropanolu

Postupováno bylo podle kapitoly 7.5.1.2, kde bylo k maximálnímu odebranému množství supernatantu přidáno 0,6 objemu isopropanolu. Směs byla promíchána a centrifugována při 1400 ot./10 min. Supernatant byl odlit a k sedimentu bylo přidáno 500 μ l 70% ethanolu. Směs byla promíchána ve vortexu a poté byla provedena centrifugace 1400 ot./10 min. Supernatant byl odstraněn a DNA byla vysušena v exikátoru. Poté bylo do zkumavky přidáno 200 μ l TE pufru a DNA byla ponechána rozpouštět do druhého dne. K izolaci DNA pomocí magnetických mikročastic bylo použito 175 μ l.

7.5.2 Izolace DNA magnetickými mikročasticemi

Izolace DNA z rostlinného homogenátu byla provedena pomocí magnetických mikročastic P(GMA). Složení separační směsi a pořadí přidávání složek je uvedeno v následující Tabulce 3. Při optimalizaci byly separační směsi namíchány podle Tabulky 4 a Tabulky 5. Pro testování složení separačních směsí s CTAB s různým množstvím NaCl a o různé koncentraci PEG byla využita Tabulka 6.

Tabulka 3: *Separální směs (500 μ l) pro izolaci DNA (výsledná koncentrace PEG= 8 %)*

Krok	Složka	Množství [μ l]
1	NaCl (5 M)	100
2	Homogenát	150
3	PEG 6000 (40%)	200
4	Magnetické částice (2 mg/ml)	50
Eluce do TE pufru [μ l]		100

Tabulka 4: *Separální směsi (250 μ l) pro izolaci DNA s různým množstvím homogenátu. Eluce do stejného objemu jako byl objem homogenátu.*

Krok	Složka	Množství [μ l]			
1	NaCl (5M)	100	75	50	25
2	Homogenát	25	50	75	100
3	PEG 6000 (40%)	100	100	100	100
4	Magnetické částice (2 mg/ml)	25	25	25	25
5	Eluce do TE pufru [μ l]	25	50	75	100

Tabulka 5: *Separační směsi (250 µl) pro izolaci DNA z různých množství homogenátů. Eluce DNA byla provedena do 25 µl TE pufru.*

Krok	Složka	Množství [µl]			
		100	75	50	25
1	NaCl (5M)	100	75	50	25
2	Homogenát	25	50	75	100
3	PEG 6000 (40%)	100	100	100	100
4	Magnetické částice (2 mg/ml)	25	25	25	25
5	Eluce do TE pufru [µl]	25	25	25	25

Tabulka 6: *Složení separačních směsí (250 µl) s CTAB s různým množstvím NaCl o různé koncentraci PEG 6000. Eluce DNA byla provedena do 50 µl TE pufru.*

Složka	CTAB s NaCl [µl]				PEG (%)
	1,5 M	2,0 M	2,5 M	3,0 M	
Homogenát	125	125	125	125	16
40% PEG	100	100	100	100	
Magnetické částice (2 mg/ml)	25	25	25	25	
Eluce do TE pufru	50	50	50	50	
Homogenát	150	150	150	150	10
40% PEG	75	75	75	75	
Magnetické částice (2 mg/ml)	25	25	25	25	
Eluce do TE pufru	50	50	50	50	
Homogenát	175	175	175	175	8
40% PEG	50	50	50	50	
Magnetické částice (2 mg/ml)	25	25	25	25	
Eluce do TE pufru	50	50	50	50	

Po smíchání všech složek byla směs inkubována 15 minut při laboratorní teplotě a následně umístěna do magnetického separátoru. Magnetické částice s navázanou DNA byly separovány 5 minut při laboratorní teplotě. Poté byl opatrně odebrán supernatant a do zkumavky bylo přidáno 500 µl 70% ethanolu. Směs byla promíchána a částice byly separovány pomocí magnetického separátoru. Po pěti minutách byl opatrně odebrán supernatant a zbylý ethanol byl odpařen na vzduchu. DNA navázaná na magnetických mikročásticích byla eluována do 25–100 µl TE pufru (viz Tabulky 3, 4, 5 a 6) při laboratorní teplotě. Po uplynutí 15 minut byly částice odseparovány pomocí magnetického separátoru a eluát obsahující DNA byl odebrán do čistých Eppendorfových zkumavek.

7.5.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

Koncentrace a čistota rostlinné DNA byla zjištěna spektrofotometricky (objem vzorku 2 μ l) pomocí přístroje NanoDrop 2000, kde byl jako blank použit TE pufr. Měřená absorbance byla v rozmezí vlnových délek 230 až 320 nm. Z naměřených hodnot byla odečtena absorbance při 260 nm a poměry hodnot A_{260}/A_{230} a A_{260}/A_{280} , pro posouzení čistoty vzorku DNA.

7.5.4 Příprava směsí pro PCR a podmínky amplifikace

Pro PCR směs byly použity primery 18S_for a 5,8S_rev. Sekvence primerů jsou uvedeny v Tabulce 7. V jednom případě byly použity primery 26S_for a 26S_rev, jejich sekvence je uvedena v Tabulce 8. Všechny komponenty vhodné pro PCR byly před použitím rozmrazeny, promíchány a zcentrifugovány. Pořadí komponent, podle kterého byly míchány, je uvedeno v Tabulce 9. Byla připravena směs o celkovém objemu 25 μ l.

Kromě vzorků, kde byla jako matrice použita analyzovaná rostlinná DNA, byla připravena také pozitivní a negativní kontrola. Jako negativní kontrola byla místo matrice DNA použita sterilní PCR voda a jako pozitivní kontrola byla použita rostlinná DNA *N. tabacum* (1 ng/ μ l) nebo *B. oleracea* (1 ng/ μ l) (od RNDr. A. Kovaříka, CSc.). Všechny složky PCR směsi byly po promíchání umístěny do thermocycleru s nastaveným specifickým amplifikačním programem podle Tabulky 10. V případě použití primerů 26S_for a 26S_rev byl nastaven amplifikační program uvedený v Tabulce 11.

Tabulka 7: *Specifické primery* [20]

Primery	Sekvence primeru (5' - 3')	Velikost produktu PCR
18S_for	GCG CTA CAC TGA TGT ATT CAA CGA G	asi 700 bp
5,8S_rev	CGC AAC TTG CGT TCA AAG ACT CGA	

Tabulka 8: *Specifické primery* [21]

Primery	Sekvence primeru (5' - 3')	Velikost produktu PCR
26S_for	GAA TTC ACC CAA GTG TTG GGA T	asi 220 bp
26S_rev	AGA GGC GTT CAG TCA TAA TC	

Tabulka 9: Směs pro PCR (25 μ l)

Pořadí	Komponenta	Objem pro PCR [μ l]
1.	Voda pro PCR	16,5
2.	10 \times reakční pufr kompletní	2,5
3.	Primer forward (10 pmol/ μ l)	1,0
4.	Primer reverse (10 pmol/ μ l)	1,0
5.	Směs dNTP (10 mM)	1,0
6.	<i>Taq</i> DNA- polymeráza 1.1 (1 U/ μ l)	1,0
7.	Matrice DNA	2,0
Celkem		25,0

Tabulka 10: Amplifikační program

Krok	Program PCR ROST700		
1	95 °C	5 min	35 \times krok 2– 4
2	95 °C	40 s	
3	57 °C	40 s	
4	72 °C	1 min 20 s	
5	72 °C	10 min	

Tabulka 11: Podmínky amplifikace DNA v PCR

Krok	Program PCR 220RO40		
1	95 °C	10 min	39 \times krok 2– 4
2	95 °C	30 s	
3	52 °C	30 s	
4	72 °C	40 s	
5	72 °C	10 min	

7.5.5 Gelová elektroforéza produktů PCR

Po skončení amplifikačního programu byly produkty PCR detegovány gelovou elektroforézou na 1,2% agarózovém gelu, který byl připraven z 1,2 g agarózy a 100 ml 0,5 \times TBE pufru. Suspenze byla důkladně rozvařena v mikrovlnné troubě a po ochlazení cca na 60 °C bylo ke směsi přidáno fluorescenční barvivo (1 μ l Midori Green). Směs byla vylita do předem připravené elektroforetické vaničky s hřebínkem a ponechána ztuhnout.

K produktům PCR bylo přidáno 5 μ l nanášecího pufru. Do vzniklých komůrek v agarózovém gelu byly nanášeny směsi produktů PCR a nanášecího pufru v objemu 30 μ l. Pro určení velikosti fragmentů byl nanesen DNA standard 100 bp žebříček. Elektroforéza

probíhala při napětí 60 V asi 2 hod. Následně byl gel přenesen na transilluminátor a pozorován v UV světle o vlnové délce 305 nm. Gel byl pomocí fotoaparátu v mobilním telefonu zdokumentován. V případě potřeby byl gel dobarvován v roztoku ethidium bromidu (0,5 µg/ml).

8 VÝSLEDKY

8.1 Zpracování rostlinného materiálu pro analýzu

8.1.1 Homogenizace a příprava homogenátů

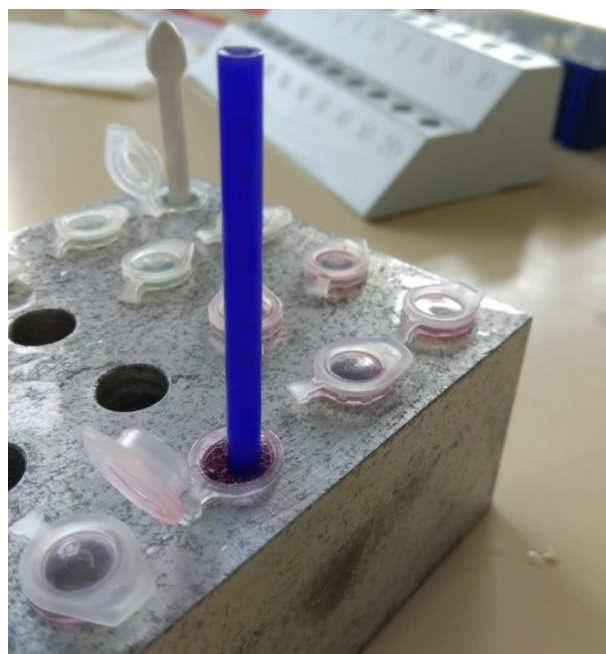
Pro izolaci rostlinné DNA z kořene červené řepy byly připraveny dva rozdílné homogenáty buněk. Homogenát s CTAB bez přídavku chloroform- oktanolu a s přídavkem chloroform- oktanolu.

Rostlinná DNA byla izolována z 300 mg rostlinného materiálu podle postupů uvedených v kapitole 7.5.1. Příprava kořene červené řepy na homogenizaci je zobrazena na Obrázku 9. Po přidavku lyzačního roztoku s CTAB a merkaptoethanolu byla směs homogenizována v Eppendorfově zkumavce pomocí plastového kopistu v mrazícím termobloku, jak je zobrazeno na Obrázku 10. Poté byla směs inkubována při 60°C/30 min.

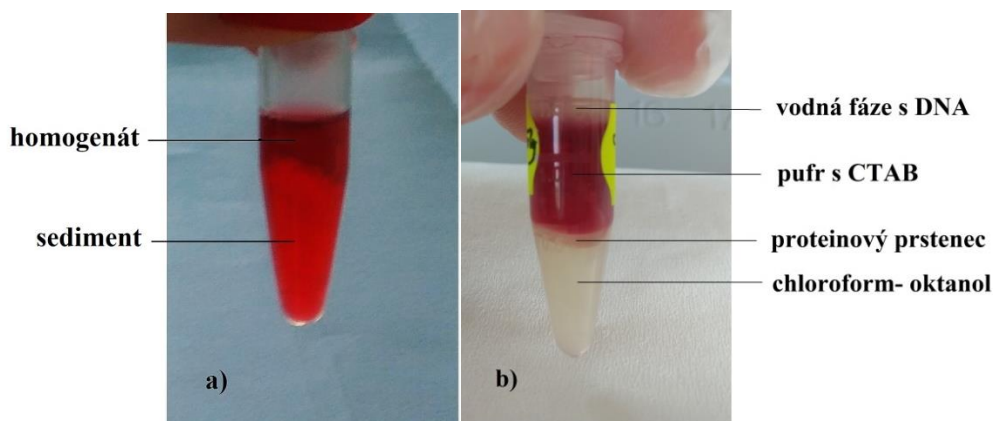
Po inkubaci byla směs zcentrifugována (1400 ot/5 min) a odpipetován supernatant, takto byl připraven homogenát bez přídavku chloroform- oktanolu (Obrázek 11a). Homogenát s přídavkem chloroform- oktanolu byl po inkubaci, přidání chloroform- oktanolu a centrifugaci rozdělen na tři fáze, jak je znázorněno na Obrázku 11b. Horní vodná fáze byla s přečištěnou DNA.



Obrázek 9: Příprava kořene červené řepy na homogenizaci



Obrázek 10: Homogenizace v pufru s CTAB ve vymrazeném termobloku pomocí kopistu



Obrázek 11: Homogenát s CTAB bez přídavku chloroform-oktanolu (a) a oddělení fází po přídavku chloroform-oktanolu (b) a centrifugaci

→ Byly připraveny různě purifikované homogenáty z kořene červené řepy.

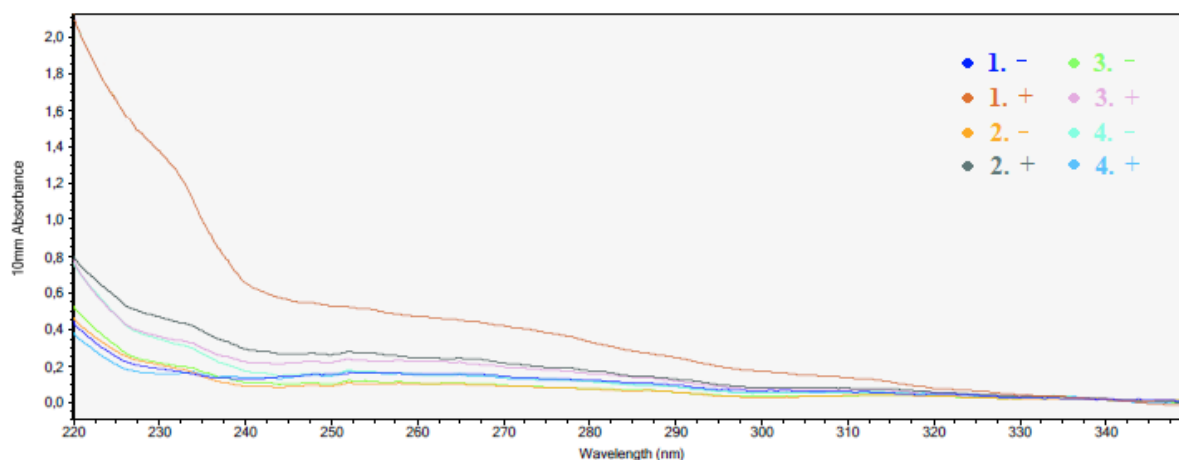
8.2 Množství a kvalita DNA izolované pomocí magnetických mikročastic

Z připravených homogenátů z kořene červené řepy byla izolována rostlinná DNA magnetickými mikročasticemi P(GMA) podle postupu uvedeném v kapitole 7.5.2 v Tabulce 3. DNA byla izolována ze 150 μ l homogenátu s CTAB ve 4 opakováních a ze 150 μ l vodné fáze po působení chloroform-oktanolu na homogenát s CTAB ve 4 opakováních. DNA byla eluována do 100 μ l TE pufru. Analyzována byla spektrofotometricky a pomocí PCR.

8.2.1 Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Spektrofotometricky byla stanovena koncentrace a čistota DNA podle postupu v kapitole 7.5.3. Grafické znázornění absorbance na vlnové délce je uvedeno v Grafu 1. Koncentrace izolované DNA jsou uvedeny v Tabulce 12, čistota DNA je patrná z poměru absorbancí A_{260}/A_{280} .

Graf 1: Grafické znázornění absorbance DNA na vlnové délce. Byla měřena DNA izolovaná z 300 mg červené řepy z homogenátů (150 μ l) s přídavkem a bez přídavku chloroform-oktanolu ve 4 opakováních.



– bez přídavku chloroform-oktanolu

+ s přídavkem chloroform-oktanolu

Tabulka 12: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty. DNA byla izolována z homogenátu s CTAB (150 μ l) bez přídavku a s přídavkem chloroform- oktanolu ve 4 opakováních.

DNA červená řepa kořen (300 mg)	Přídavek chloroform- oktanolu	Koncentrace DNA [ng/ μ l]	Celkové množství DNA [ng]	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	A _{260/230}
1.	–	6,9	690	0,138	0,098	1,42	0,42
	+	6,7	670	0,135	0,098	1,37	0,95
2.	–	4,5	450	0,089	0,057	1,57	0,44
	+	10,4	1 040	0,209	0,143	1,46	0,60
3.	–	4,2	420	0,084	0,056	1,50	0,44
	+	11,4	1 140	0,227	0,156	1,45	0,50
4.	–	7,0	700	0,140	0,104	1,34	0,83
	+	22,8	2 280	0,456	0,317	1,44	0,33

– bez přídavku chloroform-oktanolu

+ s přídavkem chloroform-oktanolu

→ Koncentrace DNA s přídavkem chloroform-oktanolu byla vyšší (10,4–22,8 ng/ μ l) s jednou výjimkou (6,7 ng/ μ l) než bez přídavku chloroform- oktanolu (4,2–7,0 ng/ μ l).

