

Česká zemědělská univerzita v Praze

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních
zdrojů**

Katedra genetiky a šlechtění



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Detekce a kvantifikace máku v potravinách pomocí
qPCR**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Sabina Janáková

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Jakub Vašek, Ph.D.

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Detekce a kvantifikace máku v potravinách pomocí qPCR" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.4.2022

Poděkování

Rád(a) bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu práce Ing. Jakubovi Vaškovi, Ph.D. za pomoc, odborné rady, připomínky a čas, který mi věnoval při zpracování této diplomové práce.

Detekce a kvantifikace máku v potravinách pomocí qPCR

Souhrn:

Mák setý (*Papaver somniferum* L.) je jednoletá rostlina, která je pěstována v České republice jako jedna z nejdůležitějších olejnin. Počátky využití rostliny jsou známy již od 6. tisíciletí před naším letopočtem na území Středozeří. Dnes se jako plodina pěstuje pro potravinářské, farmaceutické a technické účely. Diplomová práce se zaměřuje především na jeho využití v potravinářském odvětví. Cílem práce bylo otestování, zda k detekci a kvantifikaci máku v potravine lze využít genetické markery pro profilování odrůd máku. Analýza potravin bývá znesnadněna faktory, které snižují výtěžnost a kvalitu izolované DNA a tím pádem i dalších analýz. Mezi tyto faktory řadíme přítomnost dalších látek v matrici potraviny (např. polysacharidy, polyfenoly a sekundární metabolity) a vlivy působící na DNA během výrobního procesu.

V rámci experimentální části bylo využito několik druhů vzorků: listy mladých rostlin, tepelně ošetřená semena a několik zakoupených potravin. Jednotlivé vzorky byly homogenizovány a rostlinná DNA byla izolována pomocí komerčního kitu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Německo). Genetické markery byly vybrány ze souboru 27 mikrosatelitů, které byly navrženy v rámci jiné práce na pracovišti Katedry genetiky a šlechtění České zemědělské univerzity. Pro testování bylo vybráno 5 kandidátních markerů: OPTET024b (207-234 bp); OPTET063 (88-108 bp); OPTET065 (224-232 bp), OPTET156 (136-144 bp); OPPEN29 (146-177 bp). Na základě průběhu kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) byly vybrány dva markery s nejvyšší specifitou a odlišnou velikostí amplikonu. Testování probíhalo za použití dvou párů primerů pro každý marker. Následně byly vybrané markery testovány pomocí qPCR s použitím vzorků tepelně ošetřených semen a potravin. Bylo hodnoceno, zda došlo vlivem tepelného ošetření k degradaci DNA a zda je možné tyto markery použít u reálných potravin. Sekvence otestovaných markerů by mohly být využívány v potravinářském průmyslu při detekci a kvantifikaci máku.

Klíčová slova: *Papaver somniferum* L., qPCR, ddPCR, STR mikrosatelity, genetické markery

Detection and quantification of poppy in food via qPCR

Summary:

The opium poppy (*Papaver somniferum* L.) belongs to the most important oilseed crops grown in the Czech Republic (it is an annual plant). The plant has been used since the 6th millennium BCE; its origins date back to the Mediterranean. Nowadays, it is cultivated as a crop for food, pharmaceutical and technical purposes. The thesis focuses primarily on its use in the food industry. The thesis sought to investigate whether genetic markers used to profile poppy varieties can be applied to detect and quantify poppy in food. Food analysis is often hampered by factors reducing the yield and quality of the isolated DNA and, therefore, other analyses. These factors include other substances within the food matrix (e. g., polysaccharides, polyphenols, and secondary metabolites) and their effects on the DNA during the production process.

Several samples were utilised in the experimental part: food poppy leaves, heat-treated food poppy seeds, and several purchased foodstuffs. Individual samples were homogenised, and the plant DNA was isolated using the commercial DNeasy Plant Mini Kit. Genetic markers were selected from 27 microsatellites designed as part of other work at the Department of genetics and breeding of the Czech University of Life Sciences Prague. Five markers with the highest specificity were selected from the set: OPTET024b (207-234 bp); OPTET063 (88-108 bp); OPTET065 (224-232 bp), OPTET156 (136-144 bp); OPPEN29 (146-177 bp). Two markers with different amplicon magnitudes were selected using real-time quantitative PCR. Marker testing was performed using two primer pairs. Subsequently, the selected markers were tested by qPCR using heat-treated seed and food-specific samples. By comparing amplicon lengths, it was assessed whether the DNA degraded due to heat treatment and whether these markers could be applied to food. The tested marker sequences could be utilised in the food industry to detect and quantify poppy seeds.

Keywords: *Papaver somniferum* L., qPCR, ddPCR, STR microsatellites, genetic markers

Seznam použitých zkratk

PCR	Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)
SZPI	Státní zemědělská a potravinářská inspekce
CHZO	Chráněné zeměpisné označení
DNA	Deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
TR	Tandem Repeat (tandemová repetice)
STR	Short Tandem Repeat (krátká tandemová repetice)
SSR	Simple Sequence Repeat (sekvenčně jednoduchá repetice)
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate (2'-deoxynukleosid 5'-trifosfát)
pH	Power of hydrogen (záporný dekadický logaritmus hodnoty vodíkových iontů v roztoku)
qPCR	Real-time quantitative polymerase chain reaction (kvantitativní PCR v reálném čase)
dsDNA	Double-stranded Deoxyribonucleic Acid (dvouvláknová DNA)
ssDNA	Single-stranded Deoxyribonucleic Acid (jednovláknová DNA)
GM standard	Geneticky Modifikovaný standard
EMA	Ethidium Monoazide (etidium monoazid)
cdPCR	Chamber-based digital PCR (čipová digitální PCR)
ddPCR	Droplet digital PCR (kapková/dropletová digitální PCR)
bp	Base pair (komplementární pár bázi)

Obsah

1	Úvod	9
2	Cíle práce	10
2.1	Vědecká hypotéza.....	10
2.2	Cíle práce	10
3	Literární rešerše	11
3.1	Mák setý (<i>Papaver somniferum</i> L.)	11
3.1.1	Taxonomická charakteristika.....	12
3.1.2	Využití a význam plodiny	13
3.1.2.1	Farmaceutický průmysl.....	13
3.1.2.2	Potravinářský průmysl	14
3.1.3	Pěstování a spotřeba v ČR.....	15
3.2	Genetické markery	16
3.2.1	Mikrosatelity.....	16
3.2.1.1	Obecná charakteristika.....	16
3.2.1.2	Klasifikace	16
3.2.1.3	Využití	17
3.2.1.4	Analýza mikrosatelitů	17
3.3	Metody analýzy nukleových kyselin u <i>Papaver somniferum</i> L.	18
3.3.1	Polymérazová řetězová reakce (PCR)	18
3.3.1.1	Obecná charakteristika a komponenty reakční směsi	18
3.3.1.2	Průběh reakce.....	19
3.3.1.3	Detekce produktů	21
3.3.2	PCR v reálném čase (Real-time PCR; qPCR)	22
3.3.2.1	Obecná charakteristika, průběh reakce, komponenty reakční směsi.....	22
3.3.2.2	Detekce produktů	22
3.3.2.3	Kinetika reakce	24
3.3.2.4	Metody kvantifikace	25
3.3.2.5	Analýza křivky tání (melting analýza).....	26
3.3.2.6	Využití v potravinářském průmyslu.....	26
3.3.3	Digitální PCR (dPCR)	28
3.3.3.1	Obecná charakteristika.....	28
3.3.3.2	Detekce a kvantifikace produktů	28
3.3.3.3	Rozdělení technologií dPCR.....	29
3.3.3.4	Využití	29
4	Metodika	30

4.1	Použité vzorky máku a makové výrobky.....	31
4.2	Příprava vzorků.....	32
4.2.1	Tepelné ošetření semen	32
4.2.2	Izolace DNA.....	33
4.3	Dropletová digitální PCR (ddPCR).....	34
4.4	Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR)	36
4.5	Statistická analýza dat.....	40
5	Výsledky	41
5.1	Izolace DNA.....	41
5.2	qPCR pro testovací a optimalizační fázi.....	43
5.3	qPCR pro experimentální fázi	46
5.3.1	Statistická analýza dat	46
5.4	qPCR pro validační fázi	53
6	Diskuze	55
7	Závěr.....	58
8	Přílohy	59
9	Literatura	65
10	Seznam tabulek.....	72
11	Seznam obrázků	73

1 Úvod

Mák setý (*Papaver somniferum* L.) je prastará a prospěšná plodina, známá již z období neolitu. V současné době, se kromě farmaceutického průmyslu, široce uplatňuje v potravinářství. Potravinářský průmysl využívá semena odrůd máku olejnatého, která jsou z důvodu nezaměnitelné oříškové chuti využívána jako náplně do moučníků a koláčů, k výrobě makového oleje a ke zvýraznění chuti při vaření a pečení. V České republice je pěstování potravinářského máku (zejména modrého) dlouholetou tradicí, a proto je ČR právem od roku 2006 považována za jednu z makových velmocí. Předložená diplomová práce se zabývá nalezením vhodných genetických markerů pro identifikaci máku v matrici potravin a následně jejich otestováním na konkrétních produktech. Molekulárně genetická metoda v kombinaci s vhodným markerem by umožnila senzitivní a rychlou kvantifikaci máku a případně detekci v potravine, kde jeho obsah není deklarován.

Vhodným nástrojem by mohla být polymerázová řetězová reakce (PCR), kterou v roce 1985 představil Karry B. Mullis a následně v roce 1993 získal Nobelovu cenu. Jednou z jejích modifikací je kvantitativní PCR v reálném čase, která se běžně v potravinářství využívá k detekci, identifikaci a kvantifikaci žádoucích a nežádoucích složek potravin. Jako genetické markery byly zvoleny STR mikrosatelity, které byly navrženy za účelem genetického profilování odrůd máku. Podstatou práce bylo ověření, zda budou schopné mák detekovat i v matrici potravin, která je složitější než rostlinná matrice. Podrobné znalosti o kinetice degradace DNA při zpracování potravin jsou stále nedostatečné, přesto u potravin předpokládáme vliv teploty a pH na degradaci DNA. Výsledkem degradačních procesů je vznik fragmentů a tím pádem ztížená schopnost detekce. Pro sledování chování těchto markerů u tepelně ošetřené DNA bylo laboratorně simulováno několik verzí tepelného ošetření.

2 Cíle práce

2.1 Vědecká hypotéza

Výrobní postupy (zejména tepelné ošetření) u řady potravin obsahujících mák, vedou k degradaci DNA máku a ztěžují tak jeho detekci. Nicméně s využitím vhodného molekulárně genetického markeru lze výskyt máku v potravine detekovat a kvantifikovat.

2.2 Cíle práce

Cíle práce vycházejí z výše navržené hypotézy a pro přehlednost jsou uvedeny v následujících bodech:

- a) Pomocí qPCR testovat sadu STR markerů vyvinutých v rámci dřívějších projektů na Katedře genetiky a šlechtění ČZU v Praze a vybrat vhodné kandidátní markery pro detekci.
- b) Otestovat v laboratorně kontrolovaných podmínkách vliv tepelného ošetření na míru degradace DNA.
- c) Ověřit funkčnost kandidátních markerů na reálném vzorku běžně dostupných potravin.

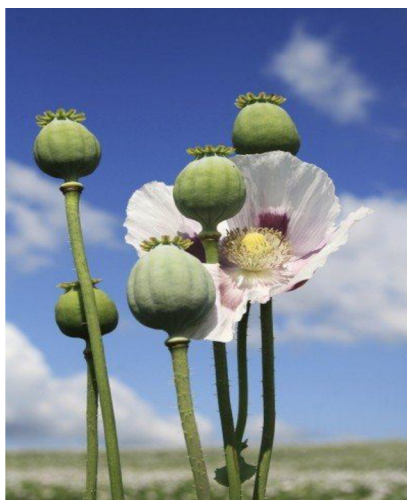
3 Literární rešerše

3.1 Mák setý (*Papaver somniferum* L.)

Mák setý (*Papaver somniferum* L.) je významná hospodářská plodina pěstovaná pro potravinářské a farmaceutické účely. Jeho účinky na utišení bolesti využívala lidová medicína už v dávné historii. První zmínky se objevují v 5. tisíciletí před naším letopočtem v oblasti Sumerské říše (Makovnyka 2020). Původ máku setého není objasněn, ale pravděpodobně byla jeho kulturní forma vyšlechtěna z planého asijského druhu, nebo z máku štětinkatého (*Papaver setigerum* DC.) vyskytujícího se v oblasti Středomoří (Labanca et al. 2018). Mák setý (Obr. 1) je jedním z nejznámějších druhů z rodu *Papaver*. Dnes se jako plodina pěstuje v mírných a subtropických pásmech téměř celého světa (Carlin et al. 2020). Šlechtěním jsou vytvářeny kultivary s vysokým obsahem alkaloidů pro farmaceutický průmysl a kultivary s nízkým obsahem alkaloidů pro produkci semen a oleje (Knutsen et al. 2018).