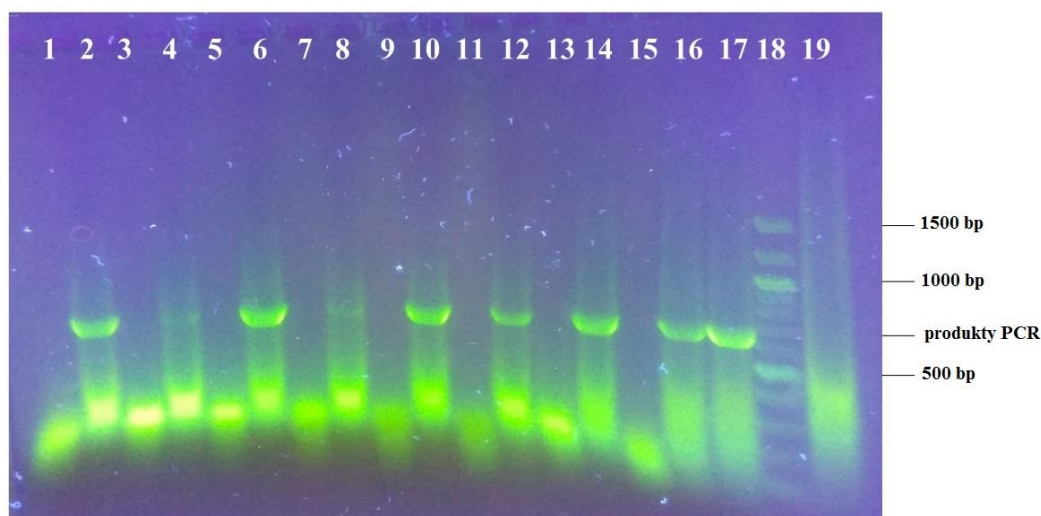
→ DNA byla znečištěna ($A_{260}/A_{280}=1,37–1,46$ s přídavkem chloroform-oktanolu, $A_{260}/A_{280}=1,42–1,57$ bez přídavku chloroform-oktanolu).

8.2.2 Amplifikace DNA pomocí PCR

Izolovaná DNA neředěná a 10 \times ředěná byla amplifikována v thermocycleru podle postupů uvedených v kapitole 7.5.4 a amplifikačního programu podle Tabulky 10. Produkty PCR byly detegovány pomocí agarózové gelové elektroforézy.

Produkty PCR byly naneseny na 1,2% agarózový gel dle postupů v kapitole 7.5.5. Po dokončení elektroforézy byla DNA pozorována na transilluminátoru pod UV světlem (Obrázek 12).

Obrázek 12: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (asi 700 bp). Amplifikována byla neředěná DNA izolovaná z homogenátů kořene červené řepy (300 mg) bez přídavku a s přídavkem chloroform- oktanolu ve 4 opakováních.



Běh	DNA/ opakování	Přídavek chloroform- oktanolu	Ředění DNA	Množství DNA [ng] pro PCR směs	Detekce produktu PCR	
1	Červená řepa- kořen	+	10×		–	
2		1.	+		13,4	++
3			–	10×		–
4			–		13,8	+
5			+	10×		–
6		2.	+		20,8	++
7			–	10×		–
8			–		9	+
9			+	10×		–
10		3.	+		22,8	++
11			–	10×		–
12			–		8,4	++
13			+	10×		–
14		4.	+		45,6	++
15			–	10×		–
16			–		14,0	++
17	PK (<i>N. tabacum</i> 1 ng/μl)				2	++
18	DNA					

	standard					
19	NK				–	–

– produkt PCR nedetegován

+, ++, +++ detegován produkt PCR různé intenzity

–/+ bez přídavku/s přídavkem chloroform-oktanolu

PK– pozitivní kontrola, NK– negativní kontrola

→ Pomocí magnetických částic P(GMA) byla izolována amplifikovatelná DNA.

→ Produkty PCR různé intenzity byly detegovány po amplifikaci neředěné DNA (na rozdíl od 10× ředěné DNA, kde produkty PCR nebyly detegovány).

→ Produkty PCR získané po amplifikaci DNA izolované z homogenátu s přídavkem chloroform-oktanolu byly detegovány ve vyšší intenzitě než bez přídavku chloroform-oktanolu.

8.3 Izolace DNA z čerstvé, zmražené, sušené a sterilované červené řepy

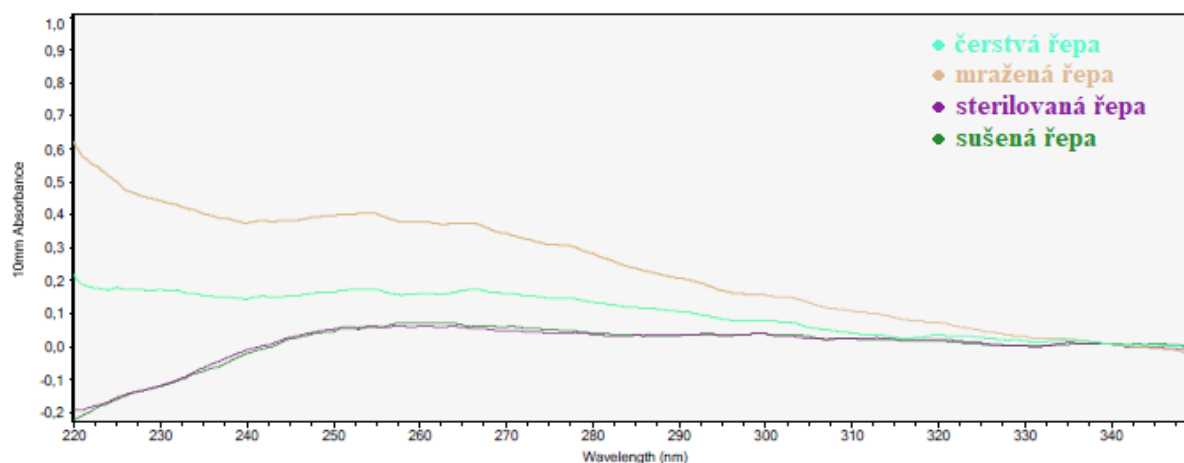
Rostlinná DNA byla izolována z 300 mg čerstvé, zmražené, sterilované a sušené červené řepy podle postupů uvedených v kapitole 7.5.1. Homogenáty byly připraveny v lyzačním pufru s CTAB bez přídavku chloroform-oktanolu a s přídavkem chloroform-oktanolu.

Takto připravené homogenáty (150 µl) byly použity pro izolaci DNA pomocí magnetických nosičů P(GMA) podle kapitoly 7.5.2, Tabulka 3. DNA byla eluována do 100 µl TE pufru.

8.3.1 Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Koncentrace a čistota DNA byla stanovena pomocí přístroje NanoDrop 2000, podle postupů v kapitole 7.5.3. Na následujícím Grafu 2 jsou znázorněny absorpční křivky DNA izolované z homogenátů s přídavkem chloroform-oktanolu a v Tabulce 13 naměřené hodnoty koncentrace a absorbance.

Graf 2: Grafická závislost absorbance DNA na vlnové délce. Byla měřena DNA izolována z 300 mg čerstvé, sušené, zmražené a sterilované červené řepy z homogenátů s přídavkem chloroform-oktanolu.



Tabulka 13: Stanovení koncentrace a čistoty DNA. DNA byla izolována z homogenátu s CTAB s přídavkem a bez přídavku chloroform- oktanolu z různě zpracovaného kořene červené řepy.

DNA červená řepa kořen (300 mg)	Přídavek chloroform- oktanolu	Koncentrace DNA [ng/μl]	Celkové množství DNA [ng]	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	A _{260/230}
čerstvá	–	7,7	770	0,153	0,127	1,21	0,93
	+	4,0	400	0,080	0,032	–	–
mražená	–	18,6	1 860	0,372	0,274	1,36	0,85
	+	4,7	470	0,094	0,040	–	–
sterilovaná	–	2,7	270	0,053	0,030	1,79	–
	+	1,1	110	0,021	0,014	1,54	–
sušená	–	3,1	310	0,061	0,033	1,83	–

– bez přídavku chloroform-oktanolu

+ s přídavkem chloroform-oktanolu

→ DNA izolovaná z homogenátů s CTAB s přídavkem chloroform- oktanolu byla izolována v nižší koncentraci (1,1–4,7 ng/μl) než bez přídavku chloroform- oktanolu (2,7–18,6 ng/μl).

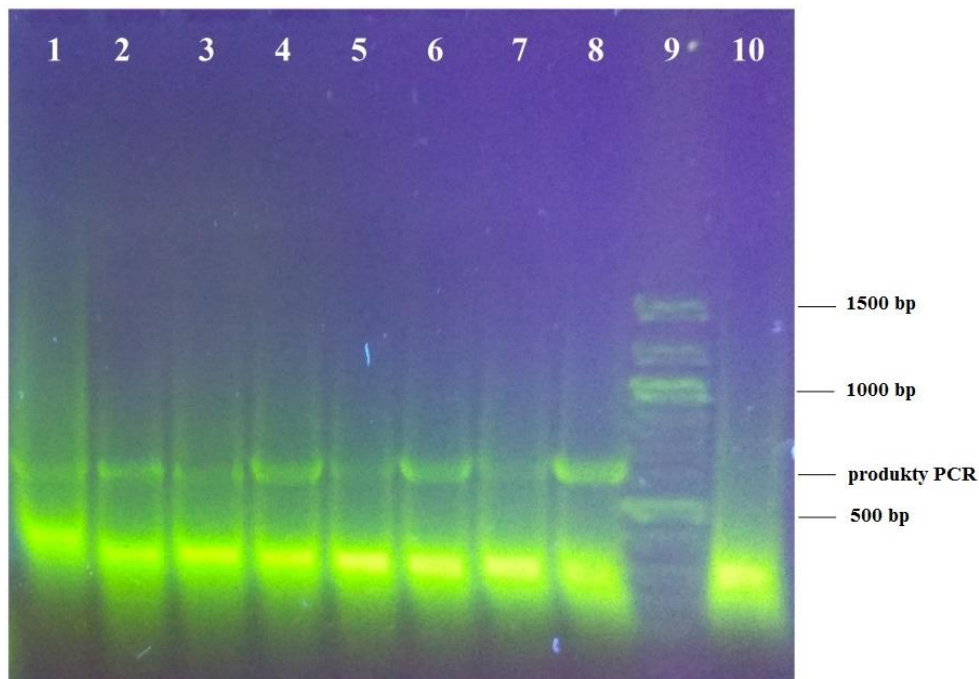
→ DNA z čerstvé a zmražené červené řepy byla izolována ve vyšší koncentraci (4,0–18,6 ng/μl) než DNA izolovaná ze sušené a sterilované řepy (1,1–3,1 ng/μl).

→ DNA byla znečištěna ($A_{260}/A_{280} = 1,21–1,83$).

8.3.2 Amplifikace DNA pomocí PCR

Izolovaná DNA byla amplifikována polymerázovou řetězovou reakcí podle postupů v kapitole 7.5.4. Produkty PCR byly detegovány pomocí agarózové gelové elektroforézy dle kapitoly 7.5.5. V transilluminátoru byl pozorován agarózový gel, který je zobrazen na Obrázku 13.

Obrázek 13: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (asi 700 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná z čerstvé, mražené, sušené a sterilované červené řepy (300 mg) z homogenátů s přidavkem a bez přidavku chloroform- oktanolu.



Běh	DNA- červená řepa kořen (300 mg)	Přídavek chloroform- oktanolu	Množství DNA [ng] pro PCR směs	Detekce produktu PCR
1	sušená	–	6,2	+
2	sterilovaná	–	5,4	+
3		+	2,2	+
4	mražená	–	37,2	++
5		+	9,4	+
6	čerstvá	–	15,4	++
7		+	8,0	+
8	PK <i>N. tabacum</i> (1 ng/μl)		2	++
9	DNA standard			
10	NK		–	–

– produkt PCR nedetegován

+, ++, +++ detegován produkt PCR různé intenzity

–/+ bez přidavku/s přidavkem chloroform-oktanolu

PK– pozitivní kontrola, NK– negativní kontrola

→ Byly detegovány produkty PCR v délce asi 700 bp slabé a střední intenzity v závislosti na množství DNA v PCR směsi.

→ DNA izolovaná z čerstvé a zmražené červené řepy z homogenátů bez přidavku chloroform- oktanolu byla amplifikována ve vyšší intenzitě než DNA izolovaná ze sušené a sterilované řepy. Důvodem bylo vyšší množství DNA pro PCR směs.

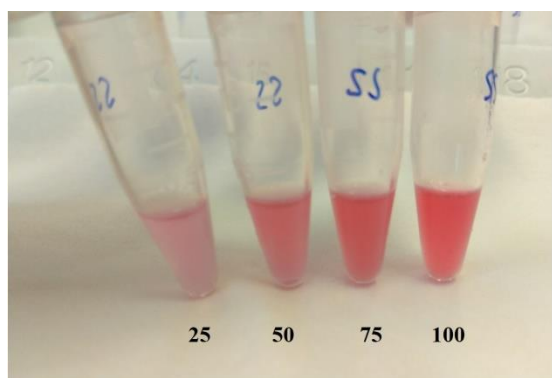
8.4 Testování množství homogenátu a NaCl v separační směsi

S cílem zvýšit množství izolované DNA bylo testováno množství homogenátu v separační směsi.

Rostlinný homogenát ze zmraženého kořene červené řepy byl připraven podle postupů v kapitole 7.5.1. z navážky 300 mg. Rostlinný materiál byl homogenizován v lyzačním pufru s CTAB bez přidavku chloroform- oktanolu.

8.4.1 Eluce DNA do stejného objemu elučního pufru jako byl objem homogenátu

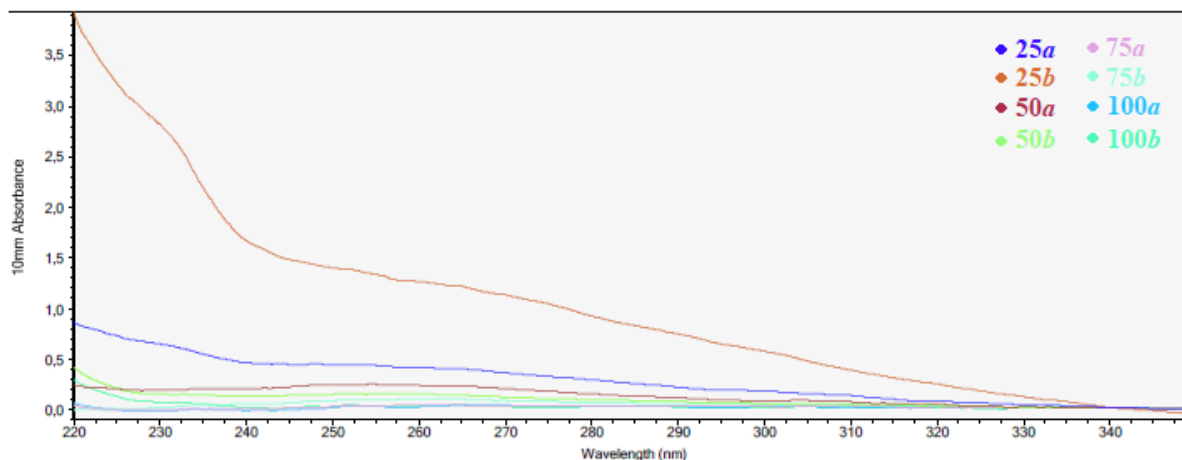
Pro izolaci DNA pomocí magnetických nosičů byly namíchany separační směsi o stejném objemu (250 μ l) s různým množstvím homogenátu a 5 M NaCl podle kapitoly 7.5.2, Tabulky 4. Namíchané separační směsi s 25 μ l, 50 μ l, 75 μ l a 100 μ l homogenátů a 100 μ l, 75 μ l, 50 μ l a 25 μ l 5 M NaCl jsou zobrazeny na Obrázku 14. DNA byla eluována do stejného objemu elučního TE pufru jako byl objem homogenátu (25 μ l, 50 μ l, 75 μ l a 100 μ l).



Obrázek 14: *Separací směsi pro izolaci DNA. Se zvyšujícím se množstvím homogenátu (25–100 μ l) bylo intenzivnější zbarvení směsi.*

Každá separační směs byla připravena ve dvou opakováních. Pomocí NanoDropu byla zjištěna koncentrace a čistota izolované DNA. Postup byl proveden podle kapitoly 7.5.3. Závislost absorbance na vlnové délce je zobrazena v Grafu 3. Koncentrace DNA a poměry absorbancí A_{260}/A_{280} jsou uvedeny v Tabulce 14.

Graf 3: Grafická závislost absorbance DNA na vlnové délce. Byla měřena DNA izolovaná ve 2 opakováních (a, b) ze zmraženého kořene červené řepy (300 mg) ze separačních směsí s různým množstvím homogenátů a NaCl. DNA byla eluována do stejného objemu jako byl objem homogenátu.



Tabulka 14: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované ze separačních směsí s různým množstvím homogenátů a NaCl ve dvou opakováních. DNA byla eluována do stejného množství elučního pufru jako bylo množství homogenátu.

Zmražená červená řepa kořen (300 mg)			Koncentrace DNA [ng/μl]	Celkové množství DNA [ng]	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	A _{260/230}
Množství homogenátu [μl]	Množství elučního pufru [μl]	Množství 5 M NaCl [μl]						
25	25	100	19,8	495	0,396	0,272	1,46	0,63
			32,1	802,5	1,243	0,906	1,37	0,44
50	50	75	10,8	540	0,216	0,132	1,64	1,28
			6,6	330	0,131	0,073	1,79	0,97
75	75	50	1,0	75	0,020	0,013	1,54	-0,76
			4,0	300	0,080	0,047	1,70	-15,70
100	100	25	0,2	20	0,004	0,014	1,27	-0,09
			0,7	70	0,014	0,008	1,90	0,28

→ Z Tabulky 14 je patrné, že se zvyšujícím se množstvím homogenátů a snižujícím se množstvím NaCl v separačních směsích bylo izolováno menší množství DNA.

→ Snižování koncentrace NaCl v separační směsi negativně ovlivňuje množství izolované DNA.

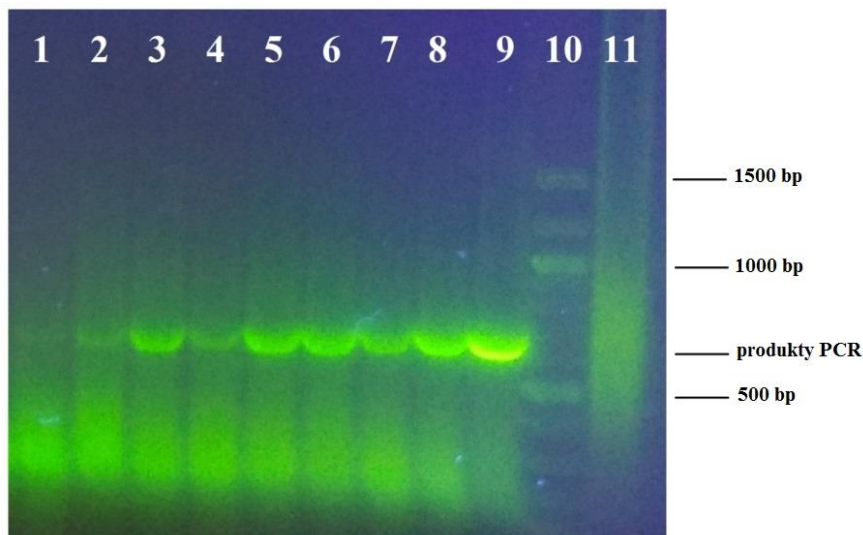
→ Neoptimálnější separační směs byla s 25 μl homogenátu a 100 μl 5 M NaCl.

8.4.1.1 Amplifikace DNA pomocí PCR

Byla provedena amplifikace DNA polymerázovou řetězovou reakcí podle postupů v kapitole 7.5.4. Poté byly produkty PCR detegovány pomocí agarózové gelové elektroforózy

dle kapitoly 7.5.5. Na Obrázku 15 je zobrazen gel po skončení elektroforézy, který byl pozorován pod UV světlem.

Obrázek 15: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (asi 700 bp). Amplifikována byla DNA izolována ve dvou opakováních ze separačních směsí s různým množstvím homogenátu a NaCl. DNA byla eluována do stejného objemu elučního pufru jako byl objem homogenátu.



Běh	DNA	Množství homogenátu [μl]	Množství elučního pufru [μl]	Množství NaCl [μl]	Množství DNA [ng] pro PCR směs	Detekce produktu PCR
1	Zmražená červená řepa-kořen	100	100	25	1,4	+/-
2					0,4	+
3		75	75	50	8,0	++
4					2,0	+
5		50	50	75	13,2	+++
6					21,6	+++
7		25	25	100	64,2	++
8					39,6	+++
9	PK (<i>N. tabacum</i> 1 ng/μl)				2	+++
10	DNA standard					
11	NK				-	-

- produkt PCR nedetegován

+/-, +, ++, +++ detegován produkt PCR různé intenzity

PK- pozitivní kontrola, NK- negativní kontrola

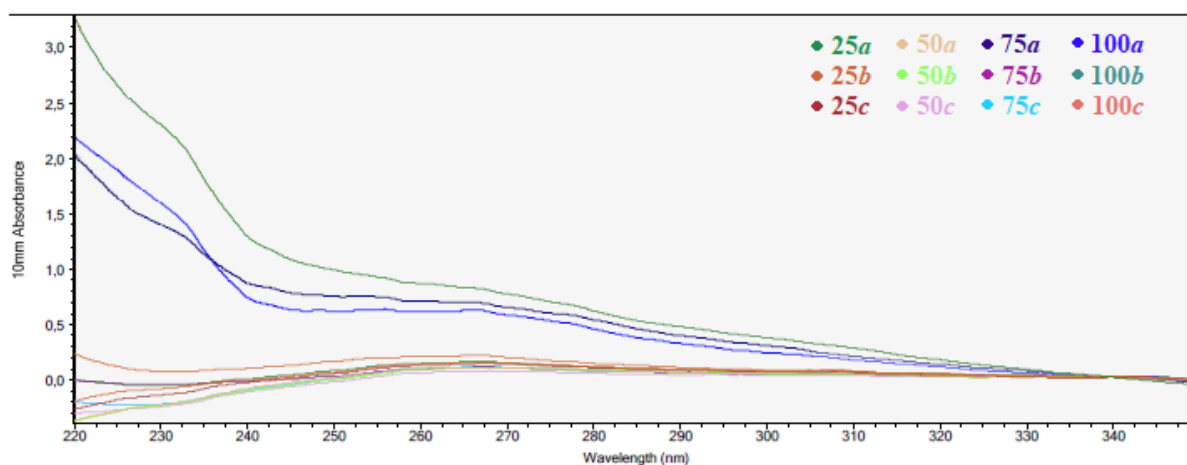
→ Byly detegovány produkty PCR různé intenzity v závislosti na množství DNA ve směších pro PCR.

8.4.2 Eluce DNA do objemu elučního pufu 25 μ l

Pro izolaci DNA pomocí magnetických částic byly namíchány 4 různé separační směsi s různým množstvím homogenátu ze zmraženého kořene červené řepy (300 mg) podle kapitoly 7.5.2, Tabulka 5. DNA byla izolována ze čtyř separačních směsí lišících se množstvím rostlinného homogenátu a NaCl. DNA byla eluována do stejného množství (25 μ l) TE pufu. Každá separační směs byla připravena ve třech opakováních.

Pomocí NanoDropu byly stanoveny koncentrace DNA podle kapitoly 7.5.3. Graf závislosti absorbance na vlnové délce, koncentrace DNA a poměry absorbancí A_{260}/A_{280} jsou zobrazeny v Grafu 4 a Tabulce 15.

Graf 4: Grafická závislost absorbance DNA na vlnové délce. Byla měřena DNA izolovaná ze zmraženého kořene červené řepy ze separačních směsí s různým množstvím homogenátu a NaCl. DNA byla eluována do 25 μ l TE pufu ve třech opakováních (a, b, c).



Tabulka 15: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované ze separačních směsí s různým množstvím homogenátů a NaCl, s elucí do 25 μ l TE pufru ve třech opakováních.

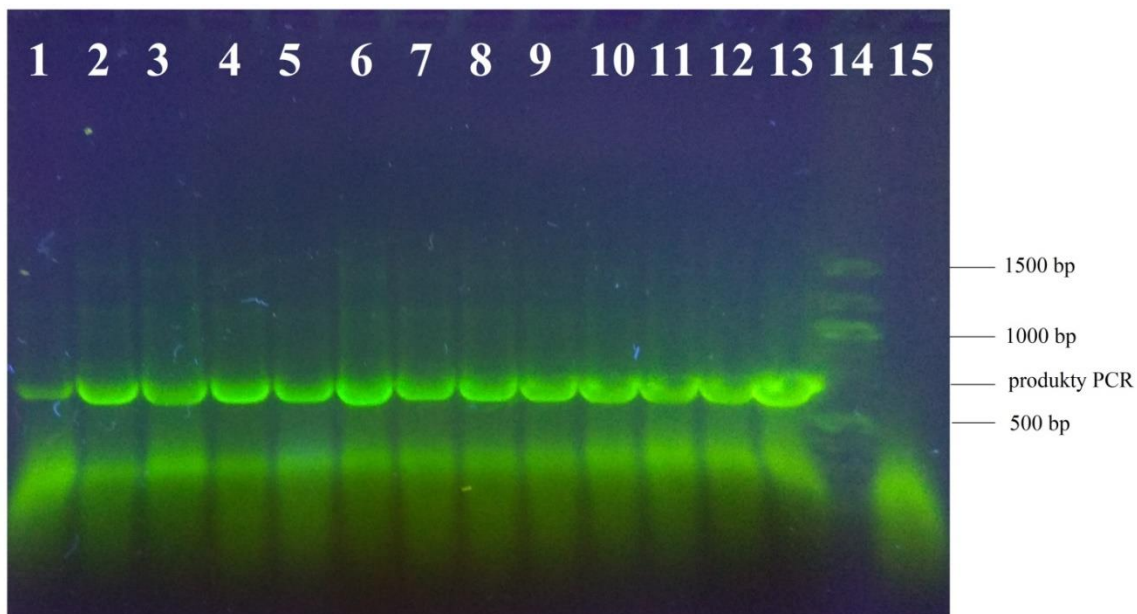
Zmražená červená řepa kořen (300 mg)			Koncentrace DNA [ng/ μ l]	Celkové množství DNA [ng]	A_{260}	A_{280}	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
Množství homogenátu [μ l]	Množství elučního pufru [μ l]	Množství NaCl [μ l]						
25	25	100	42,5	1062,5	0,850	0,601	1,41	0,37
			5,9	147,5	0,117	0,093	1,26	–
			5,1	127,5	0,103	0,087	1,19	–
50	25	75	4,4	110,0	0,087	0,060	1,46	–
			3,3	82,5	0,067	0,057	1,17	–
			2,0	50,0	0,039	0,034	1,15	–
75	25	50	34,4	860,0	0,689	0,521	1,32	0,50
			3,7	92,5	0,075	0,060	1,25	–
			3,5	87,5	0,070	0,052	1,34	–
100	25	25	30,0	750,0	0,599	0,438	1,37	0,38
			6,2	155,0	0,123	0,086	1,44	–
			9,1	227,5	0,182	0,124	1,47	3,41

→ Se zvyšujícím se množstvím homogenátu v separačních směsích na úkor množství 5 M NaCl nedochází k izolaci většího množství DNA. Je izolováno přibližně stejné množství DNA.

8.4.2.1 Amplifikace DNA pomocí PCR

DNA byla amplifikována polymerázovou řetězovou reakcí podle postupů v kapitole 7.5.4. Produkty PCR byly detegovány pomocí agarózové gelové elektroforézy dle kapitoly 7.5.5. Na Obrázku 16 je zobrazen gel po skončení elektroforézy, který byl pozorován pod UV světlem.

Obrázek 16: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (asi 700 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná z různých množství homogenátů a NaCl v separačních směsích. DNA byla eluována do 25 μ l TE pufru.



Běh	DNA	Množství homogenátu [μ l]	Množství elučního pufru [μ l]	Množství NaCl [μ l]	Množství DNA [ng] pro PCR směs	Detekce produktu PCR
1	Zmražená červená řepa- kořen	25	25	100	10,2	+
2					11,8	++
3					85,0	++
4		50	25	75	4,0	++
5					6,6	++
6					8,8	++
7		75	25	50	7,0	++
8					7,4	++
9					68,8	++
10		100	25	25	18,2	++
11					12,4	++
12					60,0	++
13	PK (<i>B. oleracea</i> 1 ng/ μ l)				2	+++
14	DNA standard					
15	NK				–	–

– produkt PCR nedetegován

+, ++, +++ detegován produkt PCR různé intenzity

PK– pozitivní kontrola, NK– negativní kontrola

→ DNA byla ve všech směsích pro PCR amplifikována a byly detegovány produkty PCR přibližně stejné intenzity.

8.5 Testování izolace DNA z homogenátů s různým množstvím NaCl

V předcházející části bylo ukázáno, že snížení koncentrace NaCl v separační směsi negativně ovlivňuje množství izolované DNA. Aby bylo možno v separační směsi zvýšit množství homogenátu (a tím docílit většího množství izolované DNA), byly připraveny homogenáty v lyzačních pufrách s CTAB s různým množstvím NaCl (1,5 M; 2,0 M; 2,5 M; 3,0 M) dle postupu 7.4.1. Množství homogenátu lze navýšit i na úkor polyethylenglykolu (PEG). Proto byly pro izolaci vysokomolekulární DNA testovány separační směsi s 16%, 10% nebo 8% PEG (kapitola 7.5.2, Tabulka 6).

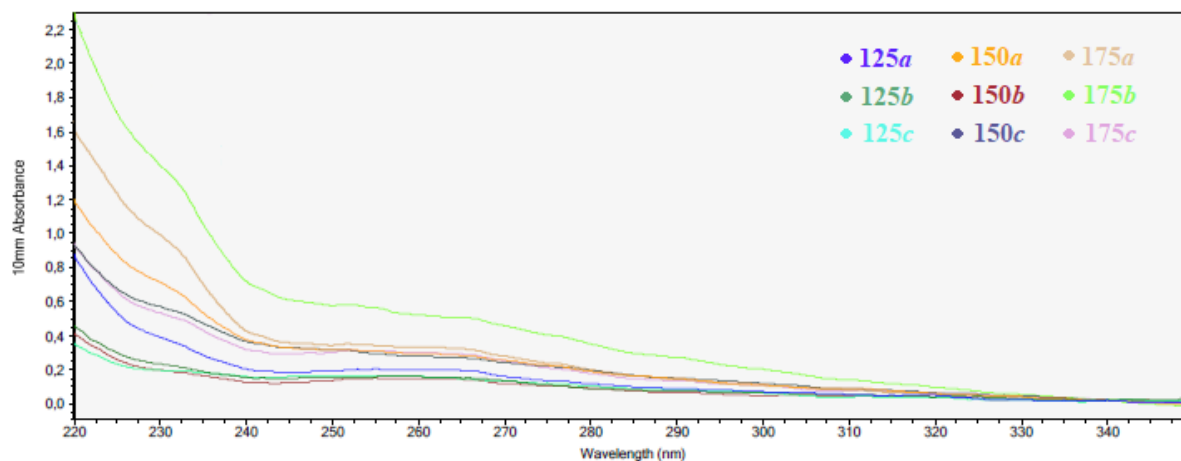
8.5.1 Izolace DNA z homogenátů v CTAB s 1,5 M NaCl

Pro izolaci DNA byly namíchány tři různé separační směsi, lišící se koncentrací PEG (16%, 10%, 8%) a množstvím homogenátu (125 μ l, 150 μ l a 175 μ l) připraveném v CTAB pufru s 1,5 M NaCl podle kapitoly 7.5.2, Tabulky 6. DNA byla eluována do 50 μ l TE pufru.

8.5.1.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

Pomocí NanoDropu byly naměřeny koncentrace DNA izolované ze separačních směsí. Postupováno bylo podle kapitoly 7.5.3. Na Grafu 5 jsou zobrazeny závislosti absorbance na vlnové délce. Hodnoty koncentrací DNA a poměry absorbancí A_{260}/A_{280} byly zapsány do Tabulky 16.

Graf 5: Grafické znázornění závislosti absorbance DNA na vlnové délce. Měřena byla DNA izolovaná z různých množství homogenátu (125 μ l, 150 μ l a 175 μ l) v separačních směsích s CTAB pufrům s 1,5 M NaCl a 16%, 10% a 8% PEG ve třech opakováních (a, b, c).



Tabulka 16: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA. Měřená DNA byla izolována z různých množství homogenátu v CTAB s 1,5 M NaCl v separačních směsích, které se lišily koncentrací PEG (8%, 10% a 16%) ve třech opakováních.

Zmražená červená řepa kořen (300 mg)		Koncentrace DNA [ng/μl]	Celkové množství DNA [ng]	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	A _{260/230}
Množství homogenátu [μl]	PEG (%)						
125	16	9,0	450	0,181	0,098	1,84	0,48
		7,0	350	0,141	0,071	1,67	0,60
		7,1	355	0,142	0,084	1,70	0,80
150	10	13,8	690	0,276	0,171	1,61	0,40
		6,4	320	0,128	0,073	1,76	0,71
		13,1	655	0,261	0,176	1,48	0,47
175	8	15,6	780	0,312	0,181	1,72	0,32
		15,3	765	0,506	0,334	1,51	0,36
		14,2	710	0,285	0,161	1,77	0,55

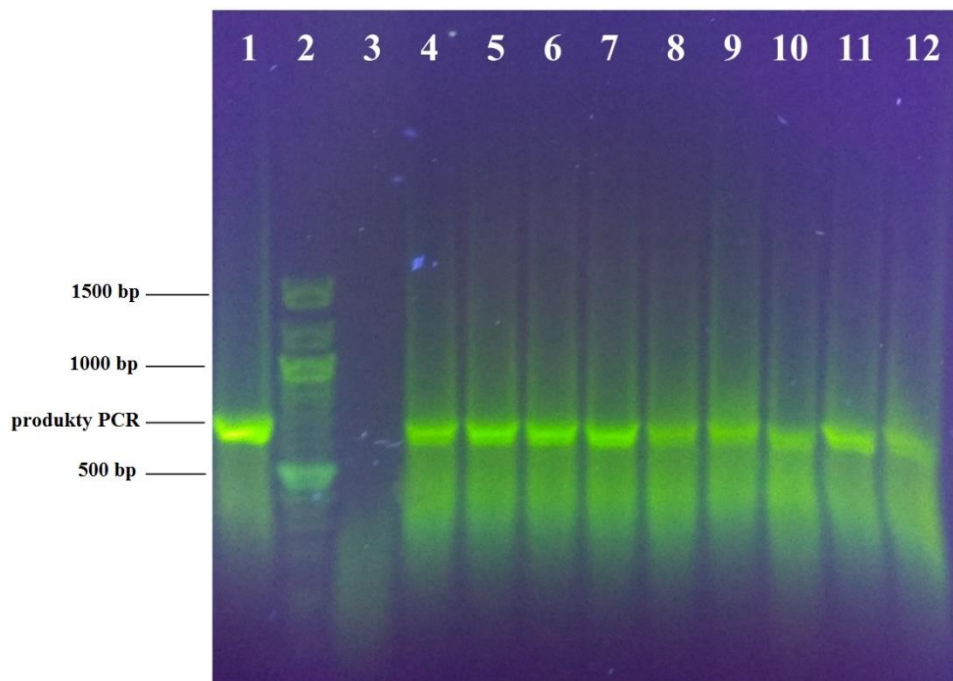
→ Z většího množství homogenátu bylo izolováno větší množství DNA.

→ Největší množství DNA bylo izolováno ze separačních směsí s 8% PEG (14,2–15,6 ng/μl). DNA byla znečištěna $A_{260}/A_{280} = 1,51–1,77$ a $A_{260}/A_{230} = 0,32–0,55$.

8.5.1.2 Amplifikace DNA pomocí PCR

Kvalita DNA byla ověřena pomocí PCR. DNA byla amplifikována polymerázovou řetězovou reakcí podle postupů v kapitole 7.5.4. Produkty PCR byly detegovány pomocí agarózové gelové elektroforézy dle kapitoly 7.5.5. Na Obrázku 17 je zobrazen gel po skončení elektroforézy, který byl pozorován pod UV světlem.

Obrázek 17: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (asi 700 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná z různých množství homogenátů v CTAB pufru s 1,5 M NaCl v separačních směsích s 8%, 10% a 16% koncentrací PEG.



Běh	DNA	Množství homogenátu [μl]	PEG (%)	Množství DNA [ng] pro PCR směs	Detekce produktu PCR
1	PK (<i>B. oleracea</i> 1 ng/μl)			2	+++
2	DNA standard				
3	NK			–	–
4	Zmražená červená řepa-kořen	125	16	18,0	++
5				14,0	++
6				14,2	++
7		150	10	27,6	++
8				12,8	++
9				26,2	++
10		175	8	31,2	++
11				30,6	++
12				28,4	++

– produkt PCR nedetegován

+, ++, +++ detegován produkt PCR různé intenzity

PK– pozitivní kontrola, NK– negativní kontrola

→ DNA byla amplifikována a byly detegovány intenzivní produkty PCR v délce asi 700 bp.