Obrázek 1: Mák setý (*Papaver somniferum* L.)

(<https://www.gardeningknowhow.com/ornamental/flowers/poppy/facts-about-opium-poppies.htm>)



Rostliny rodu *Papaver* jsou jednoleté, dvouleté, nebo vytrvalé byliny s různě zbarvenými a členěnými květy. Plodem rostliny je tobolka s velkým množstvím semen bohatých na obsah oleje. Pletiva jsou tvořena široce rozvětvenou sítí mléčnic obsahujících mléčnou mizu (latex), jejíž největší množství je v tobolce (Carolan et al. 2006). V semenech se latex přirozeně nevyskytuje, ale mohou být kontaminována v důsledku poškození pletiv škůdci nebo sklizní (Casado-Hidalgo et al. 2021).

3.1.1 Taxonomická charakteristika

Mák setý náleží do řádu pryskyřníkotvarých (*Ranunculales*), čeledi makovitých (*Papaveraceae*) a rodu mák (*Papaver*) (Tétényi 1997). Čeleď *Papaveraceae* zahrnuje zhruba 800 druhů rostlin rozdělených do 40 rodů. Rod *Papaver* obsahuje přibližně 100 druhů rostlin rozlišených na základě morfologických znaků (barvy/tvaru květů, semen a tvaru listů). Rozdělení rodu není jednoznačné a liší se dle různých autorů. Jednou z možností je dělení do sekcí, které vytvořil J.W. Kadereit v roce 1988 (Tab. 1) (Carolan et al. 2006). Jednotlivé druhy lze také rozlišit na základě analýzy hydrofilních antokyanů (Labanca et al. 2018). Podle směru využití se obecně dělí na mák olejný (semenný), mák průmyslový, mák opiový a mák okrasný. U máku průmyslového a opiového je značně vyvinutý systém cévních svazků a vyšší obsah opiových alkaloidů v latexu. Opiové máky jsou nelegálně pěstované v asijských zemích, především v Afghánistánu. Mák olejný má slabě vyvinutý systém cévních svazků a využívá se pro kvalitu svých semen (Český modrý mák 2020).

Tabulka 1: Rozdělení rodu *Papaver* do sekcí (Carolan et al. 2006)

SEKCE	ZÁSTUPCI
Argemonidium	<i>P. apulum, P. argemone, P. pavonium, P. hybridum</i>
Carinatae	<i>P. macrostomum</i>
Californicum	<i>P. californium</i>
Horrida	<i>P. aculeatum</i>
Macrantha/Oxytona Bernh	<i>P. orientale, P. pseudoorientale, P. bracteatum</i>
Meconidium	<i>P. amenicum</i>
Meconella	<i>P. croceum, P. anomalum, P. nudicaule, P. radiocatum, P. alpinum, P. myobeanum</i>
Papaver	<i>P. somniferum, P. glaucum, P. gracile, P. decaisnei, P. setigerum</i>
Pilosa	<i>P. polisum</i>
Pseudopilosa	<i>P. atlanticum, P. rupifragum</i>
Rhoeadium	<i>P. dubium, P. rhoeas, P. commutantum</i>

3.1.2 Využití a význam plodiny

3.1.2.1 Farmaceutický průmysl

Farmaceutický průmysl využívá alkaloidy extrahované z opia. Opium se získává sklizením a nařezáním nezralých tobolek. Po nařezání vytéká bíle zbarvený latex (Obr. 2), který hnědne v důsledku oxidace fenolu (Labanca et al. 2018). V opiu se vyskytuje až 80 různých alkaloidů, které se podle chemické struktury dělí na fenanthreny a benzyliocholiny. Do skupiny fenanthrenů řadíme morfin, kodein a thebain, které svými účinky ovlivňují centrální nervovou soustavu. Benzyliocholiny mají vliv na hladkou svalovinu a patří mezi ně papaverin a noskapiin (Tétényi 1997; Casado-Hidalgo et al. 2021). Morfin se díky svému působení na opioidní receptory využívá jako silné analgetikum (lék tišící bolest). Kodein působí jako antitusikum (lék potlačující kašel) a papaverin se svým vasodilatačním působením jako spasmolytikum (lék uvolňující křeče). Mezi méně známé alkaloidy patří noskapiin, který se od 50. let také využívá jako antitusikum. Další studie prokázaly jeho protizánětlivé, antioxidační a zejména protirakovinné účinky. Zkoumá se jeho využití jako potenciálního protirakovinného léku, neboť indukuje apoptózu buněk a inhibuje jejich proliferaci (Rahmanian-Devin et al. 2021). Dalším méně známým je sanguinarin využívaný v produktech na terapii gingivitis (zánětu dásní). Svými antimikrobiálními účinky inhibuje vyzrávání zubního plaku, který je hlavním faktorem pro vznik zánětlivé reakce (Li et al. 2013). Studie autorů Li et al. (2013) navíc prokázala, že inhibuje aktivitu osteoklastů, které jsou zodpovědné za resorpci kosti během parodontitis (parodontózy). Posledním méně známým alkaloidem je berberin s účinky na snížení hladiny cholesterolu (Labanca et al. 2018).

Obrázek 2: Nařezané tobolky s vytékajícím latexem (<https://www.marshall.edu/forensics/files/Thorson-Poppy-Seed-Defense.pdf>)



3.1.2.2 Potravinářský průmysl

Potravinářský průmysl využívá semena ze zralých tobolek. Zbarvení semen je různorodé, ale nejčastěji se využívají modrá semena (Obr. 3), která jsou považována za sensoricky nejkvalitnější (Carlin et al. 2020). Semena potravinářského máku mohou obsahovat maximálně 25 mg/kg (0,0025 %) morfinových alkaloidů (Zákon o potravinách a tabákových výrobcích 2015). Z nutričního hlediska jsou zdrojem tuků (50 %), bílkovin (19 %), minerálních látek (vápník, hořčík, železo) a antioxidantů. Mají příznivé spektrum mastných kyselin (11 % nasycených a 85 % nenasycených mastných kyselin) (Lahiri et al. 2017). Z nasycených mastných kyselin je nejvíce zastoupená kyselina palmitová (téměř 8 %). Dominantní nenasycenou mastnou kyselinou je kyselina linolová (67 %) (Senila et al. 2020), která je zástupcem omega-6 nenasycených mastných kyselin. Pro pozitivní účinky omega-6 mastných kyselin je důležité přidat zdroj omega-3 mastných kyselin a dodržet jejich doporučený poměr 1:1 (D'Angelo et al. 2020). Obsah omega-3 nenasycených mastných kyselin je v makovém oleji velmi nízký (0,5 % kyseliny alfa-linolenové), ale díky tomu je olej stabilní a nepodléhá autooxidaci (Özcan & Atalay 2006). Semena se využívají jako posypy a náplně pečárenských výrobků, pro výrobu smoothie nápojů, přípravu dresinků, výrobu makového čaje a jedlého oleje. Listy se mohou přidávat do salátů a směs z mletých semen do těstovin, kaší a zmrzlin (Tétényi 1997; Casado-Hidalgo et al. 2021).

Obrázek 3: Modrá semena potravinářského máku (https://agro-market24.eu/oil_plants-poppy_seed-price-buy-sell-104)



Mák jako potravina často podléhá pokusům o falšování. V roce 2013 SZPI provedla analýzu vzorků, kde mák českého původu měl obsah morfinu 7,44 mg/kg, zatímco ostatní měly obsah až devítinásobný, což je známkou příměsi technického (farmaceutického) máku. Pro zachování kvality českého máku byly v roce 2019 vydány cechovní normy a v únoru 2021 byl Český modrý mák zařazen do potravin s chráněným zeměpisným označením (CHZO) (Ministerstvo zemědělství 2020).

3.1.3 Pěstování a spotřeba v ČR

Česká republika je považována za jednoho z největších producentů a exportérů potravinářského modrosemenného máku. Ročně se sklídí průměrně 24 000 tun. Domácí spotřeba je téměř 4 500 tun a na jednoho obyvatele připadá spotřeba 430 g, což je nejvyšší hodnota ve střední a východní Evropě. Největšími odběrateli českého máku jsou Rusko, Rakousko, Polsko, Slovensko a Německo. Pro pěstování potravinářského máku v ČR je povinná tzv. ohlašovací povinnost (Ministerstvo zemědělství 2020).

3.2 Genetické markery

Genetický marker označuje část genu, která může být snadno identifikována pomocí analýzy DNA. Často využívanými genetickými markery jsou tandemové repetice (TR), které se dle počtu nukleotidů dělí na: mikrosatelity (1 až 10 nukleotidů) a minisatelity (více než 10 nukleotidů) (Vieira et al. 2016).

3.2.1 Mikrosatelity

3.2.1.1 Obecná charakteristika

Mikrosatelity jsou nejčastější formou výše zmíněných tandemových repetit a zastupují asi 3 % lidského genomu (Eckert & Hile 2009). V odborné literatuře jsou nazývány několika způsoby, kdy mezi nejčastější patří: STR (= short tandem repeats) a SSR (= simple sequence repeats). Vyskytují se v genomu jak prokaryotních, tak eukaryotních organismů, především v nekódujících částech DNA (Vieira et al. 2016). Některé mikrosatelity, zejména tri- a hexanukleotidové, se vyskytují i v kódujících částech genomu a mohou být příčinou neurodegenerativních a geneticky podmíněných vad (Brouwer et al. 2009). Mikrosatelity vykazují vysokou úroveň polymorfismu a jsou řazeny mezi nejvariabilnější sekvence DNA v genomu. Mutují rychlostí mezi 10^{-3} a 10^{-6} mutací na lokus v jedné generaci (Eckert & Hile 2009). Hlavními příčinami mutací jsou chyby během rekombinace a sklouznutí DNA-polymerázy během syntézy nového vlákna DNA (tzv. DNA slippage) (Vieira et al. 2016).

3.2.1.2 Klasifikace

Na základě počtu opakujících se bází se klasifikují na mono- (např. AAA), di- (např. CACA), tri- (např. ATGATGATG) a tetranukleotidové, ale mohou se vyskytovat i ve formě penta- či hexanukleotidových repetit (Ellegren 2004).

Dalším možným dělením je podle způsobu opakování sekvence, kdy rozlišujeme:

- a) **Dokonalé (perfect)** – neustále se opakuje sekvence nukleotidů (např. TATATATATATATATA)
- b) **Nedokonalé (imperfect)** – opakující se sekvence je přerušena jednou bází (např. TATATATACTATATA)
- c) **Přerušené (interrupted)** – opakující se sekvence je přerušena jinou sekvencí několika párů bází (např. TATATACGTGTATATATATA)
- d) **Složené (composite)** – tento typ je složen z dvou a více přiléhajících mikrosatelitů s odlišnou repeticí (např. TATATATATAGTGTGTGTGT (Oliveira et al. 2006).

3.2.1.3 Využití

Mikrosatelity patří mezi nejvyužívanější druh genetických markerů. Důvodem je jejich kodominance, multialelita a vysoká reprodukovatelnost (Oliveira et al. 2006). Jsou široce využívány v genetických oborech, například při genotypizaci rostlin, populačních studiích, testování příbuznosti a ve forenzní praxi (Huang et al. 2002).

3.2.1.4 Analýza mikrosatelitů

Předpokladem pro STR analýzu je znalost nukleotidové sekvence mikrosatelitního lokusu. Na základě toho jsou navrženy oligonukleotidy (primery), které lemují jeho oblast. Na každý lokus je navržen jeden pár primerů. Navržené primery jsou validovány pomocí PCR (polymerázové řetězové reakce, viz kapitola 3.3.1.), jejíž výsledkem je amplifikace vybraných lokusů. Produkty amplifikace jsou elektroforeticky separovány na jednotlivé fragmenty a analyzovány. Pro tento krok se nejčastěji využívá elektroforéza na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu, případně kapilární elektroforéza. U kapilární elektroforézy se primer označuje fluorescenčním markerem. Výsledkem je elektroforeogram s luminiscenčními píky odpovídajícími jednotlivým amplifikovaným alelám. Následně se porovnávají elektroforeogramy různých jedinců (Vieira et al. 2016).

3.3 Metody analýzy nukleových kyselin u *Papaver somniferum* L.

3.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR (angl. polymerase chain reaction) je molekulárně diagnostická metoda, kterou jako první představil americký vědec Kary Mullis v roce 1983. Sám Mullis ji vysvětlil tak, že: „Můžete si vzít kterýkoliv kousek DNA a budete ho mít tolik, kolik chcete“ (Garibyan & Avashia 2013). To znamená, že k vytvoření dostatku kopií DNA stačí pouze její stopové množství. Jedná se o rychlou, senzitivní a efektivní metodu. PCR široce využívají kliničtí a výzkumní pracovníci v oborech jako například virologie, mikrobiologie, mykologie, parazitologie, ale také zubní lékařství nebo potravinářství. Na základě PCR se diagnostikují onemocnění, používá se ke klonování, sekvenování a studiím genomu (Valones et al. 2009).

3.3.1.1 Obecná charakteristika a komponenty reakční směsi

Polymerázová řetězová reakce je cyklicky se opakující *in vitro* syntéza libovolné sekvence nukleové kyseliny ve směru 5'-3' (Valones et al. 2009). Syntézu katalyzuje enzym DNA polymeráza a výchozím bodem pro zahájení syntézy komplementárních vláken je pozice jednotlivých primerů. Výsledkem reakce je miliarda kopií přesně definované sekvence DNA (Birmingham & Luetlich 2003; Šmarda et al. 2005).

Hlavními složkami reakční směsi jsou: templátová DNA, synteticky připravené primery, nukleotidy, DNA polymeráza a pufr. Templátová DNA představuje izolovanou DNA, která může být jednořetězová (ssDNA) nebo dvouřetězová (dsDNA) a obsahuje gen (cílovou sekvenci), která má být amplifikována. Primery jsou syntetické krátké oligonukleotidy obsahující 15 až 20 bází. Jsou nezbytné pro zahájení reakce, neboť ohraničují začátek a konec amplifikovaného úseku. Procentuální zastoupení GC bází by se u primerů mělo pohybovat v rozmezí 20 až 80 % a nesmí být vzájemně komplementární, aby nedocházelo ke vzniku duplexů (Šmarda et al. 2005; Kubista et al. 2006). DNA polymeráza je enzym katalyzující syntézu nového vlákna. Dříve se využívala DNA polymeráza izolovaná z bakterie *E. coli*, která je termolabilní a do reakční směsi ji bylo možné přidat až po denaturaci. Dnes se využívají termostabilní polymerázy, které jsou aktivní i během vysoké teploty denaturace. Pro jejich aktivitu je nutná přítomnost iontů hořčíku a dNTP (2'-deoxynukleotid 5'trifosfátu) (Birmingham & Luetlich 2003).

Nejpoužívanější je *Taq* DNA-polymeráza izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. Nukleotidy slouží jako stavební jednotky pro syntézu nového komplementárního vlákna. Obsahují adenin (A), thymin (T), cytosin (C) a guanin (G), ze kterých je složen řetězec DNA. Využívají se nejčastěji ve formě dNTP. Hořčnaté ionty (Mg^{2+}) mají v reakční směsi roli kofaktoru a s dNTP tvoří rozpustný komplex, který identifikuje DNA polymeráza. Pufr zajišťuje stálé a optimální pH prostředí během reakce (Šmarda et al. 2005).

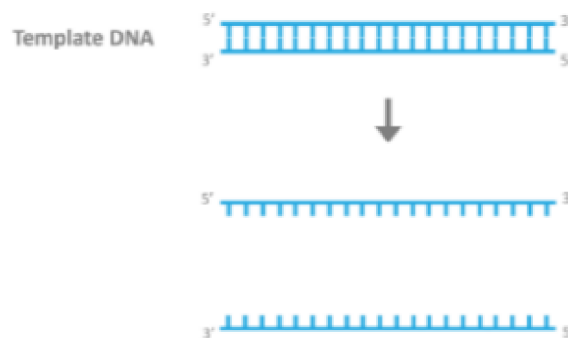
3.3.1.2 Průběh reakce

Během reakce se cyklicky opakují následující tři kroky:

1. **denaturace** molekuly DNA;
2. **hybridizace** primerů (tzv. annealing);
3. **syntetická** fáze (tzv. elongace, extenze) (Šmarda et al. 2005).

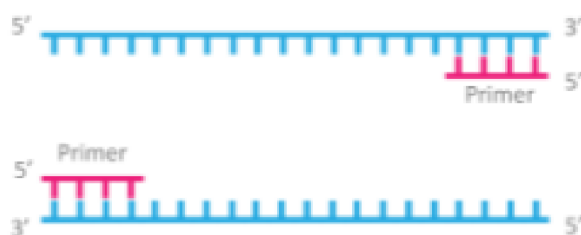
V první fázi se zkumavka s reakční směsí zahřeje na teplotu 92 až 98 °C. Vlivem vysoké teploty dochází k rozpadu vodíkových můstků mezi jednotlivými bázemi (Obr. 4). Z dvouřetězcové DNA vznikají dvě jednořetězcové, které jsou templátem pro syntézu komplementárního vlákna (Bermingham & Luettich 2003). Teplota a doba denaturace závisí na délce vlákna, pořadí nukleotidů, použitém přístrojovém vybavení a dalších reakčních podmínkách (Kubista et al. 2006). Počáteční a závěrečný cyklus trvá až 5 minut, další cykly zhruba 30 sekund. Správně provedená denaturace je důležitá pro úspěšnost reakce, neboť v opačném případě je riziko vzniku renaturace a nespecifických vazeb primerů (tzv. „self-priming“) (Šmarda et al. 2005).

Obrázek 4: Znáromění denaturace (<https://www.goldbio.com/goldbios-pcr-overview>)



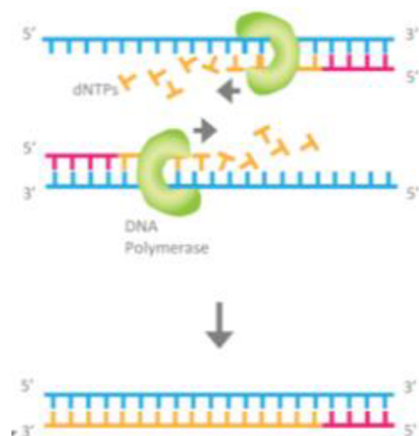
V druhé fázi je reakční směs ochlazena na teplotu kolem 55°C. Hodnota teploty se stanovuje empiricky a závisí na struktuře primerů a jejich teplotě tání. Primery se během fáze hybridizace navážou ke komplementárním bázím templátových řetězců ssDNA (Obr. 5). Fáze nasedání primerů trvá zhruba 60 sekund. Sekvence primerů mohou být navrženy ručně nebo pomocí speciálních programů (Bermingham & Luetlich 2003; Kubista et al. 2006).

Obrázek 5: Znázornění hybridizace (<https://www.goldbio.com/goldbios-pcr-overview>)



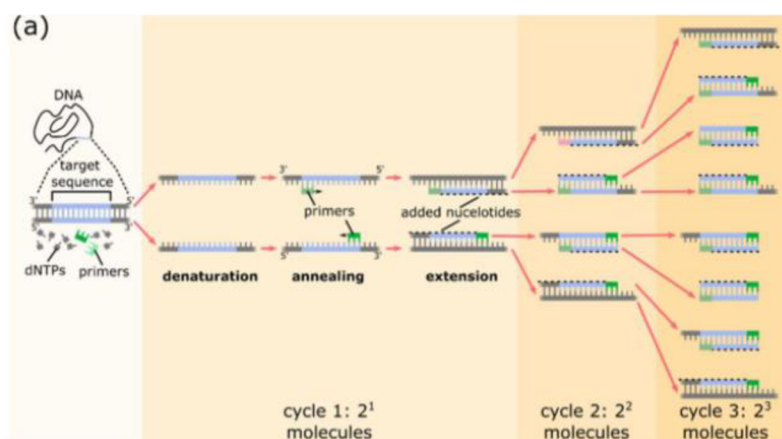
V poslední fázi se reakční směs ohřeje na teplotu kolem 72 °C, což zajistí ideální funkčnost DNA polymerázy. Primery jsou prodlužovány aktivitou DNA polymerázy, která přiřazuje jednotlivá dNTP ve směru 5'-3' (Obr. 6). Proces trvá 45 až 120 sekund a rychlost syntézy je cca 60 bází za sekundu (Šmarda et al. 2005; Kubista et al. 2006).

Obrázek 6: Znázornění extenze (<https://www.goldbio.com/goldbios-pcr-overview>)



Celý proces probíhá v přístroji s naprogramovanými cykly teplot nazývaném termocykler. V případě 100% účinnosti se počet kopií DNA zdvojnásobuje a dochází k exponenciálnímu růstu dle vzorce 2^n , kde n je počet cyklů (Primrose & Twyman 2006), což je znázorněno na Obr. 7. Množství nahromaděného produktu mohou ovlivnit látky s inhibičním účinkem, například pyrofosfáty (Arya et al. 2005). Celkový počet cyklů se nejčastěji pohybuje mezi 25 až 35 (Šmarda et al. 2005).

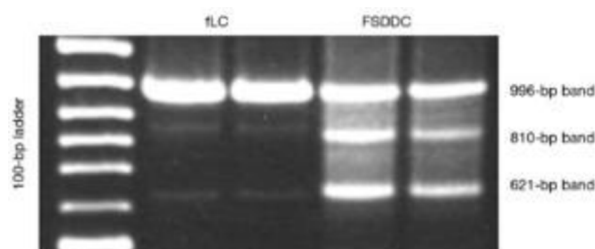
Obrázek 7: Průběh PCR (Quan et al. 2018)



3.3.1.3 Detekce produktů

Produktům polymerázové řetězové reakce jsou úseky DNA definované délky (amplikony) o velikosti desítek až tisíců bází. Detekce se nejčastěji provádí pomocí gelové elektroforézy, která produkty DNA separuje na základě velikosti a náboje. Grafickým výstupem je elektroforeogram (Obr. 8) (Garibyan & Avashia 2013). Dalším způsobem detekce je kvantitativní měření množství produktu pomocí PCR v reálném čase (viz kapitola 3.3.3.) (Arya et al. 2005).

Obrázek 8: Detekce produktů PCR na agarózovém gelu (Garibyan & Avashia 2013)



3.3.2 PCR v reálném čase (Real-time PCR; qPCR)

3.3.2.1 Obecná charakteristika, průběh reakce, komponenty reakční směsi

PCR v reálném čase umožňuje detekci a zejména kvantifikaci rostoucího množství ampliconu během jeho akumulace v čase. To je zásadní rozdíl proti konvenční PCR, kdy se produkt detekuje elektroforeticky po skončení reakce (Šmarda et al. 2005). Detekci zajišťují molekuly, které na přítomnost ampliconů reagují emisí fluorescenčního signálu. Průběh fází je shodný s konvenční PCR. Dochází k cyklické denaturaci templátové DNA, hybridizaci primerů a syntéze nových řetězců. Reakční směs, kromě komponentů shodných s konvenční PCR, obsahuje navíc fluorescenční molekuly. S přibývajícím množstvím ampliconů narůstá hladina fluorescence, kterou detekuje přístroj s optickým vybavením. Výsledky PCR v reálném čase mohou být kvalitativní (přítomnost/absence PCR produktu) nebo kvantitativní (počet kopií DNA) (Arya et al. 2005).

3.3.2.2 Detekce produktů

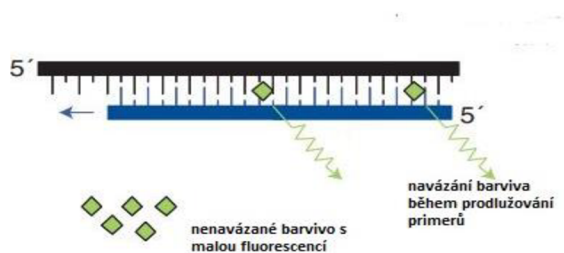
Obecně rozlišujeme tři metody detekce:

1. **interkalační barviva** vázající se na dsDNA;
2. **fluorescenčně značené sondy** vázající se na střední část ampliconu;
3. **fluorescenčně značené primery** (Šmarda et al. 2005).

V praxi se nejčastěji používá interkalační barvivo SYBR Green I a TaqMan hydrolyzační sondy (Arya et al. 2005).

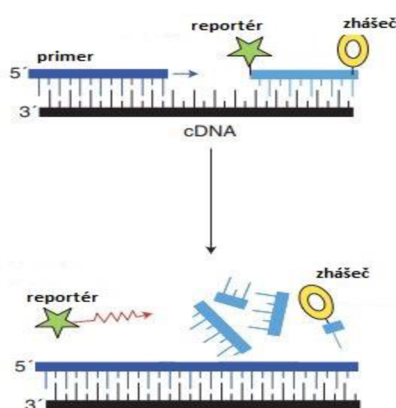
Interkalační barviva jsou nejjednodušším způsobem detekce. V nenávaném stavu emitují pouze zanedbatelné množství fluorescence, která narůstá po navázání na menší žlábek dsDNA. Nejrozšířenějším barvivem je SYBR Green I, jehož schopnost vázat se na molekulu DNA je 100krát vyšší než u barviva ethidium bromid. Ve vysokých koncentracích může inhibovat průběh reakce, a proto je nutné optimalizovat jeho množství (Salihah et al. 2016). Hlavní nevýhodou interkalačních barviv je nespecifita (vážou se na jakoukoliv dsDNA). Výhodou tohoto způsobu detekce jsou nízké finanční náklady a jednoduchý design experimentu (Arya et al. 2005; Kubista et al. 2006). Princip interkalačních barviv je zobrazen na Obr. 9.