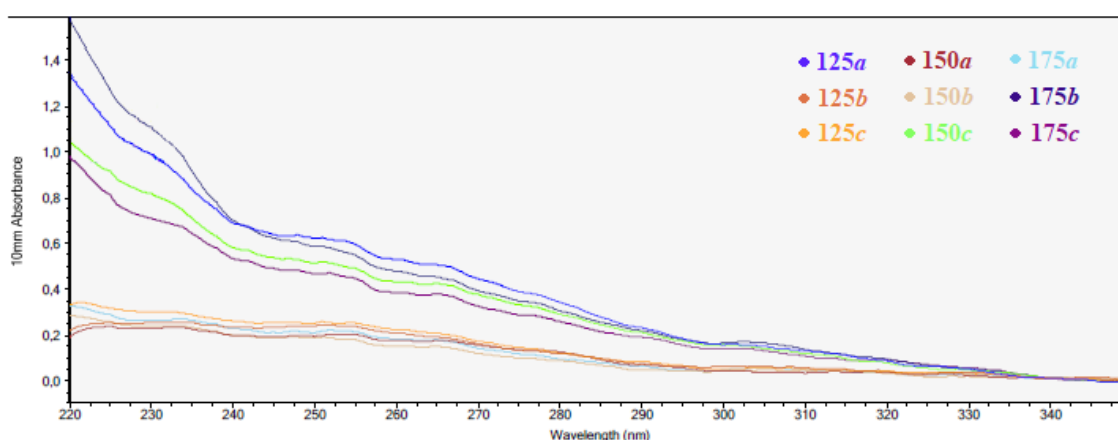
8.5.2 Izolace DNA z homogenátů v CTAB s 2 M NaCl

DNA byla izolována ze tří různých separačních směsí, lišící se koncentrací PEG (16%, 10%, 8%) a množstvím homogenátu (125 μ l, 150 μ l a 175 μ l) připravených v CTAB pufru s 2 M NaCl podle kapitoly 7.5.2, Tabulky 6. Eluce byla provedena do 50 μ l TE pufru.

8.5.2.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Spektrofotometricky byla měřena koncentrace a čistota DNA. Postupováno bylo podle kapitoly 7.5.3. Graf 6 zobrazuje závislost absorbance na vlnové délce. Koncentrace DNA a poměry absorbancí A_{260}/A_{280} jsou uvedeny v Tabulce 17.

Graf 6: Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnové délce. Měřena byla DNA izolována z různých množství homogenátu (125 μ l, 150 μ l, 175 μ l) v separačních směsích s CTAB pufrům s 2 M NaCl a s 16%, 10% a 8% PEG ve třech opakováních (a, b, c).



Tabulka 17: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA. DNA byla izolována z různých množství homogenátu v CTAB s 2 M NaCl v separačních směsích, které se lišily koncentrací PEG (8%, 10% a 16%) ve třech opakováních.

Zmražená červená řepa kořen (300 mg)		Koncentrace DNA [ng/ μ l]	Celkové množství DNA [ng]	A_{260}	A_{280}	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
Množství homogenátu [μ l]	PEG (%)						
125	16	16,0	800	0,519	0,333	1,56	0,53
		9,7	485	0,195	0,108	1,80	0,80
		10,6	530	0,212	0,109	1,94	0,73
150	10	8,3	415	0,165	0,115	1,44	0,76
		7,0	350	0,139	0,076	1,84	0,61
		21,1	1 055	0,422	0,280	1,50	0,52
175	8	8,5	425	0,170	0,083	1,66	0,68
		23,3	1 165	0,467	0,295	1,58	0,42
		18,7	935	0,374	0,246	1,52	0,53

→ Z většího množství homogenátu bylo izolováno větší množství DNA.

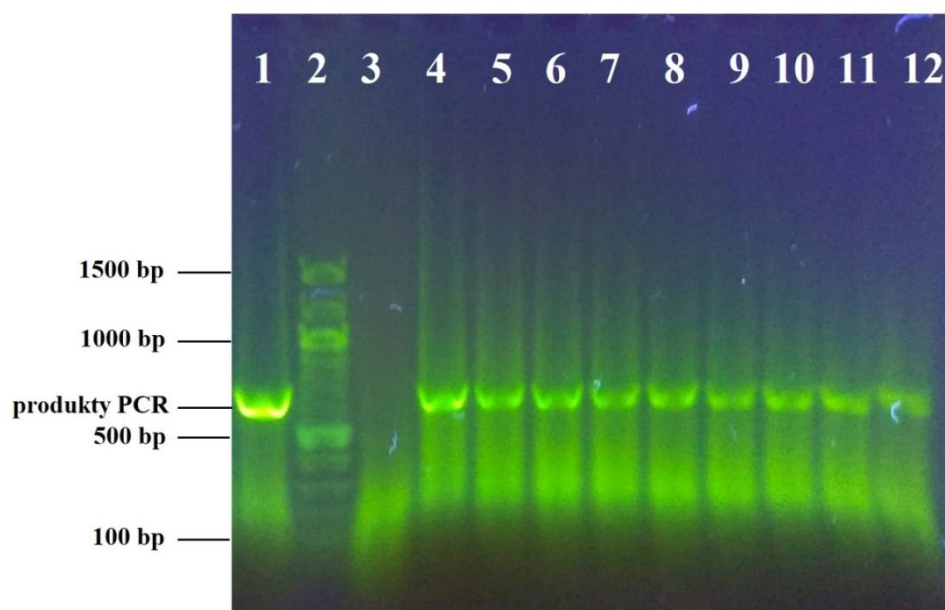
→ Největší množství DNA bylo izolováno ze separační směsí s 8% PEG (8,5–23,3 ng/μl).

→ DNA byla znečištěna ($A_{260}/A_{280}= 1,44-1,94$, $A_{260}/A_{230}= 0,42-0,80$).

8.5.2.2 Amplifikace DNA pomocí PCR

DNA byla amplifikována polymerázovou řetězovou reakcí podle postupů v kapitole 7.5.4. Produkty PCR byly detegovány pomocí agarózové gelové elektroforézy dle kapitoly 7.5.5. Na Obrázku 18 je zobrazen gel po skončení elektroforézy, který byl pozorován pod UV světlem.

Obrázek 18: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (asi 700 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná z různých množství homogenátů v CTAB pufru s 2 M NaCl v separačních směsích s 8%, 10% a 16% PEG.



Běh	DNA	Množství homogenátu [μl]	PEG (%)	Množství DNA [ng] pro PCR směs	Detekce produktu PCR
1	PK (<i>N. tabacum</i> 1 ng/μl)			2	+++
2	DNA standard				
3	NK			–	–
4	Zmražená červená řepa-kořen	125	16	32,0	++
5				19,4	++
6				21,2	++
7		150	10	16,6	++
8				14,0	++
9				42,2	++

10				17,0	++
11		175	8	46,6	++
12				37,4	++

– produkt PCR nedetegován

+, ++, +++ detegován produkt PCR různé intenzity

PK– pozitivní kontrola, NK– negativní kontrola

→ DNA byla amplifikována a byly detegovány poměrně intenzivní produkty PCR v délce asi 700 bp.

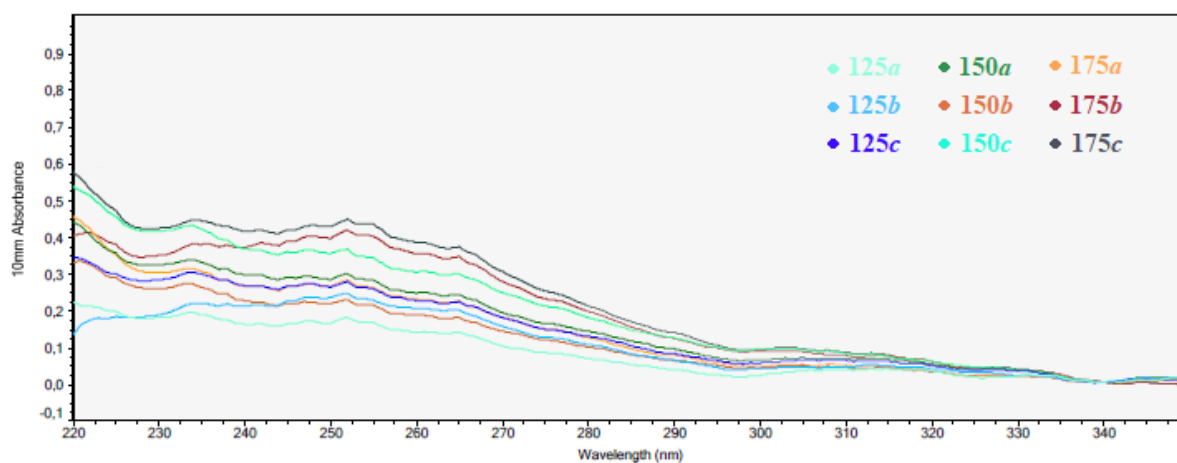
8.5.3 Izolace DNA z homogenátů v CTAB s 2,5 M NaCl

Pro izolaci DNA byly namíchány tři různé separační směsi, lišící se koncentrací PEG (16%, 10%, 8%) a množstvím homogenátu (125 μ l, 150 μ l a 175 μ l) podle kapitoly 7.5.2, Tabulky 6. DNA byla eluována do 50 μ l TE pufru.

8.5.3.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Byly naměřeny koncentrace a čistota DNA izolované z čerstvé červené řepy. Postupováno bylo přesně podle kapitoly 7.5.3. Závislosti absorbance na vlnové délce jsou zobrazeny na Grafu 7, koncentrace DNA a poměry absorbancí A_{260}/A_{280} jsou v Tabulce 18.

Graf 7: Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnové délce. Měřena byla DNA izolovaná z různých množství homogenátu (125 μ l, 150 μ l, 175 μ l) v separačních směsích s CTAB pufrům s 2,5 M NaCl a s 16%, 10% a 8% PEG ve třech opakováních (a, b, c).



Tabulka 18: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA. Měřená DNA byla izolována z homogenátu v CTAB s 2,5 M NaCl v separačních směsích, které se lišily koncentrací PEG 6000 (8%, 10% a 16%), ve třech opakováních.

Zmražená červená řepa kořen (300 mg)		Koncentrace DNA [ng/μl]	Celkové množství DNA [ng]	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	A _{260/230}
Množství homogenátu [μl]	PEG (%)						
125	16	15,7	785	0,135	0,063	1,76	0,77
		10,0	500	0,199	0,102	1,72	0,86
		11,1	555	0,222	0,124	1,78	0,80
150	10	12,1	605	0,242	0,138	1,75	0,76
		9,1	455	0,181	0,095	1,90	0,71
		15,0	750	0,299	0,176	1,70	0,73
175	8	21,3	1 065	0,225	0,121	1,80	0,86
		17,4	870	0,349	0,193	1,81	1,01
		19,0	950	0,381	0,208	1,83	0,91

→ Z většího množství homogenátu bylo izolováno větší množství DNA.

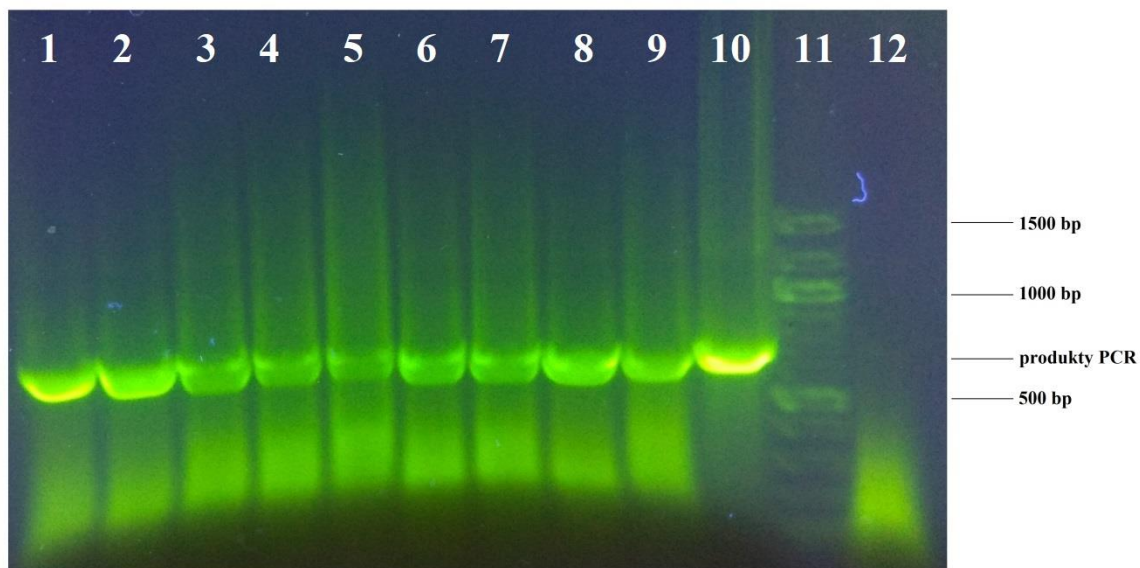
→ Největší množství DNA bylo izolováno ze separační směsi se 175 μl homogenátu a 8% PEG.

→ DNA byla méně znečištěna ($A_{260}/A_{280} = 1,70-1,90$; $A_{260}/A_{230} = 0,71-1,01$).

8.5.3.2 Amplifikace DNA pomocí PCR

DNA byla amplifikována polymerázovou řetězovou reakcí podle postupů v kapitole 7.5.4. Produkty PCR byly detegovány pomocí agarózové gelové elektroforézy dle kapitoly 7.5.5. Na Obrázku 19 je zobrazen gel po skončení elektroforézy, který byl pozorován pod UV světlem.

Obrázek 19: Detekce produktů PCR pomocí agarózové gelové elektroforézy (asi 700 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná z různých množství homogenátů v CTAB pufru s 2,5 M NaCl v separačních směsích s 8%, 10% a 16% PEG.



Běh	DNA	Množství homogenátu [μl]	PEG (%)	Množství DNA [ng] pro PCR směs	Detekce produktu PCR
1	Zmražená červená řepa-kořen	125	16	31,4	+++
2				20,0	+++
3				22,2	+++
4		150	10	24,2	++
5				18,2	++
6				30,0	++
7		175	8	42,6	++
8				34,8	+++
9				38,0	+++
10	PK (<i>N. tabacum</i> 1 ng/μl)			2	+++
11	DNA standard				
12	NK			–	–

– produkt PCR nedetegován

+, ++, +++ detegován produkt PCR různé intenzity

PK– pozitivní kontrola, NK– negativní kontrola

→ DNA byla amplifikována a byly detegovány intenzivní produkty PCR v délce asi 700 bp.

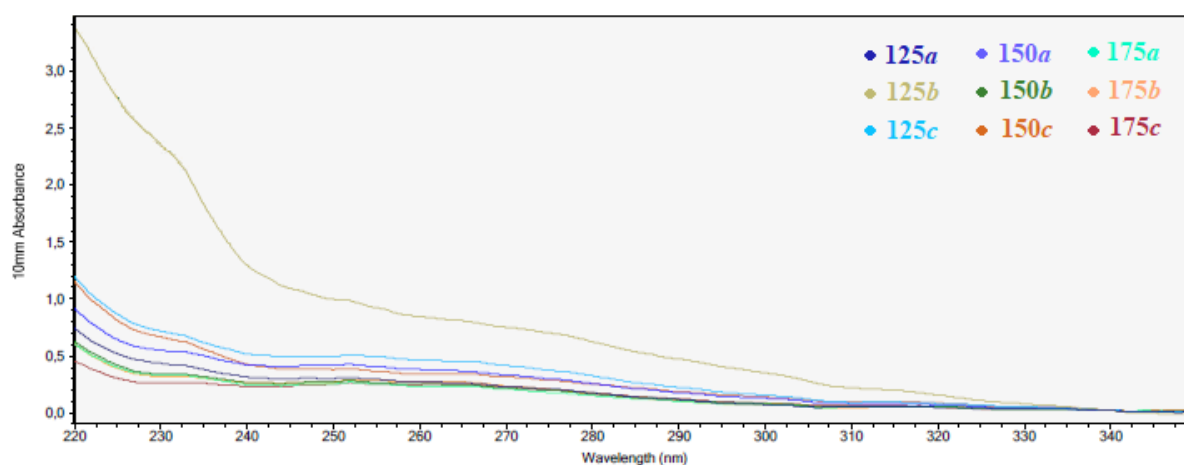
8.5.4 Izolace DNA z homogenátů v CTAB s 3 M NaCl

Pro izolaci DNA byly namíchány tři různé separační směsi, lišící se koncentrací PEG (16%, 10%, 8%) a množstvím homogenátu (125 μ l, 150 μ l a 175 μ l) podle kapitoly 7.5.2, Tabulky 6. Eluce byla provedena do 50 μ l TE pufru.

8.5.4.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Byly naměřeny koncentrace a čistota DNA izolované z čerstvé červené řepy. Postupováno bylo přesně podle kapitoly 7.5.3. Graf 8 znázorňuje závislosti absorbance na vlnové délce. V Tabulce 19 jsou zobrazeny naměřené hodnoty koncentrace DNA a poměry absorbancí A_{260}/A_{280} .

Graf 8: Grafické znázornění závislosti absorbance na vlnové délce. Měřena byla DNA izolována z různých množství homogenátu (125 μ l, 150 μ l, 175 μ l) v separačních směsích s CTAB puforem s 3 M NaCl a s 16%, 10% a 8% PEG ve třech opakováních (a, b, c).



Tabulka 19: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA. DNA byla izolována z homogenátu v CTAB s 3 M NaCl, které se lišily koncentrací PEG 6000 (8%, 10% a 16%) ve třech opakováních.