Obrázek 9: Navázané interkalační barvivo na dsDNA (upraveno dle Arya et al. 2005)



Sondy TaqManTM jsou hydrolyzační oligonukleotidové sondy využívající 5'-3' exonukleázovou aktivitu *Taq* DNA polymerázy. Sonda se naváže mezi primery a obsahuje dva typy značek: fluorescenční značku (reportér) na 5' konci a zhášec na 3' konci. Zhášec a reportér se od sebe nachází ve vzdálenosti pouhých několika nukleotidů. Když je sonda neporušená, tak zhášec pohlcuje fluorescenci, kterou emituje reportér. Během syntézy vlákna dojde vlivem aktivity DNA polymerázy k rozštěpení sondy a emisi fluorescence (Butler 2012). Nevýhodou sond jsou vyšší počáteční náklady. Princip TaqMan sond je zobrazen na Obr. 10.

Obrázek 10: TaqMan sonda (upraveno dle Arya et al. 2005)



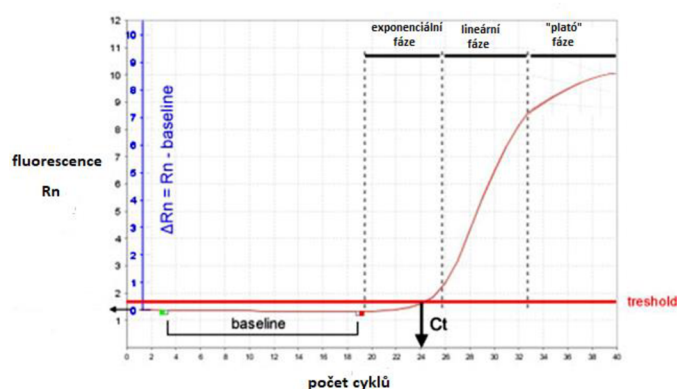
Dále je možné použít molekulární majáky (molecular beacons) tvořící volně v roztoku strukturu vlásenky. Během reakce vznikne lineární struktura (oddálí se reportér a zhášec) a dojde k emisi fluorescenčního signálu. Dalším typem jsou bifunkční molekuly Scorpions®, které jsou navázány na primer a opět tvoří strukturu vlásenky.

Fluorescenčně značené primery se při amplifikaci inkorporují do produktu PCR a vysílají fluorescenční signál. Využívají se univerzální primery AmpliFluorTM a technologie LUX s vlásenkovou strukturou fungující na stejném principu, jako zmíněné sondy s vlásenkovou strukturou (Šmarda et al. 2005).

3.3.2.3 Kinetika reakce

Grafickým vyjádřením průběhu reakce je tzv. amplifikační graf, který je po ukončení amplifikačního programu sestaven softwarem na základě získaných dat. Graf je tvořen amplifikační křivkou sigmoidálního tvaru s odlišnými fázemi (Obr. 11). Osa „x“ znázorňuje počet cyklů a osa „y“ hodnotu fluorescence (Arya et al. 2005).

Obrázek 11: Amplifikační křivka (upraveno dle <https://www.dnasoftware.com/amplification-efficiency-is-not-exponential/>)



V počáteční fázi amplifikace se postupně hromadí fluorescence, kterou nelze odlišit od hodnoty signálu pozadí (baseline). U počítačových softwarů bývá hodnota baseline nastavena na 3 až 15 cyklů a během této fáze přístroj nedetekuje žádný signál. Hodnota signálu, která přesáhne hodnotu baseline, se nazývá práh detekce (threshold) (Arya et al. 2005).

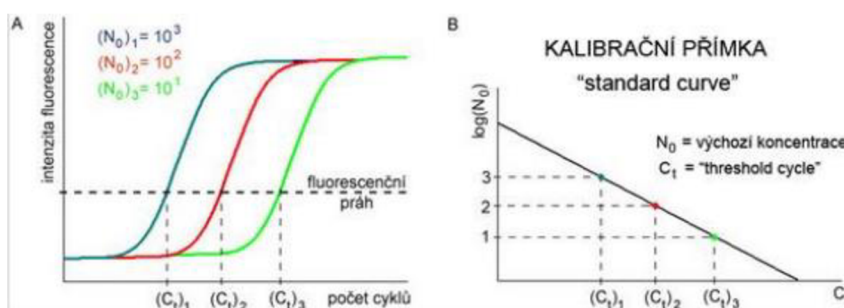
Exponenciální fáze je specifická exponenciálním nárůstem množství amplikonů a jejich fluorescence. Číslo cyklu, během kterého se nahromadí dostatek amplikonů a vznikne detekovatelný signál, se označuje C_t (cycle of threshold, cyklus prahu). Graficky v bodě C_t dochází k protnutí amplifikační křivky a přímky threshold. Jeho hodnota je nepřímo úměrná množství templátové DNA (čím je více templátové DNA, tím je nižší C_t). Na základě hodnoty fluorescence v exponenciální fázi se kvantifikuje množství templátové DNA (LabGuide 2019).

V lineární fázi dochází k postupnému vyčerpávání složek reakční směsi. Jakmile se složky reakční směsi (např. primery nebo dNTP) vyčerpají, dojde ke spojení produktů a nastává tzv. plató fáze (Quan et al. 2018). Plató fáze začíná zhruba po 28 až 40 cyklech (Arya et al. 2005).

3.3.2.4 Metody kvantifikace

Kvantifikace produktu je u qPCR možná dvěma způsoby. Prvním způsobem je absolutní kvantifikace (Obr. 12), při které se využívá kalibrační křivka (přímka) vytvořená počítačovým softwarem. Výchozí koncentrace neznámého vzorku je zjištěna na základě hodnot C_t (označované také C_q) testovaného vzorku a standardů, které mají známou koncentraci nebo počet kopií (Arya et al. 2005).

Obrázek 12: Absolutní kvantifikace (A – jednotlivé amplifikační křivky 3 vzorků s různým množstvím N_0 ; B – kalibrační křivka standardů), převzato z <http://www.generi-biotech.com>



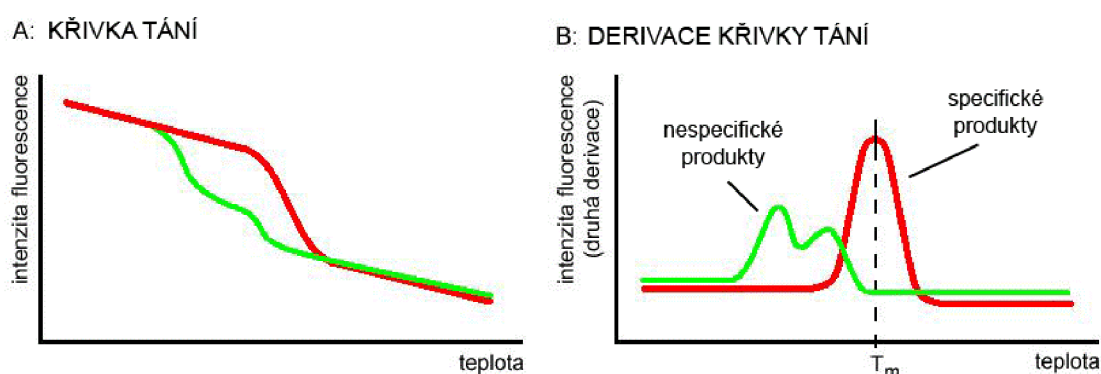
Analýzou kalibrační křivky je hodnocena efektivita (E ; účinnost) reakce, která je dána směrnici (sklonem) lineárního vynesení C_t vůči dekadickému logaritmu koncentrace DNA vzorku. Jak již bylo zmíněno, tak při 100% účinnosti se množství produktu zdvojnásobí a hodnota E odpovídá hodnotě 2. Ideální účinnost úspěšně proběhlé reakce se pohybuje v rozmezí 90 až 110 %. Vyšší hodnoty efektivit mohou být zapříčiněny chybným pipetováním nebo vznikem nespecifických produktů (dimery primerů). Optimální směrnice kalibrační křivky by se měla pohybovat v rozmezí -3,6 do -3,1 a koeficient determinace (R^2) by měl dosahovat hodnot větších než 0,98 (Bio-Rad Laboratories 2006).

Druhým způsobem je relativní kvantifikace, kdy není potřebné sestavení kalibrační křivky ani příprava standardů. Podstatou relativní kvantifikace je srovnání množství požadovaného genu s expresí stejného genu v odlišném vzorku. Výsledkem je vyjádření změny exprese cílové molekuly v porovnání s kontrolou (kalibrátorem). Kalibrátor představuje vyjádření výchozího stavu a vůči němu se zjišťují změny. Využitím z praxe může být například srovnání úrovně exprese mezi zdravou a rakovinnou tkání (Arya et al. 2005).

3.3.2.5 Analýza křivky tání (melting analýza)

Analýza křivky tání slouží k posouzení, zda při reakci došlo k amplifikaci pouze specifických produktů. Využívá se u interkalačních barviv, která se vážou na kteroukoliv dvouvláknovou DNA a nejsou sekvenčně specifická. Po dokončení amplifikace se spustí program při teplotě vyšší než teplota tání primeru. Teplota je postupně navyšována a dochází k denaturaci dsDNA, disociaci fluorescenčního barviva a poklesu intenzity fluorescence. Grafickým vyjádřením závislosti teploty a intenzity fluorescence je křivka tání. Na základě derivace křivky tání se vyhodnocuje přítomnost nesespecifických produktů, které mají obvykle nižší teplotu tání než specifické produkty. V případě vzniku nesespecifických produktů je křivka derivace tvořena dvěma a více vrcholy (Downey 2014). Křivka tání a její derivace je zobrazena na Obr. 13.

Obrázek 13: Analýza křivky tání (<http://umtk.vscht.cz/miniatlas-vad/metody/qpcr/>)



3.3.2.6 Využití v potravinářském průmyslu

V odvětví analýzy potravin je kvantitativní PCR v reálném čase nástrojem se stále širším uplatněním. Poskytuje rychlou, levnou a vysoce senzitivní analýzu, díky které lze spotřebiteli zaručit kvalitu a zdravotní nezávadnost potraviny (Salihah et al. 2016). Při analýze potravin je kvalita izolované DNA ovlivněna procesem zpracování potraviny a působením vysokých teplot, které mohou zapříčinit vznik degradačních procesů na úrovni DNA. Úspěšnost izolace DNA ovlivňuje i přítomnost dalších složek v matrici potraviny (např. lipidy, polysacharidy a proteiny). Všechny tyto faktory ovlivňují délku a množství amplifikovatelné DNA (Logan et al. 2009; Kaňuková et al. 2020).

Metodou PCR je možné prokazovat autenticitu potravin, kdy se odhalují nedeklarované složky produktu (Logan et al. 2020). Dále je možná identifikace jednotlivých rostlinných/živočišných druhů v potravině (např. u masných výrobků), pro kterou se dříve využívaly metody založené na analýze proteinů. Problémem je, že u zpracovaných potravin analýza proteinů nedokázala rozlišit příbuzné živočišné druhy (Salihah et al. 2016), a proto se pro tyto účely často využívá multiplexní PCR v reálném čase. Dalším využitím je identifikace alergenů pomocí imuno-PCR, která je schopná identifikovat i stopová množství. Pro identifikaci alergenů se standardně využívá analýza pomocí enzymu vázaného na imunosorbent (ELISA), ale účinnost této metody klesá u vysoce zpracovaných potravin. Dále je možné identifikovat alergeny (multiplexní PCR) a geneticky modifikované organismy, u kterých je problémem omezená dostupnost referenčních GM standardů (Iwobi et al. 2012; Salihah et al. 2016). Pro identifikaci bakterií a virů se používá kvantitativní real-time PCR s interkalačním barvivem ethidium monoazid, které penetruje do buněk s porušenou membránou a je schopné rozlišit živé a mrtvé buňky (Nocker & Camper 2006).

3.3.3 Digitální PCR (dPCR)

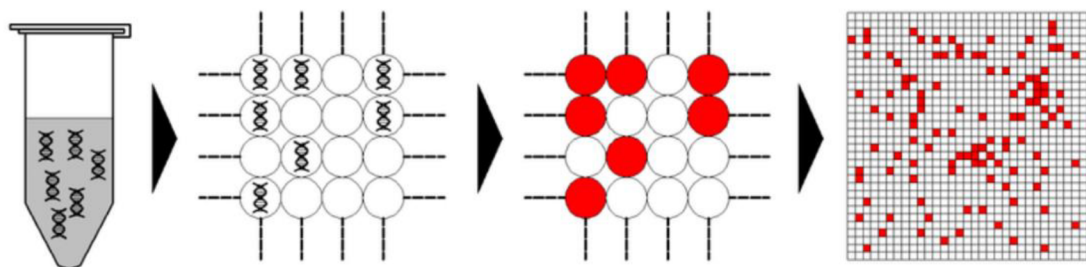
3.3.3.1 Obecná charakteristika

Digitální polymerázová řetězová reakce umožňuje absolutní kvantifikaci nukleových kyselin ve vzorku. Poprvé ji představil Vogelstein a Kinzler v roce 1999 (Cao et al. 2020). Princip reakce spočívá v rozdělení reakční směsi do oddílů, ve kterých probíhá amplifikace izolovaně. Objem reakční směsi v oddílech se pohybuje v rozmezí několika pikolitrů až desítek nanolitrů (Fialová et al. 2019). Složení reakční směsi je shodné s PCR v reálném čase. Obsahuje DNA polymerázu, pufr, nukleotidy, primery, hořčnaté ionty a fluorescenční molekuly. Pro detekci produktu se nejčastěji využívá interkalační barvivo SYBR Green I a TaqMan sondy (Quan et al. 2018).