Zmražená červená řepa kořen (300 mg)		Koncentrace DNA [ng/ μ l]	Celkové množství DNA [ng]	A_{260}	A_{280}	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
Množství homogenátu [μ l]	PEG (%)						
125	16	12,5	625	0,250	0,153	1,64	0,60
		16,2	810	0,824	0,604	1,36	0,35
		22,1	1 105	0,443	0,302	1,47	0,64
150	10	17,8	890	0,357	0,235	1,52	0,68
		11,4	570	0,227	0,144	1,58	0,71
		16,1	805	0,322	0,229	1,41	0,50
175	8	10,6	530	0,211	0,127	1,66	0,68
		12,5	625	0,251	0,146	1,72	0,84
		11,2	560	0,224	0,150	1,49	0,94

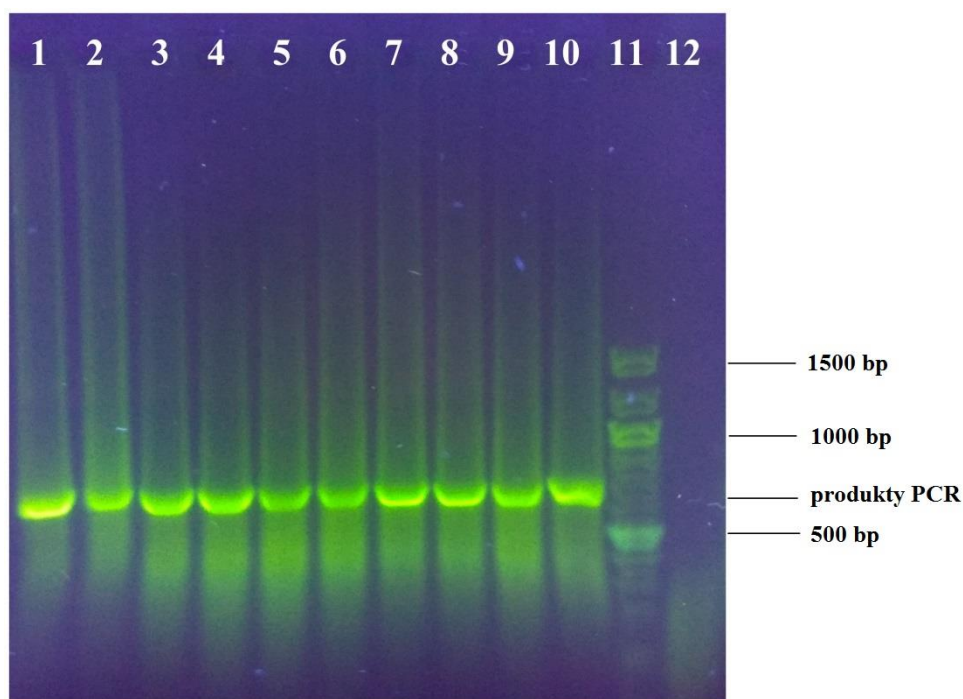
→ Největší množství DNA bylo izolováno ze 125 μ l homogenátu v separační směsi s 16% PEG (12,5–22,1 ng/ μ l).

→ DNA byla znečištěna ($A_{260}/A_{280}= 1,36-1,72$; $A_{260}/A_{230}= 0,35-0,94$).

8.5.4.2 Amplifikace DNA pomocí PCR

DNA byla amplifikována polymerázovou řetězovou reakcí podle postupů v kapitole 7.5.4. Produkty PCR byly detegovány pomocí agarózové gelové elektroforézy dle kapitoly 7.5.5. Na Obrázku 20 je zobrazen gel po skončení elektroforézy, který byl pozorován pod UV světlem.

Obrázek 20: Detekce produktů PCR pomocí agarózové gelové elektroforézy (asi 700 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná z různých množství homogenátů v CTAB pufru s 3 M NaCl v separačních směsích s 8%, 10% a 16% PEG.



Běh	DNA	Množství homogenátu [μ l]	PEG (%)	Množství DNA [ng] pro PCR směs	Detekce produktu PCR
1	Zmražená červená řepa-kořen	125	16	25,0	+++
2				32,4	++
3				44,2	++
4		150	10	35,6	++
5				22,8	++
6				32,2	++
7		175	8	21,2	+++
8				25,0	++
9				22,4	++

10	PK (<i>B. oleracea</i> 1 ng/μl)			2	+++
11	DNA standard				
12	NK			–	–

– produkt PCR nedetegován

+, ++, +++ detegován produkt PCR různé intenzity

PK– pozitivní kontrola, NK– negativní kontrola

→ DNA byla amplifikována a byly detegovány poměrně intenzivní produkty PCR v délce asi 700 bp.

8.5.5 Porovnání množství a kvality izolované DNA

U separačních směsí z homogenátů s CTAB s různým množstvím NaCl a PEG bylo porovnáno množství a kvalita izolované DNA.

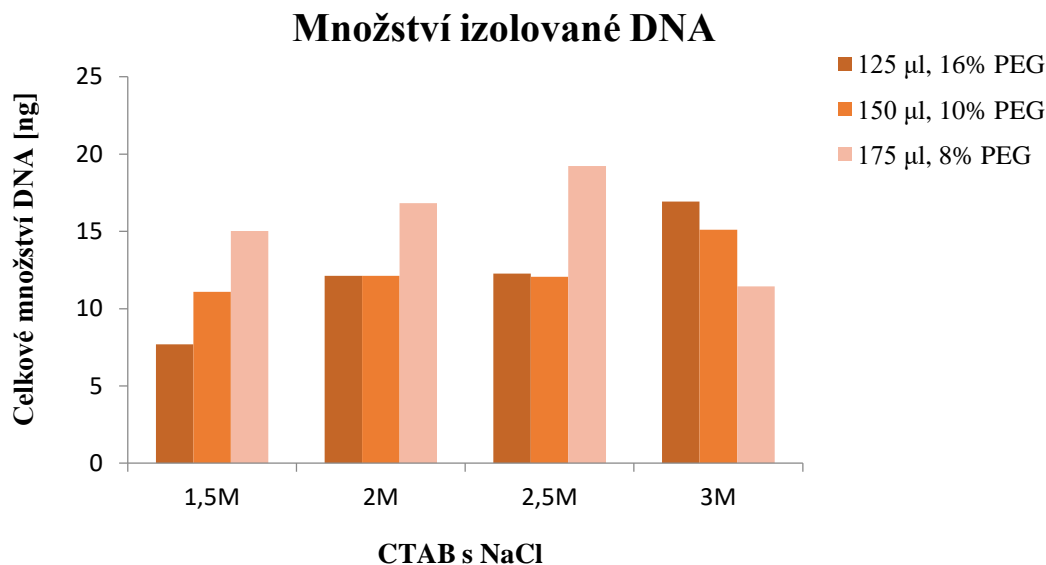
8.5.5.1 Množství izolované DNA

Hodnoty celkových množství DNA izolovaných z kořene zmražené červené řepy (300 mg) jsou uvedeny v předchozích Tabulkách 16–19. Byly vypočteny průměrné hodnoty (Tabulka 20) a porovnány v Grafu 9.

Tabulka 20: Průměrné hodnoty celkového množství izolované DNA v separačních směsích obsahujících různé množství NaCl a různé množství PEG. Hodnoty jsou uvedené v ng.

Celkové množství DNA [ng]		PEG		
		16%	10%	8%
CTAB s NaCl	1,5 M	7,70	11,10	15,03
	2 M	12,13	12,13	16,83
	2,5 M	12,27	12,07	19,23
	3 M	16,93	15,1	11,43

Graf 9: Závislost množství izolované DNA na množství NaCl v lyzačním pufru s CTAB, na množství homogenátu (125 μ l, 150 μ l, 175 μ l) a na koncentraci PEG (16%, 10%, 8%) v separační směsi.



→ Největší množství DNA bylo izolováno z 175 μ l homogenátů ze separační směsi s homogenátů v CTAB pufru s 2,5 M NaCl a 8% PEG.

8.5.5.2 Kvalita DNA

Kvalita izolované DNA byla zjištěna z poměrů absorbancí A_{260}/A_{280} . Poměr vlnových délek 260 nm a 280 nm ukazuje míru znečištění DNA proteiny. Hodnota s poměrem absorbancí mezi 1,8–2,0 je považována jako čistá DNA. Pokud je hodnota vyšší než 2,0 je DNA znečištěna RNA, v případě nižší hodnoty je DNA znečištěna proteiny.

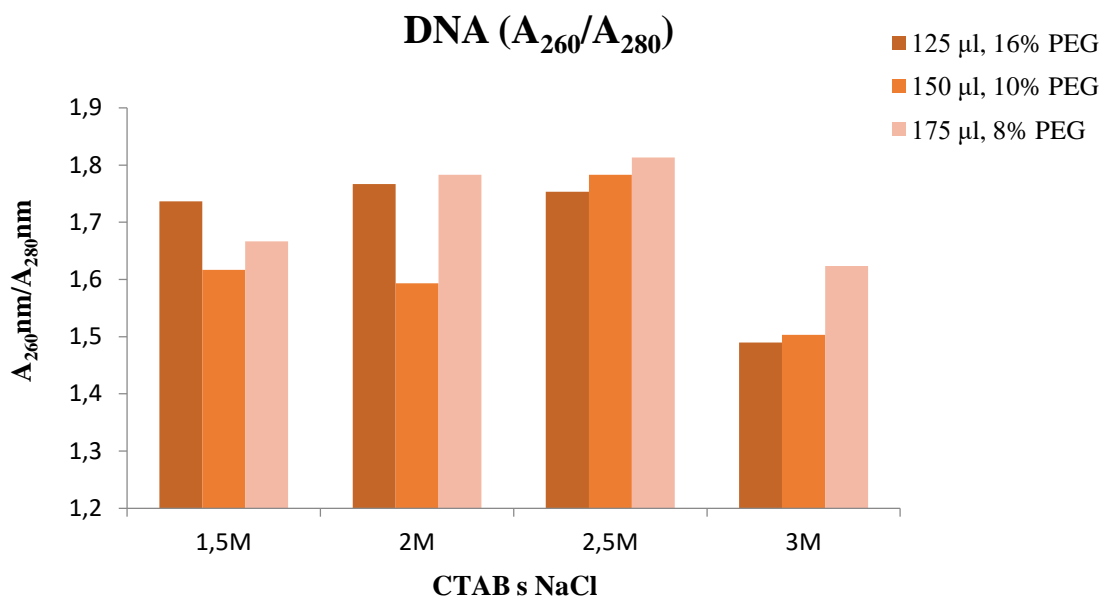
Kvalita DNA lze zjistit také z poměrů absorbancí A_{260}/A_{230} . Z tohoto poměru usuzujeme, je-li DNA znečištěna polyfenoly. Za čistou DNA považujeme hodnotu blížíci se 2,0. Nižší hodnota ukazuje znečištění polyfenolickými látkami.

Hodnoty poměrů absorbancí A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230} u izolovaných DNA (Tabulky 16–19) byly zprůměrovány a uvedeny do Tabulky 21 a Tabulky 22 a znázorněny na Grafu 10 a Grafu 11.

Tabulka 21: Průměrné hodnoty poměrů absorbancí A_{260}/A_{280} z DNA izolované ze separačních směsí.

Poměry absorbancí A_{260}/A_{280}		PEG		
		16%	10%	8%
CTAB s NaCl	1,5 M	1,74	1,62	1,67
	2 M	1,77	1,59	1,78
	2,5 M	1,75	1,78	1,81
	3 M	1,49	1,50	1,62

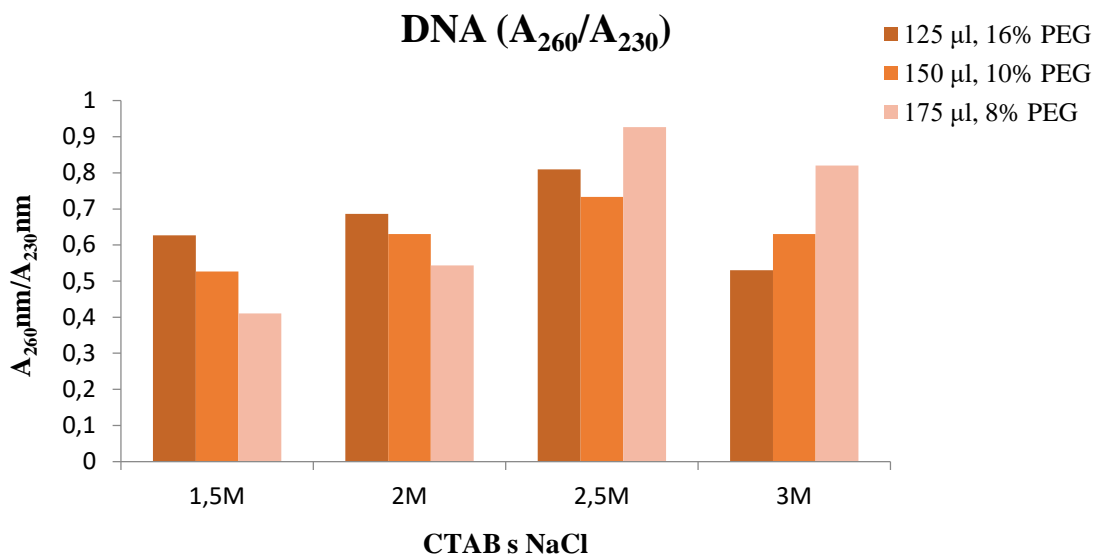
Graf 10: Závislost poměru absorbancí A_{260}/A_{280} na množství NaCl v lyzačním pufru s CTAB, množství homogenátu a na koncentraci PEG.



Tabulka 22: Průměrné hodnoty poměrů absorbancí A_{260}/A_{230} z DNA izolované ze separačních směsí.

Poměry absorbancí A_{260}/A_{230}		PEG		
		16%	10%	8%
CTAB s NaCl	1,5 M	0,63	0,53	0,41
	2 M	0,69	0,63	0,54
	2,5 M	0,81	0,73	0,93
	3 M	0,53	0,63	0,82

Graf 11: Závislost poměru vlnových délek A_{260}/A_{230} na množství NaCl v lyzačním pufru s CTAB, množství homogenátu a na koncentraci PEG.



→ Nejlepších poměrů absorbancí A_{260}/A_{280} dosahovaly DNA izolované ze 175 μ l homogenátů v CTAB pufru s 2,5 M NaCl a 8% PEG.

→ Nejvyššího poměru absorbancí A_{260}/A_{230} dosahovala DNA izolovaná ze 175 μ l homogenátů v CTAB pufru s 2,5 M NaCl v separační směsi s 8% PEG.

8.5.5.3 Amplifikace DNA v PCR

Byla porovnána intenzita produktů PCR po amplifikaci DNA izolovaných ze separačních směsí s CTAB z homogenátů s různým množstvím NaCl a PEG. Byly detegovány intenzivní produkty PCR o velikosti asi 700 bp. Nejintenzivnější produkty PCR byly detegovány u DNA izolované ze separační směsi s CTAB s 2,5 M NaCl.

→ Pro další izolaci DNA v kvalitě vhodné pro PCR byl používán CTAB pufr s 2,5 M NaCl a 8% PEG.

8.6 Optimalizace teploty a doby eluce

DNA byla izolována z 300 mg zmraženého kořene červené řepy, postupováno bylo podle kapitoly 7.5.1. Směs byla homogenizována v lyzačním pufru s CTAB s 2,5 M NaCl bez přídavku chloroform- oktanolu. Po inkubaci a centrifugaci byla odebrána vrchní fáze s DNA. Do separační směsi bylo použito 175 μ l homogenátu, 50 μ l PEG (výsledná koncentrace 8 %) a 25 μ l magnetických částic P(GMA). DNA byla eluována do 50 μ l TE pufru podle kapitoly 7.5.2, Tabulka 6.

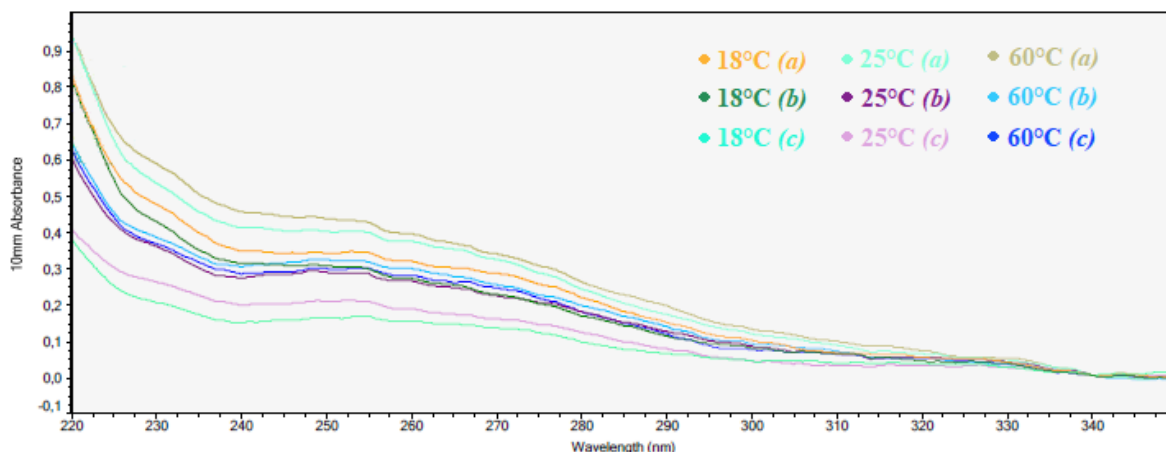
Eluce byla prováděna při laboratorní teplotě (18°C)/15 min, následně při 25°C/15 min a 60°C/15 min. Po odebrání 2 μ l eluované DNA pro PCR směs byly vzorky ponechány eluci v TE pufru 2 dny při 18°C.

8.6.1 Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Koncentrace a čistota DNA byla měřena pomocí NanoDropu, kde byla sledována teplota a doba eluce v TE pufru. DNA ze zmražené řepy byla izolována ve třech opakováních.

Absorpční křivky jsou zobrazeny v Grafu 12, hodnoty spektrofotometrického stanovení jsou zobrazeny v Tabulce 23. Měřena byla také eluce po 2 dnech při 18°C.

Graf 12: Grafické znázornění závislosti absorpance na vlnové délce. DNA byla izolována ze zmraženého kořene červené řepy. Sledována byla teplota eluce v TE pufru při 18°C, 25°C a 60°C ve třech opakováních (a, b, c).



Tabulka 23: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA. U izolované DNA z kořene zmražené červené řepy byla sledována teplota a doba eluce v TE pufru. DNA byla izolována ve třech opakováních.