3.3.3.2 Detekce a kvantifikace produktů

Pro kvantifikaci není nutné sestavení kalibrační křivky, což je hlavní rozdíl při srovnání této metody s qPCR. Emise fluorescenčního signálu vzniká u oddílů s obsahem cílové sekvence. Při výpočtu se využívá binomická statistika, kdy oddíly s pozitivním signálem se označují hodnotou 1 a oddíly bez signálu hodnotou 0. Pro výpočet koncentrace cílových molekul je nutné znát počet a objem reakčních oddílů a množství pozitivních signálů. Koncentrace je následně stanovena podílem pozitivních oddílů k jejich celkovému počtu. Stanovení koncentrace templátu v původním vzorku probíhá na základě tzv. Poissonova rozdělení (Quan et al. 2018). Princip digitální PCR zobrazuje Obr. 14.

Obrázek 14: Princip digitální PCR (Cao et al. 2020)



3.3.3.3 Rozdělení technologií dPCR

Jednotlivé technologie digitální PCR se odlišují na základě způsobu rozdělení vzorku do reakčních oddílů. Rozdělení může probíhat pomocí mikročipu (cdPCR – čipová digitální PCR) nebo kapek tvořených emulzí vody a oleje (ddPCR – kapková/dropletová digitální PCR) (Cao et al. 2020). U kapkové dPCR je vzorek s reakční směsí smíchán s olejem, který slouží k oddělení jednotlivých kapiček. Používaný olej by měl být nereaktivní a pro stabilizaci rozhraní vody a oleje se přidávají povrchově aktivní látky (Cao et al. 2020). Generátor kapek rozptýlí reakční směs na 20 000 jednotlivých reakčních oddílů (Obr. 15), které se přenesou na 96jamkovou PCR destičku a jsou vloženy do termocyklu. V termocyklu proběhne vlastní amplifikace a přítomnost templátové DNA vyhodnocuje čtečka kapek. Zaznamenaná data zpracuje speciální software. U čipové dPCR se využívají čipy s izolovanými komorami, případně jamkami a disperze vzorku může probíhat třemi způsoby (kanálová, tisková nebo pomocí mikrodestiček) (Fialová et al. 2019).

Obrázek 15: Rozdělení reakční směsi na kapičky (<https://www.bio-rad.com/en-cz/life-science/learning-center/introduction-to-digital-pcr/what-is-droplet-digital-pcr?ID=MDV31M4VY>)



3.3.3.4 Využití

Digitální PCR umožňuje přesné a citlivé měření počtu kopií DNA, zejména u vzorků s nízkou koncentrací templátu a u složitých vzorků (Cai et al. 2014). Výhodou oproti qPCR je menší vliv inhibitorů na reakci a absence postamplifikační analýzy. Vzhledem k tomu, že není nutné provádět sériové ředění, minimalizují se chyby v důsledku pipetování. Nevýhodou mohou být vysoké náklady na přístrojové vybavení. Metoda nachází využití v lékařské diagnostice, identifikaci druhů rostlin a živočichů, analýze potravin, forenzní genetice, mikrobiologii a dalších oborech (Fialová et al. 2019).

4 Metodika

Experimentální část práce byla koncipována do tří fází:

1. **Testovací a optimalizační fáze** pro výběr kandidátních STR markerů s nejvyšší druhovou a lokusovou specifitou.
2. **Experimentální fáze** testování vlivu tepelného ošetření na degradaci DNA.
3. **Validační fáze** pro ověření funkčnosti kandidátních markerů na reálných vzorcích potravin.

V rámci všech fází proběhlo testování pomocí kvantitativní PCR v reálném čase za použití různých druhů vzorků. Pro vytvoření kalibračních standardů byla využita digitální dPCR.

4.1 Použité vzorky máku a makové výrobky

Pro experimentální část práce bylo využito několik druhů vzorků. Pro testování specifity genetických markerů byla DNA izolována z listů mladých rostlin náhodně vybraných odrůd máku, kterými disponuje Katedra genetiky a šlechtění. Jednalo se o rostliny, které byly získány v rámci grantových projektů. Pro testování vlivu tepelného ošetření na DNA bylo vybráno 5 vzorků nerozemletých semen běžně dostupných v maloobchodním prodeji. Vzorky byly označeny názvy CE16 až CE27 (Tab. 2). Poslední skupinou bylo 7 vzorků potravin s obsahem máku, které jsou zobrazeny v Tab. 3. Vzorek P2 neobsahoval mák a sloužil jako kontrola.

Tabulka 2: Analyzovaná semena

NÁZEV VZORKU	BARVA SEMEN	NÁZEV NA OBALU
CE16	šedá semena	Mák šedý bio (Sonnentor)
CE18	modrá semena	Mák modrý (Plody slunce)
CE20	modrá semena	Mák modrý (Fine Life)
CE26	modrá semena	Modrý mak (Mak z Jarnej)
CE27	bílá semena	Biely mak (Mak z Jarnej)

Tabulka 3: Analyzované potraviny

NÁZEV VZORKU	NÁZEV POTRAVINY
P1	Kaiserka maková
P2	Kaiserka cereální
P3	Dalamánek
P4	Loupák makový
P5	Špička s mákem
P6	Makovky (sušenky)
P7	Mini-Tuc (sušenky)

4.2 Příprava vzorků

4.2.1 Tepelné ošetření semen

V rámci simulace vlivu teplotních podmínek byl každý vzorek ze skupiny nerozemletých semen (CE16 až CE27) podroben 6 variantám tepelného ošetření a 1 varianta sloužila jako kontrola. Jednotlivé způsoby ošetření shrnuje Tab. 4.

Tabulka 4: Způsoby ošetření a přípravy semen máku

VARIANTA	PŘÍPRAVA	ZPŮSOB OŠETŘENÍ
A	homogenizace v třecí misce	bez ošetření
B	cca 2 čajové lžičky do kádinky s vodou	30 min. v mikrovlnné troubě (max. výkon)
C	cca 2 čajové lžičky do Erlenmeyerovy baňky (75 ml), zabalení baňky do alobalu	20 min. v autoklávu (121 °C)
D	cca 2 kávové lžičky, zabalení do alobalu	30 min. v horkovzdušné troubě (150 °C)
E		30 min. v horkovzdušné troubě (175 °C)
F		30 min. v horkovzdušné troubě (200 °C)
G		30 min v horkovzdušné troubě (225 °C)

4.2.2 Izolace DNA

Před izolací byly všechny vzorky homogenizovány pomocí třecí misky vychlazené kapalným dusíkem. K dusíku byl postupně přidáván daný vzorek, který byl tloučkem rozmělněn na jemný prášek. Po každém drcení následovalo omytí třecí misky vodou, 96% etanolem, 1% roztokem Sava a poté znovu etanolem, aby nedošlo ke vzájemné kontaminaci vzorků. Z homogenizovaných semen bylo naváženo 100 mg výchozího materiálu, z homogenizovaných potravin a listů byl odebrán reprezentativní vzorek a byla provedena izolace genomové DNA pomocí komerčního kitu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Německo). Izolace byla provedena dle protokolu výrobce a podrobný postup je součástí kapitoly Přílohy. Principem izolace pomocí tohoto kitu je navázání DNA na silikagelové membrány v kolonkách. Kit obsahuje dva druhy kolonek – fialové pro mechanickou filtraci zbytků buněčných stěn, precipitovaných proteinů a polysacharidů a bezbarvé pro absorpci a eluci DNA

Ve zkumavkách s izolovanou DNA byla ověřena její kvalita pomocí UV spektrofotometrie s přístrojem S-111107AW NanoPhotometer (Implen, Německo), zobrazeném na Obr. 16. Koncentrace DNA byla měřena proti slepému vzorku s obsahem elučního pufru z izolačního kitu. Každý vzorek byl měřen dvakrát a z naměřených hodnot byl vypočítán průměr. Čistota izolované DNA byla určena na základě poměru absorbancí A_{260} (absorpce DNA) a A_{280} (absorpce bílkovin), který by u DNA měl být v rozmezí od 1,7 do 2. Nízké hodnoty poukazují na přítomnost proteinů či jiných reagentů, případně na nedostatečnou koncentraci DNA (<10 ng/μl). Vysoké hodnoty nemusí znamenat problém, protože izolovaná DNA může kromě dsDNA obsahovat i ssDNA, volné nukleotidy a RNA, které absorbují při 260 nm. Po měření následovalo naředění vyhovujících vzorků semen a listů na koncentraci 7,5 ng/μl. Vzorky potravin nebyly ředěny z důvodu naměřených nízkých hodnot poměrů absorbancí.

Obrázek 16: S-111107 NanoPhotometer (Implen)



4.3 Dropletová digitální PCR (ddPCR)

Metoda dropletové digitální PCR byla zvolena pro přesnou kvantifikaci molekul DNA ve vzorku. Její využití umožnilo vytvoření kalibračních standardů pro qPCR u semen a potravin. Testování probíhalo pro markery OPTET156 a OPTET065 u 6 vybraných vzorků (odrůdy Malsar, Albín, Kék Duna, Bergam, Akvarel, Opex), které měly na základě UV spektrofotometrie vysokou koncentraci DNA. Pro amplifikaci byla využita reakční směs o celkovém objemu 25 μ l, jejíž složení je uvedeno v Tab. 5.

Kompletní reakční směs se nechala vytemperovat na laboratorní teplotu (po dobu cca 3 min.). Po vytemperování se celý objem přenesl do jamky reakční kazety pro generování kapiček (DG8TM cartridge, Bio-Rad, USA), která se skládá ze tří řad. Do prostřední řady byly pipetovány vzorky a do spodní řady se pipetovalo 70 μ l oleje pro tvorbu dropletů (Droplet Generator Oil, Bio-Rad, USA). Reakční kazeta byla zajištěna gumičkou na utěsnění (DG8 Gasket, Bio-Rad, USA) a přemístěna do generátoru dropletů (QX200 Droplet Generator, Bio-Rad, USA). Poté se emulze s kapičkami opatrně přenesla do PCR destičky, která byla utěsněna hliníkovou folií v přístroji pro zapečetění (PX1 PCR Plate Sealer, Bio-Rad, USA; Obr. 17), které probíhalo po dobu 10 s při teplotě 185 °C.

Po tepelném utěsnění byla destička umístěna do termocyklieru (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad, USA; Obr. 18) a amplifikována za podmínek uvedených v Tab. 6. Sekvence použitých primerů pro markery OPTET156 a OPTET065 jsou uvedeny v následující kapitole kvantitativní PCR v reálném čase. Po amplifikaci byla destička umístěna do ddPCR čtečky (QX200 Droplet Reader, Bio-Rad, USA), kde byla zaznamenávána fluorescence jednotlivých kapiček. Data byla vyhodnocena pomocí programu QuantaSoft v1.7.4. (Bio-Rad, USA).

Tabulka 5: Reakční směs pro ddPCR

SLOŽKA	MNOŽSTVÍ	OBJEM (μl)
QX200™ddPCR™EvaGreen Supermix	1x	12,5
Primer F	0,2 μM	0,5
Primer R	0,2 μM	0,5
H₂O	-	6
DNA	45 ng	6

Tabulka 6: Teplotní cyklus pro ddPCR

FÁZE	DOBA	TEPLOTA (°C)	POČET OPAKOVÁNÍ
počáteční denaturace	5 min.	95 °C	1x
denaturace	30 s.	95 °C	40x
anelace + extenze	60 s.	60 °C	40x
chlazení	5 min.	4 °C	1x
stabilizace	5 min	90 °C	1x
finální chlazení	dle potřeby	10 °C	1x

Obrázek 17: PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad)



Obrázek 18: T100 Thermal Cycler (Bio-Rad)



4.4 Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR)

Kvantitativní PCR v reálném čase byla provedena u vzorků listů, semen i potravin. Teplotní profil, sekvence použitých primerů a složení reakční směsi bylo u všech reakcí stejné. Složení reakční směsi o celkovém objemu 10 μ l je uvedeno v Tab. 7. Použitý supermix obsahoval Sso7D fusion DNA polymerázu, směs dNTP, $MgCl_2$, barvivo SYBR Green I Dye, interní referenci založenou na barvivo ROX a enhancer. Sso7D fusion DNA polymeráza je kovalentně spojená se sekvenčně nespecifickým proteinem, který se získává z termofilní archebakterie (*Sulfolobus solfataricus*) žijící ve vulkanických horkých pramenech. Wang et al. (2004) tuto strategii představil a patentoval v roce 2004. Protein se váže na dsDNA bez sekvenční preference a zabraňuje disociaci polymerázy během amplifikace (Wang et al. 2004; Yadav 2015). Teplotní profil reakcí shrnuje Tab. 8. a sekvence použitých primerů pro každý marker jsou uvedeny v Tab. 9. Amplifikace probíhala v termocykleru CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA; Obr. 19). Standardy a vzorky byly pipetovány do 8 stripů a analyzovány ve třech opakováních. Vyhodnocení kvantitativní PCR v reálném čase bylo provedeno v programu CFX Maestro v4.1.24. (Bio-Rad, USA).