Zmražená červená řepa kořen (300 mg)		Koncentrace DNA [ng/μl]	Celkové množství DNA [ng]	Průměrné množství DNA [ng]	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	A _{260/230}
Teplota eluce	Doba eluce							
18°C	15 min	15,7	785	610	0,315	0,215	1,47	0,67
		13,4	670		0,267	0,164	1,63	0,63
		7,5	375		0,150	0,092	1,62	0,74
25°C	15 min	18,5	925	685	0,369	0,238	1,55	0,70
		13,5	675		0,259	0,175	1,49	0,73
		9,1	455		0,183	0,117	1,56	0,71
60°C	15 min	19,5	975	798	0,390	0,258	1,51	0,67
		14,7	735		0,294	0,192	1,53	0,77
		13,7	685		0,275	0,174	1,58	0,76
18°C	2 dny	19,8	990	852	0,289	0,182	1,58	0,79
		16,2	810		0,364	0,211	1,72	0,81
		15,1	755		0,322	0,184	1,75	0,88

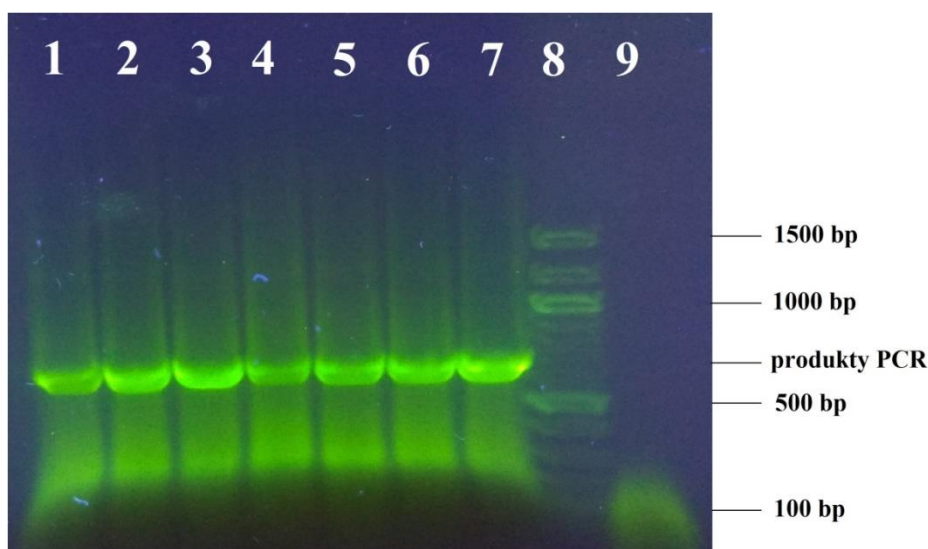
→ Spektrofotometricky byla stanovena koncentrace DNA na 7,5–19,8 ng/μl.

→ Testovaná teplota ani doba eluce neměla na množství izolované DNA výrazný vliv.

8.6.2 Amplifikace DNA pomocí PCR

Izolovaná DNA byla amplifikována polymerázovou řetězovou reakcí podle postupů v kapitole 7.5.4. Produkty PCR byly detegovány pomocí agarózové gelové elektroforézy dle kapitoly 7.5.5. Na Obrázku 21 je zobrazen gel po skončení elektroforézy, který byl pozorován pod UV světlem.

Obrázek 21: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (asi 700 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná ze zmražené červené řepy kořene. Byla testována různá teplota (18°C, 60°C) a doba eluce (2 dny, 15 min) do TE pufru.



Běh	DNA	Teplota eluce	Doba eluce	Opakování	Množství DNA [ng] pro PCR směs	Detekce produktu PCR
1	Zmražená červená řepa-kořen	18°C	2 dny	a	28,8	+++
2				b	36,4	+++
3				c	32,2	+++
4		60°C	15 min	a	39,0	+++
5				b	29,4	+++
6				c	27,4	+++
7	PK (<i>B. oleracea</i> 1 ng/μl)				2	+++
8	DNA standard					
9	NK				–	–

– produkt PCR nedetegován

+, ++, +++ detegován produkt PCR různé intenzity

PK– pozitivní kontrola, NK– negativní kontrola

→ Byly detegovány intenzivní produkty PCR předpokládané délky.

8.7 Izolace rostlinné DNA z potravinových výrobků obsahujících červenou řepu

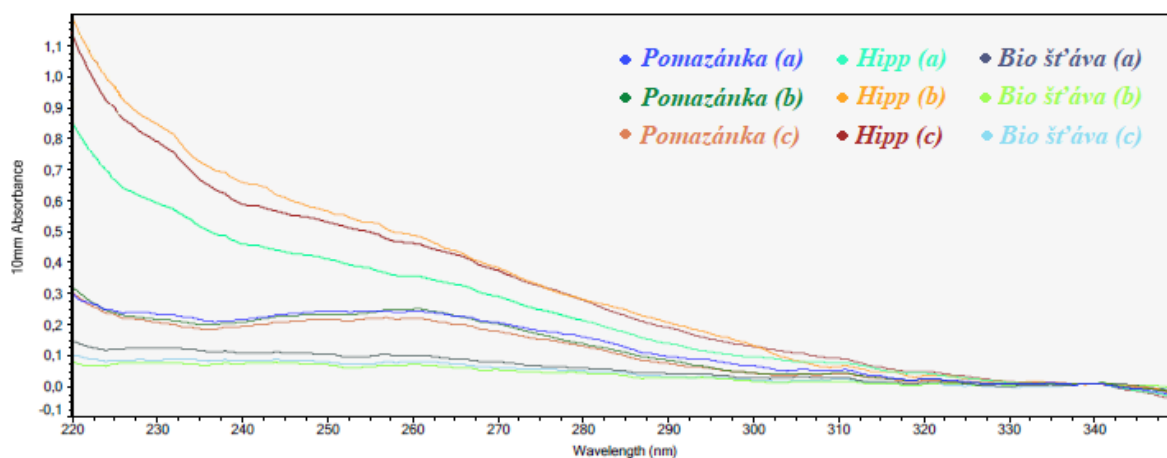
DNA byla izolována z těchto potravinových výrobků obsahujících červenou řepu: dmBio pomazánka z červené řepy a křene (vegan), dětský příkrm HiPP obsahující červenou řepu s jablky a hovězím masem a 100% bio šťáva z jablek a červené řepy (Obrázek 5, 6, 7). Pro izolaci rostlinné DNA bylo odváženo 300 mg potravinových výrobků, v případě šťávy bylo odebráno 200 μ l.

Homogenáty byly připraveny v lyzačním pufru s CTAB s 2,5 M NaCl a 8% PEG. DNA byla izolována po přidavku chloroform- oktanolu podle postupu v kapitole 7.5.1.2. Pro izolaci DNA pomocí magnetických částic byla namíchána separační směs podle kapitoly 7.5.2, Tabulka 6. DNA byla eluována do 50 μ l TE pufru (25°C/15 min).

8.7.1 Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Byly stanoveny koncentrace a čistota DNA izolované z výrobků obsahujících červenou řepu. Postupováno bylo podle kapitoly 7.5.3. Závislosti absorbance na vlnové délce byly znázorněny na Grafu 13 z DNA izolované z potravinových výrobků s přidavkem chloroform- oktanolu. Naměřené hodnoty koncentrace DNA a poměry absorbancí A_{260}/A_{280} jsou zobrazeny v Tabulce 24.

Graf 13: Absorpční křivky DNA izolované z výrobků obsahujících červenou řepu. DNA byla izolována v separační směsi s lyzačním pufrům s CTAB s 2,5 M NaCl a 8% PEG s přidavkem chloroform- oktanolu ve třech opakováních (a, b, c).



Tabulka 24: Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA a poměry absorbancí. DNA byla izolována z výrobků obsahujících červenou řepu z homogenátů s přidavkem chloroform- oktanolu ve třech opakováních (a, b, c).

Výrobky z červené řepy/ opakování	Koncentrace DNA [ng/μl]	Celkové množství DNA [ng]	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	A _{260/230}	
dmBio pomazánka (300 mg)	a	11,8	590	0,236	0,153	1,54	1,04
	b	12,1	605	0,242	0,130	1,86	1,16
	c	10,6	530	0,213	0,123	1,73	1,07
Dětský příkrm HiPP (300 mg)	a	17,5	875	0,349	0,205	1,70	0,60
	b	24,1	1 205	0,481	0,274	1,76	0,57
	c	22,8	1 140	0,455	0,272	1,67	0,58
Bio šťáva 100% (200 μl)	a	4,7	235	0,094	0,052	1,80	0,81
	b	3,2	160	0,064	0,037	1,76	0,94
	c	3,6	180	0,072	0,042	1,71	0,94

→ DNA byla izolovaná z potravinových výrobků obsahujících červenou řepu v koncentraci 3,2–24,1 ng/μl.

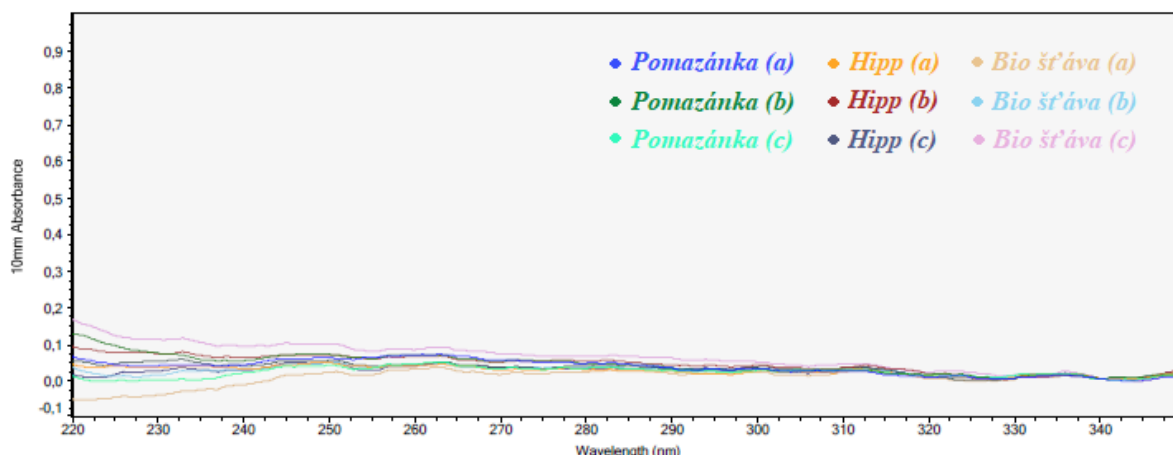
8.7.1.1 Amplifikace DNA v PCR

Byla provedena amplifikace izolované DNA s přidavkem chloroform- oktanolu pomocí PCR podle kapitoly 7.5.4. Produkty PCR nebyly pomocí agarózové gelové elektroforézy detegovány. Proto byla DNA přečišťována srážením isopropanolem.

8.7.2 Přečištění DNA přesrážením isopropanolem

Byla izolována DNA z potravinových výrobků obsahujících červenou řepu. Směs byla homogenizována v lyzačním pufru s CTAB s 2,5 M NaCl a 8% PEG podle kapitoly 7.5.2, Tabulka 6. Před izolací DNA byl použit přidavek chloroform- oktanolu a přesrážení isopropanolem podle postupů v kapitole 7.5.1.2 a 7.5.1.3 z důvodu komplexního složení vzorků. Spektrofotometricky byla stanovena koncentrace a čistota DNA. Závislosti absorbance na vlnové délce byly znázorněny na Grafu 14 a naměřené hodnoty koncentrace DNA a poměry absorbancí A₂₆₀/A₂₈₀ jsou zobrazeny v Tabulce 25.

Graf 14: Absorpční křivky DNA izolované z výrobků obsahujících červenou řepu. DNA byla izolována v lyzačním pufru s CTAB s 2,5 M NaCl s přidavkem chloroform- oktanolu a po přesrážení isopropanolem ve třech opakováních (a, b, c).



Tabulka 25: Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA. DNA byla izolována z výrobků obsahujících červenou řepu ve třech opakováních z homogenátů v lyzačním pufru s 2,5 M NaCl s přidavkem chloroform- oktanolu a po přesrážení isopropanolem.

Výrobky z červené řepy/ opakování		Koncentrace DNA [ng/μl]	Celkové množství DNA [ng]	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	A _{260/230}
dmBio pomazánka (300 mg)	a	3,2	160	0,064	0,041	1,56	1,86
	b	3,2	160	0,064	0,039	1,63	0,93
	c	2,0	100	0,040	0,027	1,49	–
Dětský příkrm HiPP (300 mg)	a	1,7	85	0,034	0,023	1,46	1,14
	b	2,9	145	0,059	0,046	1,26	0,86
	c	1,8	90	0,036	0,031	1,17	0,79
Bio šťáva 100% (200 μl)	a	1,2	60	0,025	0,017	1,47	–
	b	1,8	90	0,036	0,028	1,27	–
	c	3,9	195	0,078	0,059	1,34	0,74

→ Spektrofotometricky byla stanovena koncentrace DNA na 1,2–3,9 ng/μl.

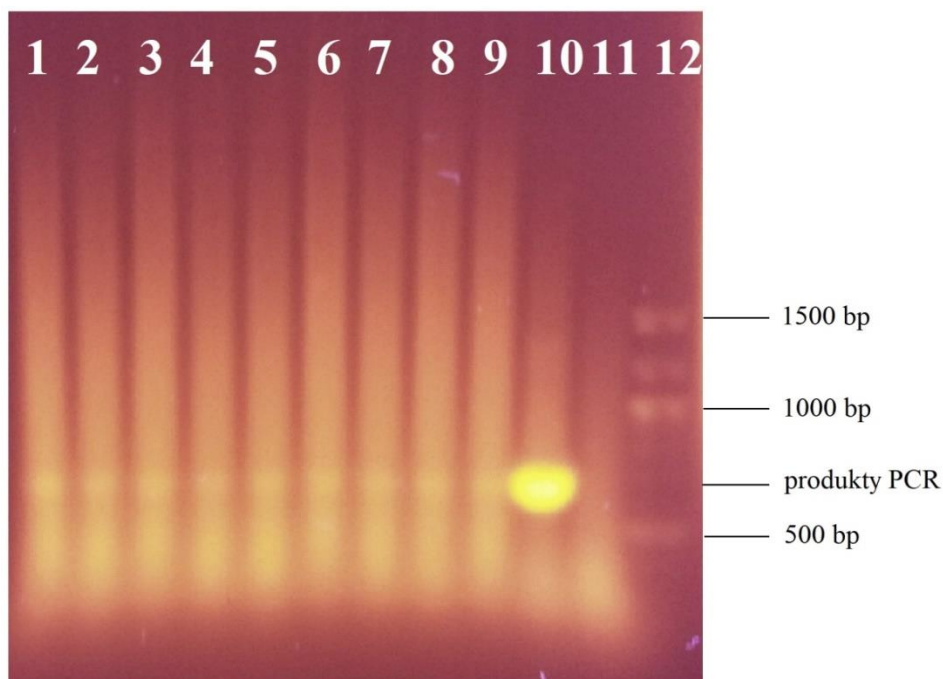
8.7.3 Amplifikace DNA pomocí PCR

Izolovaná DNA (Tabulka 25) byla amplifikována polymerázovou řetězovou reakcí podle postupů v kapitole 7.5.4. Produkty PCR byly detegovány pomocí agarózové gelové elektroforézy dle kapitoly 7.5.5 na 1,2% agaróze.

8.7.3.1 PCR s primery 18S_for a 5,8S_rev

Na Obrázku 22 je zobrazena gelová elektroforéza produktů PCR. Gel byl dobarven ethidium bromidem a pozorován pod UV světlem.

Obrázek 22: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (asi 700 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná z výrobků obsahujících červenou řepu v lyzačním pufru s CTAB s přidavkem chloroform-oktanolu a isopropanolu.



Běh	Výrobky z červené řepy/ opakování	Množství DNA [ng] pro PCR směs	Detekce produktu PCR	
1	dmBio pomazánka	<i>a</i>	6,4	+
2		<i>b</i>	6,4	+
3		<i>c</i>	4,0	+
4	Dětský příkrm HiPP	<i>a</i>	3,4	+
5		<i>b</i>	5,8	+
6		<i>c</i>	3,6	+
7	Bio šťáva 100%	<i>a</i>	2,4	+
8		<i>b</i>	3,6	+
9		<i>c</i>	7,8	+
10	PK (<i>B. oleracea</i> 1 ng/μl)		2	+++
11	NK		–	–
12	DNA standard			

– produkt PCR nedetegován

+, ++, +++ detegován produkt PCR různé intenzity

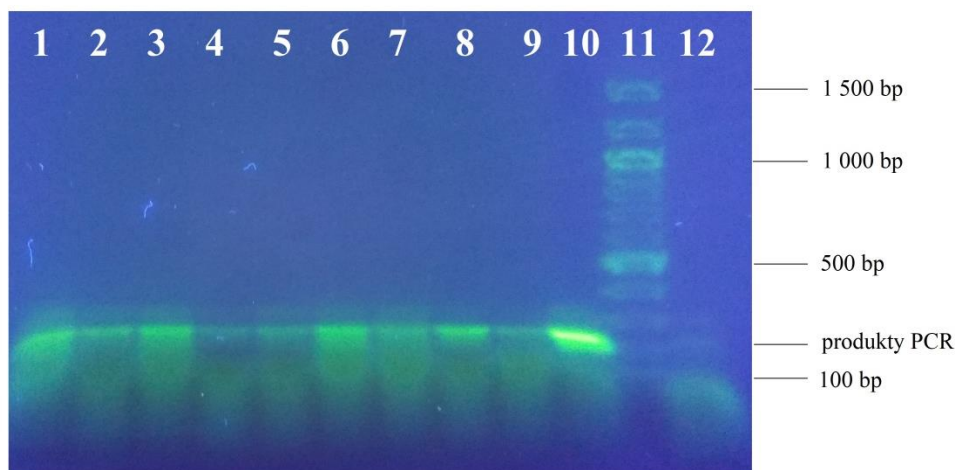
PK– pozitivní kontrola, NK– negativní kontrola

→ DNA byla amplifikována a byly detegovány produkty PCR v délce asi 700 bp slabé intenzity. Vedle specifických produktů PCR byla detegována šmouha nspecifických produktů PCR.