První amplifikace probíhala za účelem ověření specifity jednotlivých genetických markerů. Analyzované markery byly mikrosatelitního typu a byly vybrány ze souboru 27 publikovaných markerů (Vašek et al. 2021). Z tohoto souboru bylo vybráno 5 nejvhodnějších s vysokou druhovou specifitou. Pro testování byly použity vzorky DNA z listů, ze kterých byly pomocí sériového ředění vytvořeny standardy pro qPCR s následujícím množstvím DNA: 30; 15; 7,5; 3,75 a 1,875 ng/μl. Na základě výsledků amplifikačních křivek a melting analýzy byly vybrány 2 markery (OPTET065, OPTET156), které sloužily pro testování vzorků tepelně ošetřených semen a potravin.

Účelem druhé amplifikace bylo testování vybraných markerů u tepelně ošetřené DNA. Standardy vytvořené na základě ddPCR obsahovaly následující množství DNA: 64 000; 8 000; 1 000; 125 a 15,6 pg/μl. Cílem této qPCR bylo ověření, zda oba markery detekují stejné množství DNA. Odlišné hodnoty mohou znamenat degradaci DNA vlivem simulovaných podmínek. Výsledky této části byly statisticky zpracovány.

Poslední amplifikací bylo testování markerů OPTET156 a OPTET065 na reálných potravinách. Standardy obsahovaly stejné množství DNA, jako při předchozí reakci. Cílem bylo otestování, zda jsou markery schopné detekovat DNA i ve vzorku reálné potravin.

Tabulka 7: Složení reakční směsi pro qPCR

SLOŽKA	MNOŽSTVÍ	OBJEM (μl)
SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix	1x	5
Primer R	0,2 μM	0,5
Primer F	0,2 μM	0,5
DNA	30 ng	4

Obrázek 19: CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System



Tabulka 8: Teplotní cyklus pro qPCR

FÁZE	DOBA	TEPLOTA (°C)	POČET OPAKOVÁNÍ
počáteční denaturace	120 s	98 °C	1x
denaturace	10 s	98 °C	45x
annealing + extenze	25 s	60 °C	

Tabulka 9: Sekvence vybraných prime

NÁZEV MARKERU	DÉLKA PRODUKTU (bp)	PRIMER F (5' -> 3')	PRIMER R (5' -> 3')
OPTET024b	207-234	ATCGTGGTGGGAATGAGTGTT	gtttcttGGTTCGTTTGGAGTTACACAA
OPTET063	88-108	AACTCAAAGACTCGATAAACTGAATAA	gtttcttGGAAAATCGTCTTCCGATG
OPTET065	224-232	GATAGCACAGGAAAAAGTACAACATA	gtttcttGGTTATTGACATACATGGTGGA
OPTET156	136-144	AGTTTTACAAACAGGGTTGATTC	gtttcttCATCATCTGATTATCATAAACCTCA
OPPEN29	146-177	TTACAAGCCGAGTGGGTGTT	gtttcttCACCAGTGTCTGCAAGGAG

4.5 Statistická analýza dat

Data z testování tepelně ošetřených vzorků semen byla statisticky zpracována. Prvním krokem bylo vytvoření jednoduchých regresních modelů, které byly sestaveny na základě kalibračních křivek. Kvalita modelů byla vyhodnocena na základě koeficientu determinace (R^2), který udává, kolik procent variability závisle proměnné (C_q) je vysvětleno hodnotami nezávisle proměnné ($\log DNA$). Na základě regresních modelů byly vypočítány odhadované koncentrace DNA ve vzorcích. Pro zhodnocení rozdělení hodnot C_q u jednotlivých variant byly sestaveny krabicové diagramy (boxploty), které jsou neparametrické a zobrazují rozdíly bez předpokladu normálního rozdělení dat.

Statistická analýza dat byla provedena v programu STATISTICA ver.12. (Statsoft, Inc. 2013) a grafické výstupy v programu R ver.4.1.3 (R Core Team 2022). Data byla porovnána pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu (jednofaktorová ANOVA), která sleduje účinek faktoru (způsobu ošetření) na závisle proměnnou (hodnotu logaritmu množství DNA). Vzorky byly během PCR analyzovány v triplikátech, a proto byly hodnoty před analýzou zprůměrovány pro minimalizaci chyb pipetování. Výsledky byly hodnoceny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Před zahájením vlastní analýzy byla provedena explorační analýza dat, která ověřila předpoklady (normalitu a homogenitu dat) pro provedení ANOVY. K ověření, zda data pochází z normálního rozdělení, byl zvolen Shapiro-Wilkův test. Následně byla ověřena homogenita rozptylů pomocí Bartlettova testu. Po ověření předpokladů byla stanovena nulová hypotéza, že způsob ošetření nemá statisticky významný vliv na hodnotu logaritmu množství DNA. Nulová hypotéza byla testována pomocí F-testu a rozdíly mezi jednotlivými variantami ošetření byly hodnoceny pomocí Tukeyho testu.

5 Výsledky

5.1 Izolace DNA

Kvalita izolované DNA byla hodnocena na základě hodnot poměru absorbancí, které by se měly pohybovat v rozmezí 1,7 až 2. Hodnoty spolu s koncentracemi u vzorků potravin a tepelně ošetřených semen shrnují Tab. 10 a 11. Nevyhovující hodnoty poměru absorbancí byly označeny červeně. U vzorků potravin byla většina hodnot menších než 1,7. Z hlediska kvality DNA vyhovoval pouze vzorek P1 (Kaiserka maková) s hodnotou poměru absorbancí 1,9. Vzorky potravin nebyly ředěny a na základě nereálně vysokých koncentrací lze předpokládat, že výsledky měření byly zkresleny. U skupiny tepelně ošetřených semen se většina hodnot pohybovala v daném intervalu, pouze u některých variant ošetření v horkovzdušné troubě (E, F, G) lze vidět nižší kvalitu izolované DNA.

Tabulka 10: Hodnoty koncentrací a poměru absorbancí u DNA ze vzorků potravin

VZOREK	A260/A280	KONCENTRACE [ng/ µl]
P1= Kaiserka maková	1,9	194
P2= Kaiserka cereální	1,59	171
P3= Dalamánek cereální	1,37	99,5
P4= Loupák makový	1,5	17,5
P5= Špička s mákem	1,39	56,5
P6= Makovky (sušenky)	1,56	106
P7= Mini-Tuc (sušenky)	1,57	118

Tabulka 11: Hodnoty koncentrací a poměru absorbancí u DNA z tepelně ošetřených semen

VZOREK	VARIANTA	A260/A280	KONCENTRACE [ng/ μl]
CE16	A	1,8	81,5
	B	1,9	232
	C	1,8	140
	D	2	44
	E	1,5	47,5
	F	1,9	41
	G	1,5	31,5
CE18	A	1,8	82
	B	1,7	25,5
	C	1,8	77
	D	1,9	37
	E	1,7	34,5
	F	1,7	30,5
	G	1,4	39,5
CE20	A	1,7	35,5
	B	1,8	42
	C	1,7	26
	D	1,7	18
	E	1,5	17,5
	F	1,6	24
	G	1,4	24,5
CE26	A	1,7	49,5
	B	1,9	260
	C	1,8	144
	D	1,8	31,5
	E	1,6	38
	F	1,6	24
	G	1,4	35
CE27	A	1,7	62
	B	1,9	254
	C	1,7	278
	D	1,7	81,5
	E	1,5	39,5
	F	1,4	36,5
	G	1,3	55,5

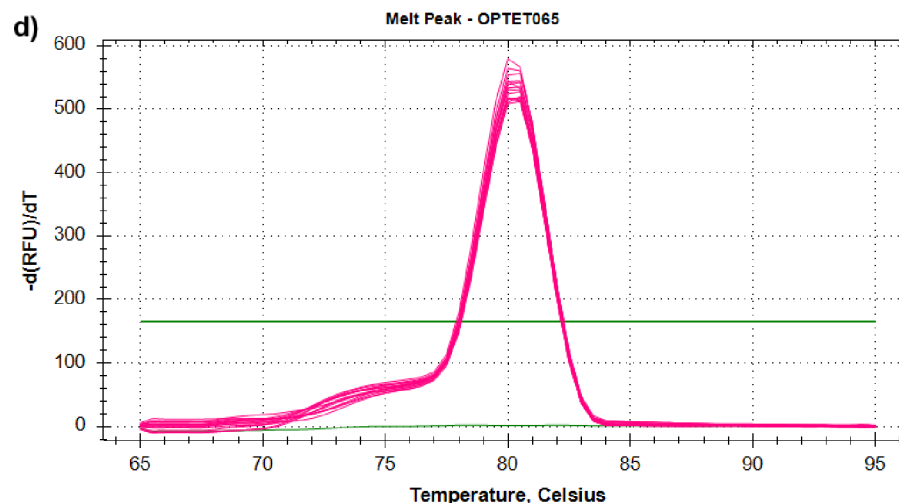
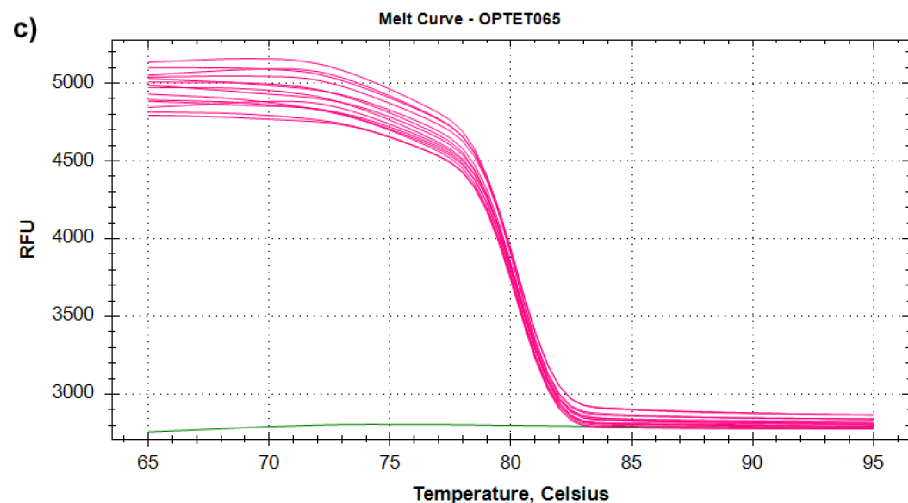
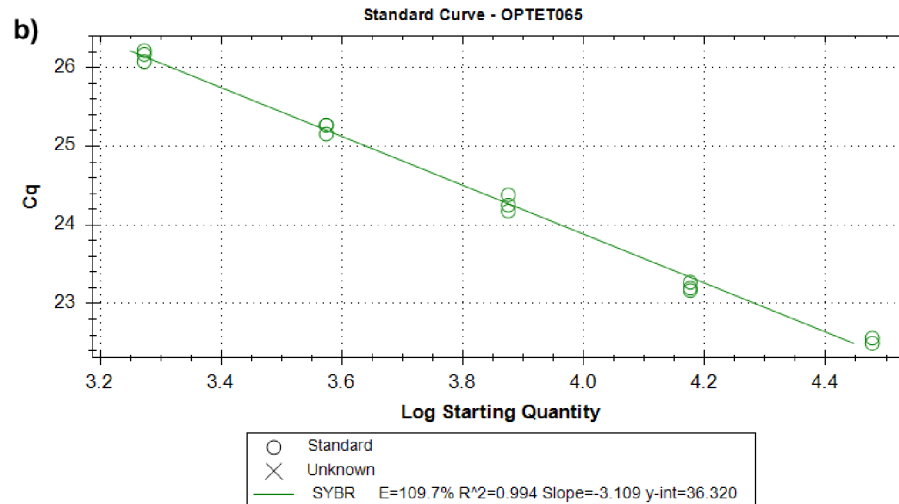
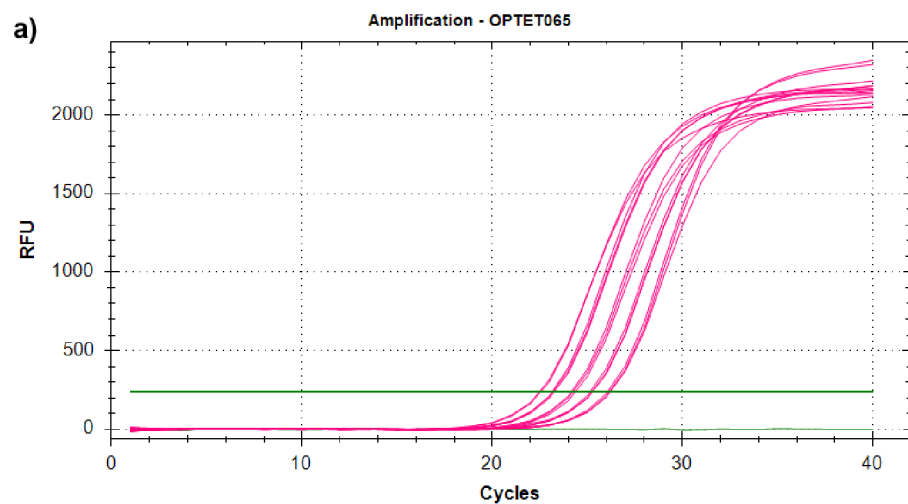
5.2 qPCR pro testovací a optimalizační fázi

Na základě amplifikace a melting analýzy byla určována specifita markerů OPTET024b, OPTET063, OPTET065, OPTET156 a OPPEN29. Vznik PCR produktů byl ověřen na základě amplifikačních křivek, které vykazovaly standardní průběh a dle tvaru křivek tání docházelo nad úrovní prahu pouze ke vzniku specifických produktů. Parametry kalibračních křivek u testovaných markerů jsou shrnuty v Tab. 12. Na základě parametrů byly vybrány dva markery s různou velikostí ampliconu: OPTET065 (224 až 232 bp) a OPTET156 (136 až 144 bp). Amplifikační efektivita u obou markerů nepřekročila hodnotu 110 % a hodnoty sklonu náležely do intervalu -3,1 až -3,6. Grafické výstupy průběhu PCR reakce u obou vybraných markerů lze vidět na Obr. 20 a 21 a ostatní markery byly umístěny do Příloh. Grafické výstupy zobrazují amplifikační křivku (a), kalibrační křivku (b) a křivku melting analýzy spolu s její zápornou derivací (c, d).

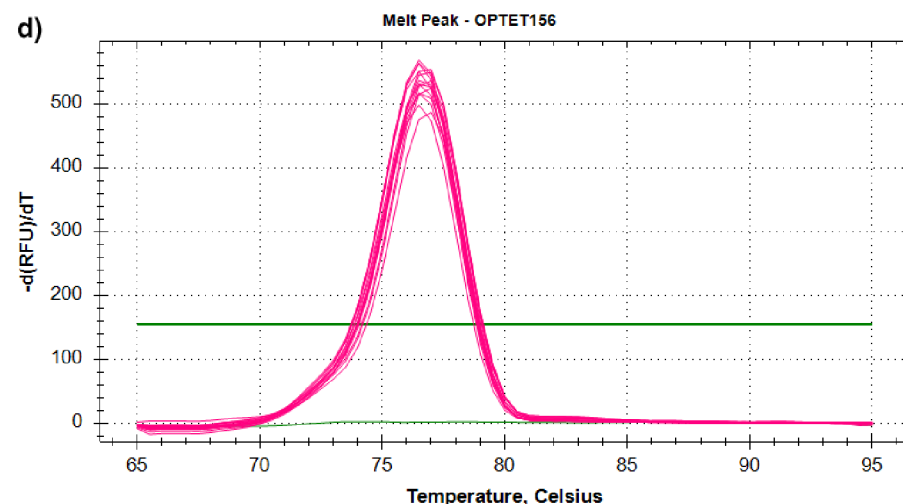
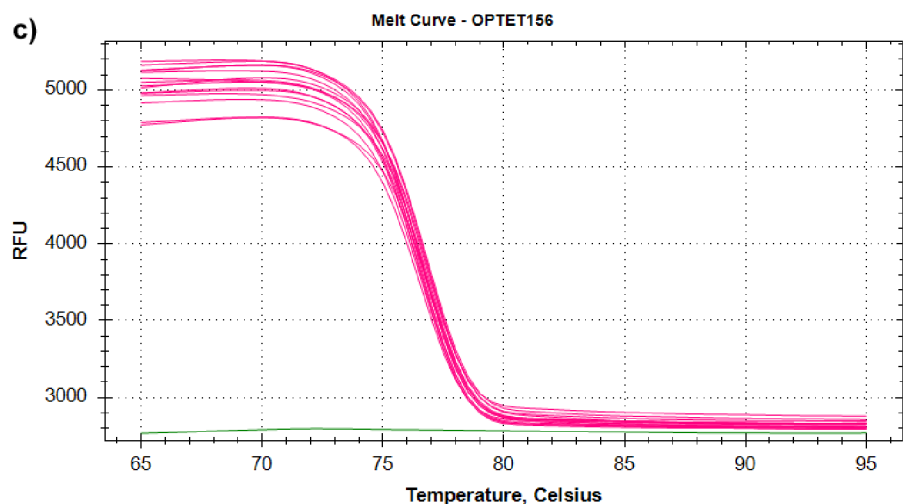
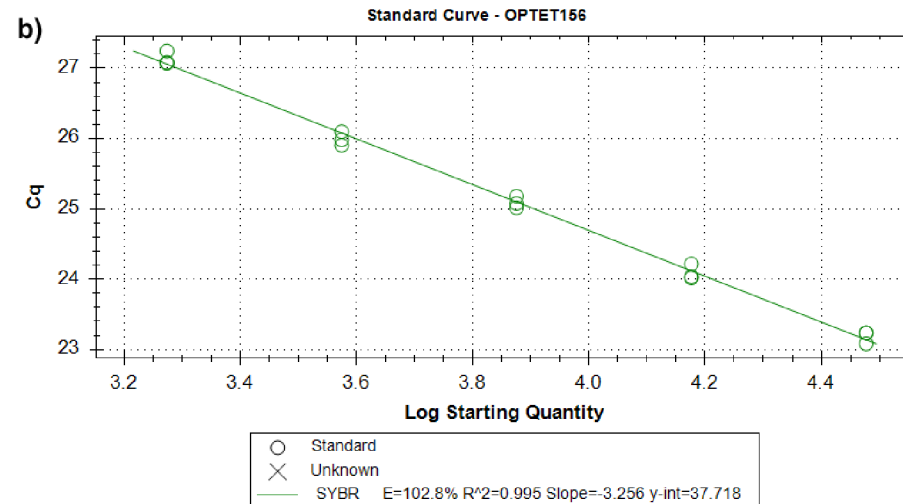
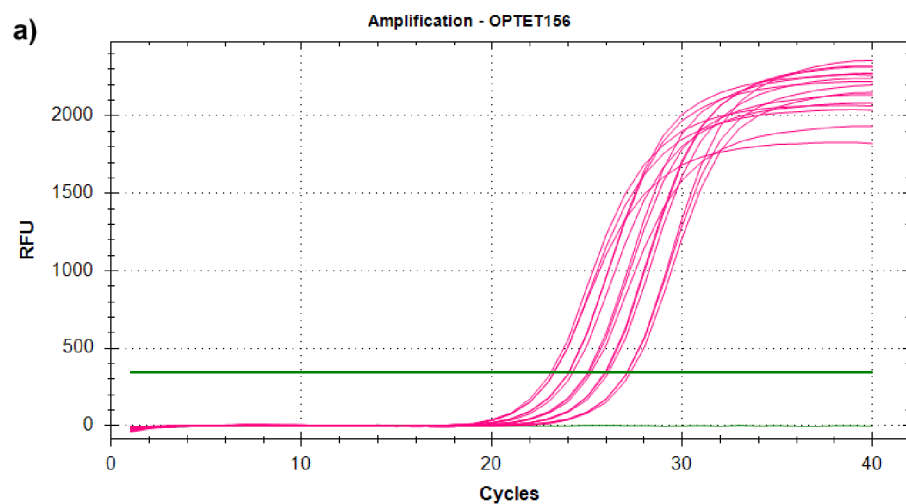
Tabulka 12: Parametry průběhu reakce u testovaných markerů

NÁZEV MARKERU	EFEKTIVITA (%)	SKLON	R ²
OPTET065	109,7	- 3,109	0,994
OPTET156	102,8	- 3,256	0,995
OPPEN29	119,6	- 2,927	0,982
OPTET063	109,1	- 3,121	0,996
OPTET024b	117,6	- 2,962	0,998

Obrázek 20: Výsledek qPCR pro marker OPTET065 v testovací a optimalizační fázi (a – amplifikační křivka; b – kalibrační křivka, c – křivka melting analýzy, d – záporná derivace křivky tání)



Obrázek 21: Výsledek qPCR pro marker OPTET156 v testovací a optimalizační fázi (a – amplifikační křivka; b – kalibrační křivka, c – křivka melting analýzy, d – záporná derivace křivky tání



5.3 qPCR pro experimentální fázi

Při testování tepelně ošetřených semen byla z důvodu velkého množství vzorků amplifikace spuštěna nadvakrát, a proto lze pro každý marker vidět dvě kalibrační křivky. Průběh reakce byl hodnocen na základě parametrů křivek, které zobrazuje Tab. 13. Efektivita amplifikace se u obou markerů pohybovala v požadovaném intervalu 90 až 110 %. Hodnoty sklonu kalibračních křivek náležely do doporučeného intervalu -3,1 až -3,6.

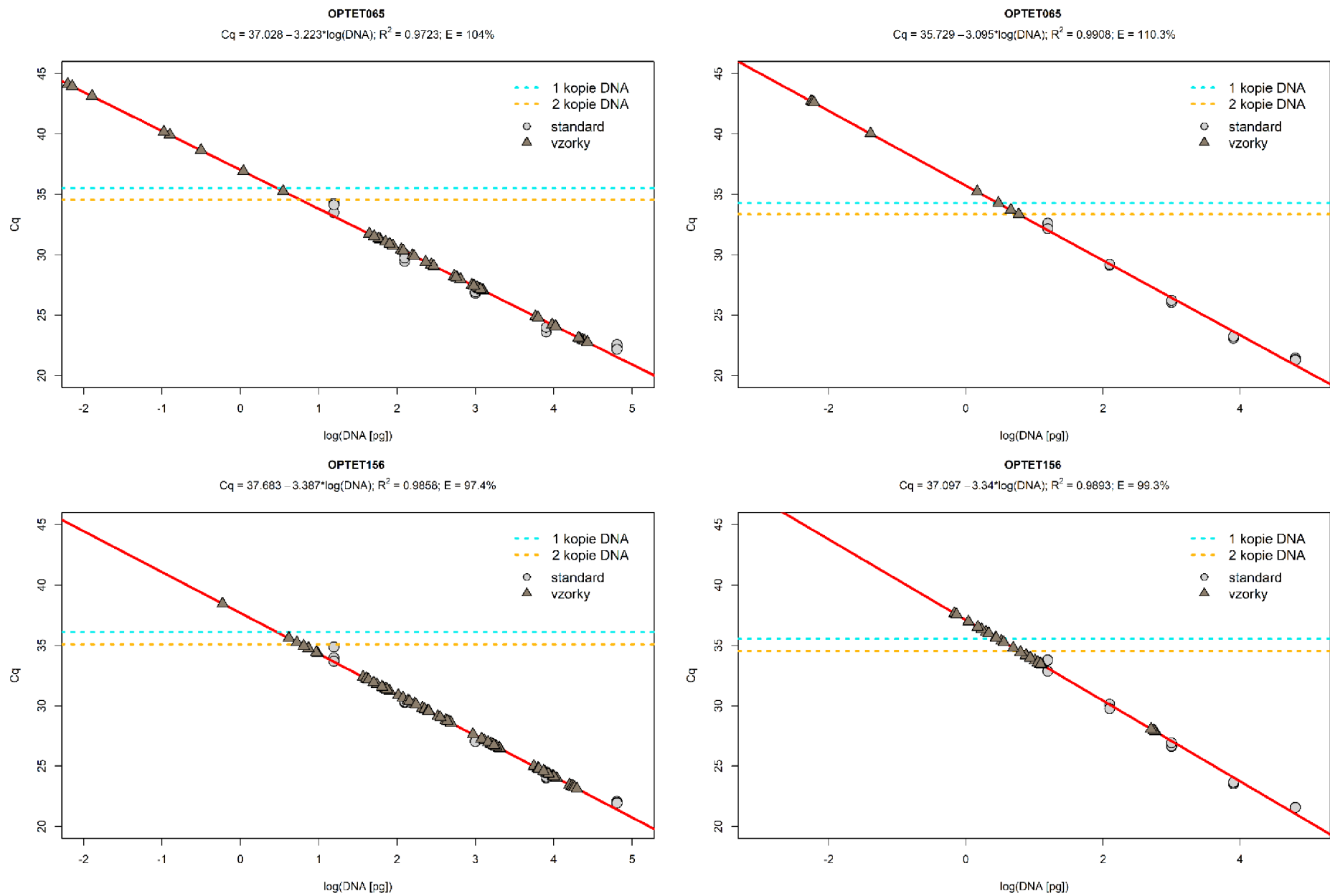
Tabulka 13: Parametry kalibračních křivek u markerů OPTET065 a OPTET156