8.7.3.2 PCR s primery 26S_for a 26S_rev

DNA izolovaná z potravinových výrobků přečišťovaná přesrážením isopropanolem byla amplifikována v PCR pomocí primerů 26S_for a 26S_rev. Poté byly detegovány produkty PCR agarózovou gelovou elektroforézou, gel byl pozorován pod UV světlem, viz Obrázek 23.

Obrázek 23: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (asi 220 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná z výrobků obsahujících červenou řepu v lyzačním pufru s CTAB s 2,5 M NaCl s přidavkem chloroform- oktanolu a isopropanolu.



Běh	Výrobky z červené řepy/ opakování	Množství DNA [ng] pro PCR směs	Detekce produktu PCR	
1	Bio šťáva 100%	a	2,4	++
2		b	3,6	+
3		c	7,8	++
4	Dětský příkrm HiPP	a	3,4	+
5		b	5,8	+
6		c	3,6	++
7	dmBio pomazánka	a	6,4	+
8		b	6,4	++
9		c	4,0	+
10	PK (<i>B. oleracea</i> 1 ng/μl)		2	+++
11	NK		–	–
12	DNA standard			

– produkt PCR nedetegován

+, ++, +++ detegován produkt PCR různé intenzity

PK– pozitivní kontrola, NK– negativní kontrola

→ DNA byla amplifikována a byly detegovány produkty PCR v délce asi 220 bp slabší intenzity.

9 DISKUZE

9.1 Zpracování rostlinného materiálu pro analýzu DNA

Cílem izolace DNA bylo získat především čistý produkt v co nejvyšším možném množství a v takové kvalitě, aby se mohla použít jako matrice do PCR. Rostlinný materiál však obsahuje velké množství polysacharidů, proteinů, polyfenolů a jiných látek, které mohou mít vliv na kvalitu a celkové množství izolované DNA, a proto je důležité snížit množství těchto látek na minimum. K redukci množství izolovaných polysacharidů lze použít vyšší koncentrace NaCl k extrakčnímu CTAB pufru a k odstranění polyfenolů β -mercaptoethanol. [23] Rostlinnou tkáň lze také během samotné homogenizace mrazit a tím snížit vliv polyfenolů. [24]

V této práci byla testována mikrometoda izolace DNA. Proto se pracovalo s malými navážkami tkáně. Pro kořen červené řepy byla optimální navážka 300 mg. Rostlinná DNA z červené řepy byla izolována pomocí lyzačního pufru s CTAB s přídavkem a bez přídavku chloroform- oktanolu. Směsí chloroform- oktanolu docházelo po centrifugaci k rozdělení fází a tím také k deproteinaci. [19]

9.2 Množství a kvalita DNA izolované pomocí magnetických mikročastic

Pro zjištění koncentrace a čistoty izolované DNA byly pomocí NanoDropu 2000 spektrofotometricky měřeny absorbance v rozpětí vlnových délek 230–320 nm. Poměr absorbancí A_{260}/A_{280} se pro čistou DNA pohybuje mezi 1,8–2,0. Pokud je poměr absorbancí nižší než 1,8, DNA je pravděpodobně znečištěna proteiny, je-li poměr absorbancí vyšší než 2,0, jedná se o znečištění RNA. [3] Další hodnota ukazující čistotu DNA je poměr absorbancí A_{260}/A_{230} , která by měla být větší než 1. Nižší poměr absorbancí signalizuje znečištění DNA zejména polyfenoly. Rostlinná DNA může být znečištěna také solemi a polysacharidy. [25]

Podle naměřených hodnot v Tabulce 12 byla koncentrace DNA s přídavkem chloroform- oktanolu vyšší (10,4–22,8 ng/ μ l) s jednou výjimkou (6,7 ng/ μ l) než bez přídavku chloroform- oktanolu (4,2–7,0 ng/ μ l). Jelikož jsou poměry absorbancí při vlnových délkách A_{260}/A_{280} menší než 1,8, DNA je pravděpodobně znečištěna proteiny. DNA se však amplifikovala v PCR. Po amplifikaci DNA byly produkty PCR detegovány na gelu (velikosti asi 700 bp, Obrázek 12). Znečištění nemělo negativní vliv (neinhibovalo) amplifikaci. DNA izolovaná v lyzačním pufru s CTAB s přídavkem chloroform- oktanolu dávala po amplifikaci produkty PCR ve vyšší intenzitě než DNA izolovaná z homogenátů bez přídavku chloroform- oktanolu. Důvodem je pravděpodobně větší množství čistší DNA použité pro PCR směs. Produkty PCR po amplifikaci 10 \times ředěné DNA nebyly detegovány na agarózovém gelu. Množství DNA v PCR směsi bylo zřejmě příliš nízké.

9.3 Izolace DNA z čerstvé, zmražené, sušené a sterilované červené řepy

Rostlinná DNA z čerstvé, zmražené, sušené a sterilované červené řepy (300 mg) byla izolována v lyzačním pufru s CTAB s přídavkem a bez přídavku chloroform- oktanolu. Podle získaných dat uvedených v Tabulce 13 byla spektrofotometricky stanovena koncentrace DNA na 1,1–18,6 ng/ μ l. U čerstvé a zmražené červené řepy byly naměřené koncentrace DNA vyšší než u sušené a sterilované řepy. Pravděpodobně je to zapříčiněno způsobem zpracování výrobků (sušení, sterilace), při níž může docházet k degradaci DNA. Zmražená červená řepa byla izolována ve vyšší koncentraci než čerstvá. Zmražení čerstvé zeleniny a následné rozmražení mohlo přispět k rozbití většího počtu rostlinných buněk během homogenizace

v CTAB pufru. U většiny izolovaných DNA byla po přidavku chloroform- oktanolu naměřena nižší koncentrace DNA než bez přidavku chloroform- oktanolu, což bylo zřejmě způsobeno ztrátou DNA během přečišťování vzorků.

DNA byla izolovaná z 300 mg rostlinného materiálu pomocí magnetických mikročásteček P(GMA). Tato separace DNA na pevné fázi se již dříve osvědčila při izolaci amplifikovatelné DNA z komplexních vzorků potravin. [54] Po amplifikaci byly detegovány produkty PCR v délce asi 700 bp. Na vlastní amplifikaci DNA neměl zřejmě vliv způsob zpracování červené řepy (mražení, sušení, sterilace). Znamená to, že DNA nebyla příliš degradovaná a že stupeň degradace neovlivnil amplifikaci.

9.4 Testování množství homogenátu a NaCl v separační směsi

Z dřívějších prací [37] a z výsledků získaných v této diplomové práci se ukázalo, že vazbu DNA na magnetické částice výrazně ovlivňuje množství NaCl v separačních směsích. Proto byla DNA izolována ze čtyř směsí s různým množstvím NaCl (konečná koncentrace 1,5–3,0 M NaCl) v homogenátech s CTAB pufrům. Bylo testováno, zda se zvýšením objemu homogenátu bude izolováno větší množství DNA. Nejprve byla provedena eluce do stejného objemu elučního TE pufru jako byl objem homogenátu. Poté byl postup zopakován a DNA byla eluována ve všech případech do 25 μ l TE pufru.

9.4.1 Eluce DNA do stejného objemu elučního pufru jako byl objem homogenátu

V separačních směsích bylo použito různé množství homogenátu. DNA byla eluována do takového objemu TE pufru jako byl objem homogenátu. Pro zjištění koncentrace a čistoty DNA bylo provedeno spektrofotometrické stanovení. Při eluci do stejného objemu TE pufru jako byl objem homogenátu byla koncentrace DNA stanovena na 0,2–32,1 ng/ μ l a hodnoty A_{260}/A_{280} = 1,37–1,64. Se snižujícím se množstvím NaCl a zvyšujícím se množstvím homogenátu v separačních směsích bylo izolováno menší množství DNA. Podle Tabulky 14 byla nejvyšší naměřená koncentrace pro separační směs s 25 μ l homogenátu a 100 μ l 5 M NaCl. Snižování množství NaCl v separačních směsích má negativní vliv na množství izolované DNA.

Na Obrázku 15 lze vidět, že produkty PCR amplifikované z DNA izolované z 25 a 50 μ l homogenátu v separační směsi s vyšším množstvím NaCl byly detegovány o vyšší intenzitě než produkty PCR amplifikované z DNA izolované ze 75 a 100 μ l homogenátu v separační směsi s nižším množstvím NaCl. Důvodem bylo vyšší množství izolované DNA použité pro PCR směs.

9.4.2 Eluce DNA do objemu elučního pufru 25 μ l

DNA izolovaná v separační směsi s různým množstvím homogenátu (25, 50, 75 a 100 μ l) a 5 M NaCl byla eluována do 25 μ l TE pufru. Spektrofotometricky byla stanovena koncentrace DNA na 2,0–42,5 ng/ μ l (Tabulka 15). Bylo izolováno přibližně stejné množství DNA s výjimkou DNA izolované z 50 μ l homogenátu, které bylo nižší. Čistota DNA byla stanovena na A_{260}/A_{280} = 1,15–1,47. Jelikož je naměřená hodnota nižší než 1,8, DNA byla pravděpodobně znečištěna proteiny. Poměr absorbancí A_{260}/A_{230} pohybující se mezi 0,37–0,50 značí znečištění polyfenoly nebo polysacharidy izolovaných z rostlinných tkání. Veškerá DNA se amplifikovala v PCR.

Z literatury je známo [8], že výsledky izolace DNA jsou ovlivňovány výběrem extrakční metody při izolaci a vyhodnocováním kvality DNA. Velkou roli hraje délka ampliconu, počet

cyklů a přítomnost inhibitorů PCR koextrahovaných s DNA. Detekci a kvantifikaci také ovlivňuje množství DNA použité v PCR. [44] Finální koncentraci izolované DNA je možno zvýšit také snížením objemu elučního pufru. [8] Po spektrofotometrickém stanovení koncentrace však nebylo stanoveno větší množství DNA po eluci do menšího množství elučního pufru.

9.5 Testování izolace DNA z homogenátů s různým množstvím NaCl

V předcházejících pracích bylo ukázáno, že množství a kvalita DNA izolované magnetickými částicemi záleží na množství NaCl a PEG v separační směsi [37]. Lze předpokládat, že záleží i na množství homogenátu s DNA. Proto byly homogenáty pro izolaci DNA připraveny tak, že obsahovaly různá množství NaCl (1,5 M; 2,0 M; 2,5 M a 3,0 M). Separální směsi se vedle různého množství rostlinného homogenátu (125, 150 a 175 μ l) lišily koncentrací PEG (8%, 10% a 16%). Ze všech směsí byla DNA eluována do 50 μ l TE pufru. Každá separační směs byla připravena ve třech opakováních. DNA byla izolována pomocí magnetických mikročástic P(GMA).

Pro izolaci DNA pomocí magnetických částic byly namíchány separační směsi o objemu 250 μ l s různým množstvím homogenátů s různým množstvím NaCl a 16%, 10% nebo 8% PEG (7.5.2, Tabulka 6).

Bylo izolováno přibližně stejné množství DNA, která se lišila poměrem A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230} . Jako nejlepší podle poměru A_{260}/A_{280} (čistota DNA) a poměru A_{260}/A_{230} byla určena separační směs obsahující 175 μ l homogenátu, lyzační pufr s CTAB s 2,5 M NaCl a 8% PEG. Izolovaná DNA se amplifikovala v PCR. Na základě těchto výsledků byla navržena optimální metoda pro izolaci DNA v kvalitě pro PCR z červené řepy. Metoda byla použita pro izolaci DNA z potravinových výrobků, které červenou řepu obsahují. Vzhledem ke komplexnosti těchto typů vzorků byl přidán krok přečišťování chloroform-oktanolem a přesrážením isopropanolem.

9.6 Optimalizace teploty a doby eluce

U izolované DNA ze zmraženého kořene červené řepy byla testována teplota a doba eluce v TE pufru. Koncentrace DNA izolované ve třech opakováních byla měřena po eluci při 18°C/15 min, 25°C/15 min a 60°C/15 min. Testována byla také DNA eluována v TE pufru 2 dny při 18°C.

Podle naměřených hodnot lze vidět, že koncentrace se při zvyšování eluční teploty nepatrně zvyšuje (7,5–19,5 ng/ μ l). Také hodnota koncentrace DNA eluované v TE pufru 2 dny při 18°C byla naměřena poněkud vyšší (19,8 ng/ μ l). Bylo však zjištěno, že samotné magnetické mikročástice uvolňují po delší eluci látku, která překrývá a nadhodnocuje koncentraci izolované DNA. Pro další izolace byla tedy používána eluce do 50 μ l TE pufru při 25°C/15 min. Čistota DNA byla stanovena na $A_{260}/A_{280}=1,47-1,75$. Tyto hodnoty udávají, že DNA byla znečištěna proteiny. Z poměrů absorbancí $A_{260}/A_{230}=0,63-0,88$ vidíme, že spolu s DNA byly izolovány i polyfenolické látky.

9.7 Izolace rostlinné DNA z potravinových výrobků obsahujících červenou řepu

Pro analýzu DNA byly vybrány následující potravinové výrobky 1) dmBio pomazánka z červené řepy a křene, 2) dětský příkrm HiPP obsahující červenou řepu, jablka a hovězí maso a 3) 100% bio šťáva z jablek a červené řepy. Z vybraných výrobků bylo izolováno DNA z 300 mg, v případě bio šťávy z 200 μ l.

Pro izolaci byla použita optimalizovaná metoda vypracovaná v první části práce. Z důvodu komplexního složení zpracovaných potravinových výrobků byl přidán krok přečištění chloroform- oktanolem a přesrážení isopropanolem. Tato DNA se amplifikovala v PCR.

U DNA bez přídavku organických činidel izolované z potravinových výrobků byla naměřena koncentrace v rozmezí 3,2–24,1 ng/μl. Tato DNA se však neamplifikovala v PCR, produkty PCR nebyly detegovatelné na agarózovém gelu. Pravděpodobně je to zapříčiněno způsobem zpracování výrobků. Další překážkou při izolaci DNA z tepelně zpracovaných potravinových výrobků je její degradace, která je způsobena vysokou teplotou při zpracování. [36, 7] Bylo ukázáno, že přečištěním chloroform- oktanolem a isopropanolem se izolovaná DNA stala amplifikovatelnou, protože produkty PCR byly detegované na agarózovém gelu, i když DNA byla izolována v nižší koncentraci (1,2–3,9 ng/μl).

DNA s přídavkem chloroform- oktanolu a isopropanolu byla amplifikována v PCR také s primery 26S_for a 26S_rev. Při detekci na agarózovém gelu byly produkty PCR o velikosti asi 220 bp. Z literatury je známo [54], že tepelné zpracování potravin vede k významnému snížení velikosti DNA, protože DNA je degradována. Tyto poznatky byly potvrzeny. Primery používané pro amplifikaci kratších produktů PCR (220 bp) byly vhodnější pro analýzu zpracovaných potravin s degradovanými DNA než primery používané pro amplifikaci delších PCR produktů (700 bp). [54]

ZÁVĚR

Cílem práce bylo vypracovat optimální postup pro izolaci DNA z potravin v kvalitě vhodné pro PCR pomocí magnetických mikročastic P(GMA). Pro analýzu byla vybrána červená řepa (čerstvá, mražená, sušená, sterilovaná) a potravinové výrobky obsahující červenou řepu. Byla porovnána množství a kvalita DNA izolované v lyzačním pufru s CTAB s přídavkem a bez přídavku chloroform- oktanolu, s přídavkem isopropanolu, v separačních směsích s různým množstvím NaCl a PEG a také byla testována teplota a doba eluce. Poté byl na základě několika desítek pokusů navržen následující postup, který lze považovat za optimální.

Homogenát byl připraven z 300 mg rostlinného materiálu (červená řepa, potravinové výrobky), rozkrájeného na malé kousky, který byl sterilně odvážen do 1,5 ml Eppendorfových zkumavek. Do zkumavek bylo přidáno 500 μ l lyzačního pufru s CTAB s 2,5 M NaCl a 1 μ l merkaptotoethanolu (0,2%). Pomocí plastového kopistu byla za stálého chlazení v termobloku provedena homogenizace rostlinného materiálu. Zhomogenizovaný vzorek byl inkubován v termomixeru při 60°C/30 min. Po inkubaci byla provedena centrifugace 1 400 ot./10 min. Do čisté zkumavky bylo odebráno asi 200 μ l supernatantu. K izolaci DNA pomocí magnetických mikročastic P(GMA) bylo použito 175 μ l.

U vzorků potravinových výrobků s komplexním složením byl po inkubaci v lyzačním pufru s CTAB přidán chloroform- oktanol (24:1, 500 μ l) s následnou centrifugací. DNA v horní vodné fázi (200 μ l) byla přesrážena isopropanolem (0,6 objemu) a rozpuštěna ve 175 μ l TE pufru.

Pro izolaci DNA magnetickými mikročasticemi byla namíchána separační směs v následujícím pořadí: 175 μ l homogenátu, 50 μ l 40% PEG a 25 μ l magnetických mikročastic P(GMA) (2 mg/ml). Výsledná koncentrace PEG v separační směsi byla 8 %.

Po smíchání všech složek byla směs inkubována 15 minut při laboratorní teplotě a poté umístěna do magnetického separátoru. Magnetické částice s navázanou DNA byly separovány 5 minut při laboratorní teplotě. Následně byl opatrně odebrán supernatant a do zkumavky bylo přidáno 500 μ l 70% ethanolu. Směs byla promíchána a částice byly separovány pomocí magnetického separátoru. Po pěti minutách byl opatrně odebrán supernatant a zbylý ethanol byl odpařen. Eluce DNA navázané na magnetických mikročasticích byla provedena do 50 μ l TE pufru při 25°C/15 min. Po uplynutí stanovené doby byly částice odseparovány pomocí magnetického separátoru a eluát obsahující DNA byl odebrán do čistých Eppendorfových zkumavek.

Spektrofotometricky byla stanovena koncentrace a čistota DNA. Takto izolovaná DNA byla použita pro amplifikaci v PCR s primery 18S_for a 5,8S_rev (700 bp) specifickými pro rostlinnou DNA. Při izolaci DNA z tepelně zpracovaných potravinových výrobků byly použity primery 26S_for a 26S_rev (220 bp). Produkty PCR byly detegovány pomocí gelové elektroforézy na 1,2% agarózovém gelu.

Výsledky této diplomové práce mohou posloužit k účinnější izolaci DNA z rostlinných buněk magnetickými mikročasticemi a přispět tak k vytvoření metody použitelné pro širší spektrum rostlinného materiálu a potravin rostlinného původu.

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [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*. 2015, **46**(1), 85-98. DOI: 10.1016/j.tifs.2015.08.003. ISBN 10.1016/j.tifs.2015.08.003. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092422441500196X>.
- [2] ČÍŽKOVÁ, Helena, Rudolf ŠEVČÍK, Aleš RAJCHL, Jan PIVOŇKA a Michal VOLDŘICH. TRENDY V AUTENTICITĚ POTRAVIN A V PŘÍSTUPECH K DETEKCI FALŠOVÁNÍ. *Chemické listy* [online]. 2012, vol. 106, issue 10, s. 903-910 [cit. 2018-03-17]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemickelisty.cz/docs/full/2012_10_903-910.pdf.
- [3] SOBOLEV, Anatoly P, Simone CIRCI, Donatella CAPITANI, Cinzia INGALLINA a Luisa MANNINA. Molecular fingerprinting of food authenticity. *Current Opinion in Food Science* [online]. Elsevier, 2017, **16**, 59-66 [cit. 2018-03-14]. DOI: 10.1016/j.cofs.2017.08.002. ISSN 2214-7993.
- [4] TRANTAKIS, Ioannis A, Theodore K CHRISTOPOULOS, Stelios SPANIOLAS, Panagiotis KALAITZIS, Penelope C IOANNOU a Gregory A TUCKER. Quantitative bioluminometric method for DNA-based species/variety identification in food authenticity assessment. *Journal of agricultural and food chemistry* [online]. 2012, **60**(4), 912 [cit. 2018-03-14]. DOI: 10.1021/jf203531h.
- [5] RUTH, van a Daniel GRANATO. Food Identity, Authenticity and Fraud. *Foods — Open Access Food Science Journal* [online]. 2017, **6**(7), urn:issn:2304-8158 [cit. 2018-03-14]. ISSN 2304-8158.
- [6] WOOLFE, Mark a Sandy PRIMROSE. Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in Biotechnology* [online]. Elsevier, 2004, **22**(5), 222-226 [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1016/j.tibtech.2004.03.010. ISSN 0167-7799.
- [7] MADESIS, P., GANOPOULOS, I., SAKARIDIS, I., ARGIRIOU, A., TSAFTARIS, A. Advances of DNA-based methods for tracing the botanical origin of food products. *Food Research International*. 2014, (60), 163-172. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.10.042. ISBN 10.1016/j.foodres.2013.10.042. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996913005905>.
- [8] CORRADO, G. Advances in DNA typing in the agro-food supply chain. *Trends in Food Science & Technology*. 2016, (52), 80-89. DOI: 10.1016/j.tifs.2016.04.003. ISBN 10.1016/j.tifs.2016.04.003. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224415300972>.
- [9] TRANTAKIS, I. A., CHRISTOPOULOS, T. K., SPANIOLAS, S., KALAITZIS, P., IOANNOU, P. C., TUCKER, G. A. Quantitative Bioluminometric Method for DNABased Species/Variety Identification in Food Authenticity Assessment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012, (60), 912-916. DOI: 10.1021/jf203531h. ISBN 10.1021/jf203531h. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf203531h>.

- [10] HORÁK, Daniel, Bohuslav RITTICH, Alena ŠPANOVÁ a Milan J. BENEŠ. Magnetic microparticulate carriers with immobilized selective ligands in DNA diagnostics. *Polymer* [online]. Elsevier, 2005, **46**(4), 1245-1255 [cit. 2017-11-07]. DOI: 10.1016/j.polymer.2004.11.049. ISSN 0032-3861.
- [11] RÖMISCH, Ute, Henry JÄGER, Xavier CAPRON, Silvia LANTERI, Michele FORINA a Johanna SMEYERS-VERBEKE. Characterization and determination of the geographical origin of wines. Part III: multivariate discrimination and classification methods. *European Food Research and Technology* [online]. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2009, **230**(1), 31-45 [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1007/s00217-009-1141-x. ISSN 1438-2377.
- [12] KELLY, Simon, Karl HEATON a Jurian HOOGEWERFF. Tracing the geographical origin of food: The application of multi-element and multi-isotope analysis. *Trends in Food Science & Technology* [online]. Elsevier, 2005, **16**(12), 555-567 [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1016/j.tifs.2005.08.008. ISSN 0924-2244.
- [13] RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. Natural food pigments and colorants. *Current Opinion in Food Science* [online]. Elsevier, 2016, **7**, 20-26 [cit. 2018-04-10]. DOI: 10.1016/j.cofs.2015.08.004. ISSN 2214-7993.
- [14] BRIGGSOVÁ, Margaret. *Červená řepa, mangold a špenát*. Praha: Fortuna, Libri, 2009. 159 s. ISBN 978-80-7321-493-7.
- [15] PRUGAR, Jaroslav a kol. *Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí*. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2008. ISBN 978-80-86576-28-2.
- [16] HAIGH, Charlotte. *100 NEJ potravin pro imunitu*. Praha: Slovart, 2007. ISBN 978-80-7391-011-2.
- [17] KOPEC, Karel. *Tabulky nutričních hodnot ovoce a zeleniny*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1998. ISBN 80-86153-64-9.
- [18] JIRATANAN, Thudnatkorn a Rui Hai LIU. Antioxidant Activity of Processed Table Beets (*beta vulgaris var. conditiva*) and Green Beans (*Phaseolus vulgaris L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, **52**, 2659-2670.
- [19] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010, 86 s. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [20] KOVARIK, A. a spol. Rapid Concerted Evolution of Nuclear Ribosomal DNA in Two Tragopogon Allopolyploids of Recent and Recurrent Origin. *Genetics*. 2005, roč. 169, s. 931-944. DOI: 10.1534/genetics.104.032839. Dostupné z: <http://www.genetics.org/cgi/doi/10.1534/genetics.104.032839>.
- [21] 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*. 2000, roč. 109, č. 3, s. 161-172. ISSN 1432-0886. DOI: 10.1007/s004120050424. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s004120050424>.

- [22] NERADOVÁ, Eva, Aleš RAJCHL a Helena ČÍŽKOVÁ. NEDEKLAROVANÉ PŘIBARVOVÁNÍ VÝROBKŮ Z ČERVENÉHO A MODRÉHO OVOCE: MOŽNOSTI PROKÁZÁNÍ. *Chemické listy* [online]. 2016, vol. 110, s. 4-10 [cit. 2018-04-10]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2016_01_4-10.pdf.
- [23] RIBEIRO, R. A. a M. B. LOVATO. Comparative analysis of different DNA extraction protocols in fresh and herbarium specimens of the genus *Dalbergia*. *Genet. Mol. Res.* 2007, roč. 6, č. 1, s. 173-187.
- [24] PETERSON, D. G., K. S. BOEHM a S. M. STACK. Isolation of milligram quantities of nuclear DNA from tomato (*Lycopersicon esculentum*), A plant containing high levels of polyphenolic compounds. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1997, roč. 15, č. 2, s. 148- 153. ISSN 0735-9640. DOI: 10.1007/BF02812265. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02812265>.
- [25] OLSON, Nathan D a Jayne B MORROW. DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Research Notes* [online]. 2012, 5(1), 668- [cit. 2018-03-22]. DOI: 10.1186/1756-0500-5-668. ISSN 1756-0500. Dostupné z: <http://bmresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-5-668>.
- [26] VARMA, Astha, Harish PADH a Neeta SHRIVASTAVA. Plant genomic DNA isolation: An art or a science. *Biotechnology Journal* [online]. 2007, 2(3), 386-392 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1002/biot.200600195. ISSN 18606768. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/biot.200600195>.
- [27] EDWARDS, K., C. JOHNSTONE a C. THOMPSON. Simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic acids research* [online]. 1991, 19(6), 1349 [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.1093/nar/19.6.1349. ISSN 0305-1048.
- [28] PIRTTILÄ, Anna, Merja HIRSIKORPI, Terttu KÄMÄRÄINEN, Laura JAAKOLA a Anja HOHTOLA. DNA isolation methods for medicinal and aromatic plants. *Plant Molecular Biology Reporter* [online]. New York: Springer-Verlag, 2001, 19(3), 273-273 [cit. 2018-03-27]. DOI: 10.1007/BF02772901. ISSN 0735-9640.
- [29] 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.
- [30] MCBAIN, Stuart C, Humphrey H P YIU a Jon DOBSON. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *International journal of nanomedicine* [online]. 2008, 3(2), 169 [cit. 2017-11-07]. ISSN 1176-9114.
- [31] NINFALI, Paolino a Donato ANGELINO. Nutritional and functional potential of *Beta vulgaris* cicla and rubra. *Fitoterapia* [online]. Elsevier B.V, 2013, 89, 188-199 [cit. 2017-11-30]. DOI: 10.1016/j.fitote.2013.06.004. ISSN 0367-326X.
- [32] 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. 2017-10-12]. DOI: 10.1186/1477-044X-1-2.

- [33] CLIFFORD, Tom, Glyn HOWATSON, Daniel J WEST a Emma J STEVENSON. The potential benefits of red beetroot supplementation in health and disease. *Nutrients* [online]. 2015, **7**(4), 2801 [cit. 2017-10-30]. DOI: 10.3390/nu7042801.
- [34] DEMEKE, Tigst a G. Ronald JENKINS. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnologyderived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2010, **396**(6), 1977- 1990 [cit. 2018-04-09]. DOI: 10.1007/s00216-009-3150-9. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-009-3150-9>.
- [35] SAHU, S. K., M. THANGARAJ a K. KATHIRESAN. DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. *ISRN Molecular Biology*. 2012, roč. 2012, s. 1-6. ISSN 2090-7907. DOI: 10.5402/2012/205049. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/isrn/mb/2012/205049/>.
- [36] POREBSKI, Sue, L. Grant BAILEY a Bernard R. BAUM. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter* [online]. 1997, **15**(1), 8-15 [cit. 2018-04-01]. DOI: 10.1007/BF02772108. ISSN 0735-9640. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02772108>.
- [37] RITTICH, Bohuslav a Alena ŠPANOVÁ. SPE and purification of DNA using magnetic particles. *Journal of Separation Science* [online]. 2013, **36**(15), 2472-2485 [cit. 2017-11-01]. DOI: 10.1002/jssc.201300331. ISSN 1615-9306.
- [38] SAMBROOK, Joseph a David William RUSSELL. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3. New York: Cold Spring Harbor Labor.: CSHL Press, 2001. ISBN 0879695773.
- [39] BERENSMEIER, Sonja. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2006, **73**(3), 495-504 [cit. 2017-11-01]. DOI: 10.1007/s00253-006-0675-0. ISSN 0175-7598.
- [40] LISBY, G. Application of Nucleic Acid Amplification in Clinical Microbiology. *Molecular Biotechnology*. 1999, roč. 12, č. 1, s. 75-99. DOI: 10.1385/MB:12:1:75. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1385/MB:12:1:75>.
- [41] PCR – the polymerase chain reaction. *Anal. Methods* [online]. 2014, **6**(2), 333-336 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1039/C3AY90101G. ISSN 1759-9660.
- [42] ŠPANOVÁ, Alena, Bohuslav RITTICH, Milan J. BENEŠ a Daniel HORÁK. Ferrite supports for isolation of DNA from complex samples and polymerase chain reaction amplification. *Journal of Chromatography A*. 2005, **1080**(1): 93-98. ISSN 0021-9673.
- [43] ŠMARDA, J., J. DOŠKAŘ, R. PANTUČEK, V. RŮŽIČKOVÁ a J. KOPTÍKOVÁ. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 194 s. ISBN 80-210-3841-1.
- [44] GRYSON, Nicolas. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR based GMO analysis: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2010, **396**(6), 2003-2022 [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1007/s00216-009-3343-2. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-009-3343-2>.

- [45] LILIT GARIBYAN a NIDHI AVASHIA. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. Nature Publishing Group, 2013, **133**(3), e6 [cit. 2018-04-16]. DOI: 10.1038/jid.2013.1. ISSN 0022-202X.
- [46] MA, H., S., K. J., CHEN, G., X. T. QIAO a M. Y. CHUANG. Application of Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *J. Am. Sci.* 2006, roč. 2, č. 3.
- [47] KUBISTA, M., J. M. ANDRADE, M. BENGTSSON, A. FOROOTAN, J. JONÁK, K. LIND, R. SINDELKA, R. SJÖBACK, B. SJÖGREEN, L. STRÖMBOM, A. STÅHLBERG a N. ZORIC. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006, roč. 27, č. 2-3, s. 95-125. ISSN 00982997. DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098299705000907>.
- [48] ZORNÍKOVÁ, Gabriela. Využití polymerázové řetězové reakce (PCR) pro detekci probiotických mikroorganismů. [online]. 2012 [cit. 2018-04-09]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/vyuziti-polymerazove-retezove-reakce-pcr-pro-detekci-probiotickych-mikroorganismu>.
- [49] *Sezónní potraviny*, sezonka.cz [online]. In: 2013 [cit. 2018-04-19]. Dostupné z: <http://sezonka.cz/cervena-repa/>.
- [50] NAVARRO, E., G. SERRANO-HERAS, M.J. CASTAÑO a J. SOLERA. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta* [online]. Elsevier B.V, 2015, **439**, 231-250 [cit. 2018-03-18]. DOI: 10.1016/j.cca.2014.10.017. ISSN 0009-8981.
- [51] DUDOVÁ, S. a R. HÁJEK. Využití metody real-time PCR (kvantitativní PCR, PCR v reálném čase) v hematologii a studiu mnohočetného myelomu. *Klinická onkologie*, Brno: Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, 2008, roč. 21, S1,s. 220-222. ISSN 0862-495X.
- [52] SCHRADER, C., A. SCHIELKE, L. ELLERBROEK a R. JOHNE. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2012, 113(5), 1014-1026 [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x. ISSN 13645072. Dostupné z : <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>.
- [53] CAMPOS, Elisa, J. BRANQUINHO, Ana S. CARREIRA, Anabela CARVALHO, Patrícia COIMBRA, P. FERREIRA a M.H. GIL. Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications. *European Polymer Journal* [online]. Elsevier, 2013, **49**(8), 2005-2021 [cit. 2017-10-12]. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2013.04.033. ISSN 0014-3057.
- [54] TROJÁNEK, Zdeněk, Aleš KOVAŘÍK, Alena ŠPANOVÁ, Kristýna MAROŠIOVÁ, Daniel HORÁK a Bohuslav RITTICH. Application of magnetic polymethacrylate-based microspheres for the isolation of DNA from raw vegetables and processed foods of plant origin. *Journal of Food Processing and Preservation* [online]. 2017, **42**(1) [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.1111/jfpp.13384. ISSN 0145-8892.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

bp	pár bázi (base pair)
CTAB	cetyl triethylamonium bromid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
dsDNA	dvouvláknová DNA
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
GC	plynová chromatografie
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRM analýza	vysokorozlišovací analýza křivek tání
IČ	infračervená spektrometrie
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
NaCl	chlorid sodný
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEG	polyethylenglykol
P(HEMA- <i>co</i> -GMA)	magnetické částice poly(2-hydroxyethylmethakrylát- <i>co</i> -glycidylmethakrylát)
qPCR	kvantitativní PCR (PCR v reálném čase)
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích
TBE	Tris-borát-EDTA
TE	Tris-EDTA

PŘÍLOHA

Část výsledků zahrnutých v diplomové práci bude prezentována na studentské vědecké konferenci – Chemie je život.

Příloha č. 1

Optimalizace nové mikrometody izolace DNA z potravin

Bc. Tereza Surá

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

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická,

*Ústav chemie potravin a biotechnologií Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Česká republika
xcsura@fch.vutbr.cz*

V posledních deseti letech se autenticita potravinářských výrobků stala zásadní otázkou, neboť byly odhaleny častější případy falšování potravin. Pro odhalování falšování a detekci autentických látek v potravinách se využívá řada metod, včetně metod založených na analýze DNA. Mezi ně patří polymerázová řetězová reakce (PCR). Izolace rostlinné DNA v kvalitě vhodné pro PCR je komplikovaná metoda, zejména kvůli obsahu celé řady metabolitů, polysacharidů, polyfenolů, proteinů a dalších látek. Tyto látky mohou interferovat v PCR a nepříznivě tak ovlivnit kvalitu výsledků. Práce byla zaměřena na optimalizaci mikrometody izolace DNA pomocí magnetických mikročásteček P(GMA) s karboxylovými funkčními skupinami z potravin rostlinného původu. Pro analýzu byla vybrána červená řepa (*Beta vulgaris*) buď jako čerstvá zelenina nebo zpracovaná (mražená, sušená, sterilovaná) a rovněž potravinové výrobky obsahující červenou řepu. Byly porovnávány a optimalizovány různé způsoby zpracování homogenátů (přídavek směsi chloroform-oktanol, přesrážení isopropanolem). Homogenáty byly připraveny v lyzačních pufrech s cetyltrimethylamoniumbromidem (CTAB) s různým množstvím NaCl. DNA byla izolována adsorbicí na magnetické mikročástečky v prostředí s různou koncentrací poly(ethylenglykolu) 6000 (PEG 6000). V izolátech DNA byla spektrofotometricky stanovena koncentrace a čistota. Amplifikovatelnost DNA byla ověřena konvenční PCR s použitím primerů 5.8S_for a 18S_rev specifických pro rostlinnou ribosomální DNA. Produkty PCR o velikosti asi 700 bp byly detegovány pomocí agarózové gelové elektroforézy. Byly zjištěny rozdíly v čistotě a koncentraci DNA izolované magnetickými částicemi z homogenátů připravených různými způsoby. Byla navržena optimální extrakční směs pro izolaci DNA z homogenátů červené řepy. Pomocí modifikovaného protokolu byla DNA úspěšně amplifikována u vzorků červené řepy včetně zpracovaných potravinových výrobků obsahujících červenou řepu. Bylo prokázáno, že pomocí magnetických mikročásteček lze izolovat DNA v kvalitě vhodné pro PCR.