PARAMETR	OPTET156	OPTET065
EFEKTIVITA (%)	104	99,3
	110,3	97,4
R ²	0,972	0,989
	0,991	0,986
SKLON KALIBRAČNÍ KŘIVKY	-3,223	-3,340
	-3,095	-3,387

5.3.1 Statistická analýza dat

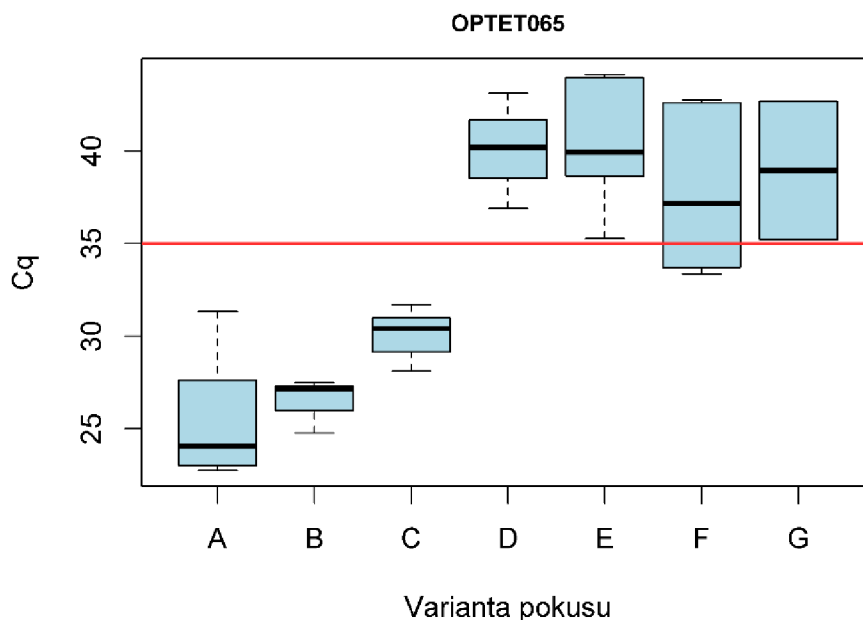
Výsledky odhadovaného množství DNA ve vzorcích na základě vytvořených regresních modelů byly pro přehlednost graficky vizualizovány (Obr. 22) a vlastní číselné výsledky byly dány jako součást Příloh. Pro každý marker jsou uvedeny dva grafy, kdy graf vlevo zahrnuje měření vzorků ošetřených variantami A až E a graf vpravo zahrnuje varianty F až G. Grafy zobrazují nejen hodnoty standardů a vzorků, ale i vlastní regresní rovnice a hypotetické limity detekce pro absolutní počet molekul DNA daného lokusu/markeru (modrá a žlutá přerušovaná linie). Hodnoty nad touto linií jsou považovány za falešně pozitivní signály a nebyly zahrnovány do statistické analýzy. Aproximace limitu byla provedena na základě přepočtu velikosti haploidního genomu máku (bp) na hmotnost (pg). Zjištěná hmotnost byla dosazena do regresní rovnice a byla zjištěna odpovídající hodnota C_q. U grafického zobrazení pro OPTET065 se několik měření nachází nad tímto limitem, zejména u grafu vpravo, kde marker nebyl schopen detekce. U markeru OPTET156 je patrná vyšší specifita (méně vzorků pod limitem).

Obrázek 22: Výsledek qPCR pro experimentální fázi u markerů OPTET065 a OPTET156

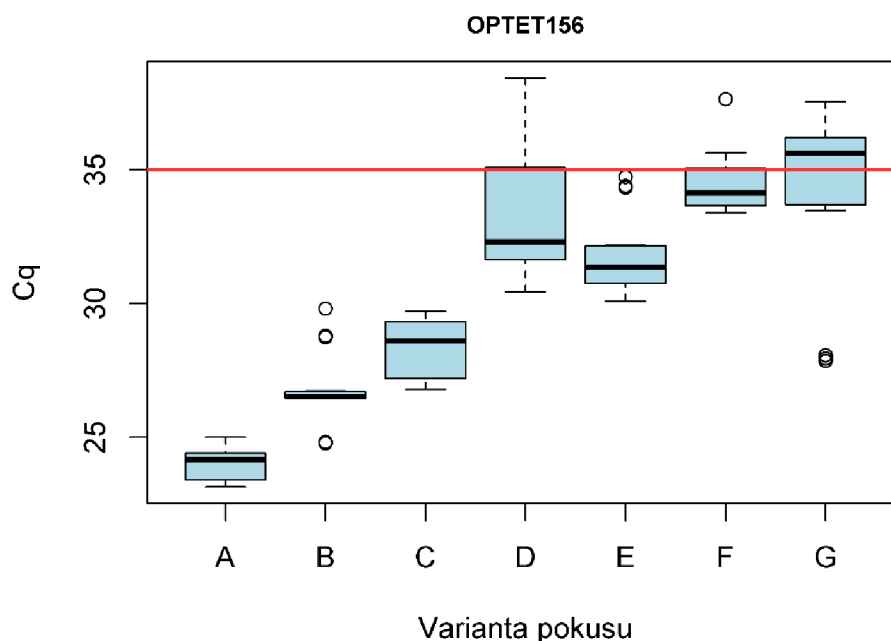


Na základě diagramu pro marker OPTET065 (Obr. 23) je patrné, že varianty D, E, F a G se nachází nad stanoveným limitem detekce (červená čára) a byly vyhodnoceny jako falešně pozitivní výsledky. Pro daný marker byly statisticky hodnoceny pouze varianty B, C a kontrolní skupina A. Nejnižší hodnoty C_q a zároveň největší rozptyl výsledků byl u kontrolní skupiny A. U skupiny B (mikrovlnná trouba – 30 min.) lze vidět nejmenší rozptyl hodnot, který se pohyboval mezi 25 až 28 cykly. U skupiny C (autokláv – 121 °C) se cyklus prahu pohyboval mezi 23 až 32 cykly. U všech variant ošetření v horkovzdušné troubě (D až G) marker nebyl schopen DNA detekovat. Na diagramu pro OPTET156 (Obr. 24) byly rozptyly jednotlivých hodnot menší než u předchozího markeru. Největší rozptyl výsledků lze vidět u varianty D (horkovzdušná trouba - 150 °C), kde se některé hodnoty nacházely nad stanoveným limitem detekce. Limit detekce byl lehce překročen u varianty F (horkovzdušná trouba – 200 °C) a G (horkovzdušná trouba – 225 °C). U variant B, E, F a G se nacházely odlehlé hodnoty (tzv. outliers), které nebyly statisticky hodnoceny.

Obrázek 23: Krabicový diagram pro OPTET065



Obrázek 24: Krabicový diagram pro OPTET156



Na základě explorační analýzy pomocí Shapiro-Wilkova a Bartletova testu nebyla zamítnuta normalita dat a byl splněn předpoklad homogenity. Výsledky explorační analýzy jsou uvedeny v Tab. 14. Nezávislost měření byla zajištěna designem pokusu a náhodným výběrem vzorků. Na základě F testu (Tab. 15) byla zamítnuta nulová hypotéza a byla přijata alternativní hypotéza, že ošetření má statisticky významný vliv na hodnotu logaritmu množství DNA.

Tabulka 14: Výsledky testů explorační analýzy

TEST	OPTET065	OPTET156
Shapiro-Wilkův	W = 0,93	W = 0,96
	p hodnota = 0,33	p hodnota = 0,21
Bartletův	K-squared = 3,95	K-squared = 7,87
	df = 2	df = 6
	p hodnota = 0,14	p hodnota = 0,25

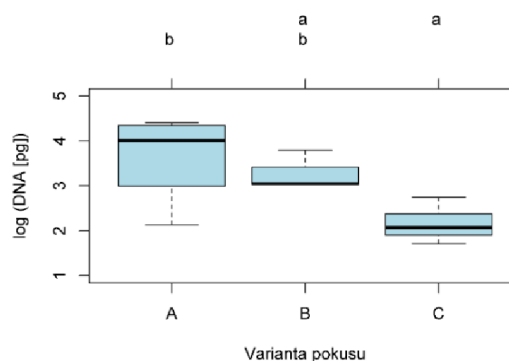
Tabulka 15: Výsledky F-testu

TEST	OPTET065	OPTET156
F-test	F = 5,91 p = 0,02	F = 53,17 p = 4,978. 10⁻¹³

Výsledky Tukeyho testu, který hodnotil statistickou významnost rozdílů středních hodnot mezi jednotlivými skupinami, jsou uvedeny v Tab. 16 a 17. Statisticky významné hodnoty pravděpodobnosti byly označeny červeně. Pro doplnění byly výsledky zobrazeny i pomocí krabicových diagramů (Obr. 25, 26). U markeru OPTET065 byly statisticky významné rozdíly prokázány mezi kontrolní skupinou A a skupinou C (autokláv – 121 °C). Porovnáním skupiny B (mikrovlnná trouba – 30 min.) s kontrolní skupinou A a skupinou C nebyly prokázány statisticky významné rozdíly. U markeru OPTET165 byly statisticky významné rozdíly téměř mezi všemi variantami ošetření. Rozdíly nebyly prokázány mezi skupinou B a C (mikrovlnná trouba a autokláv) a poté mezi skupinou D (horkovzdušná trouba – 150 °C) a ostatními variantami pečení v troubě (E, F, G).

Tabulka 16: Výsledky Tukeyho testu pro OPTET065

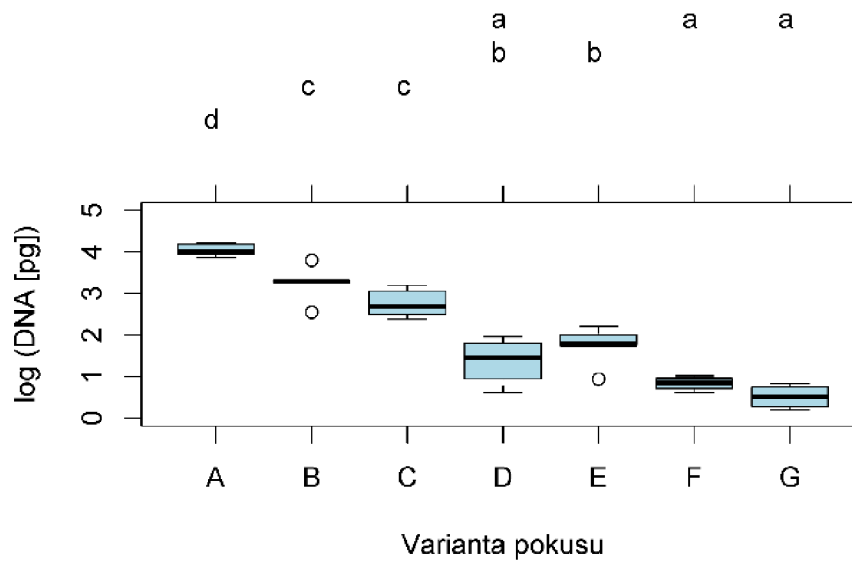
POROVNÁVANÉ VARIANTY	p HODNOTA
B-A	0.72
C-A	0.02
C-B	0.09

Obrázek 25: Krabicový diagram Tukeyho testu pro OPTET065

Tabulka 17: Výsledky Tukeyho testu pro OPTET156

POROVNÁVANÉ VARIANTY	p HODNOTA
B-A	0,04
C-A	0,03.10⁻²
D-A	0,00
E-A	0,00
F-A	0,00
G-A	0,00
C-B	0,45
D-B	0,02.10⁻⁴
E-B	0,03.10⁻³
F-B	0,00
G-B	0,00
D-C	0,02.10⁻²
E-C	0,04.10⁻¹
F-C	0,01.10⁻⁴
G-C	0,01.10⁻⁵
E-D	0,79
F-D	0,44
G-D	0,05
F-E	0,02
G-E	0,01.10⁻¹
G-F	0,89

Obrázek 26: Krabicový diagram Tukeyho testu pro OPTET156



Výsledkem laboratorně kontrolovaného ošetření semen byl statisticky prokázán vliv tepelného ošetření na množství DNA, která byla snadněji amplifikována pomocí markeru s menší velikostí amplifikovaného fragmentu (OPTET156).

5.4 qPCR pro validační fázi

Parametry průběhu reakcí stanovené na základě kalibračních křivek zobrazuje Tab. 18. Kalibrační křivka amplifikace s markerem OPTET065 měla hodnotu sklonu -2,99, která leží mimo interval pro ideální kalibrační křivku. Amplifikační efektivita překročila doporučenou hranici 110 %. U markeru OPTET156 měla křivka sklon -3,46, která náleží do intervalu sklonu pro ideální křivku. Amplifikační efektivita s hodnotou 94,6 % splňuje doporučenou hodnotu.

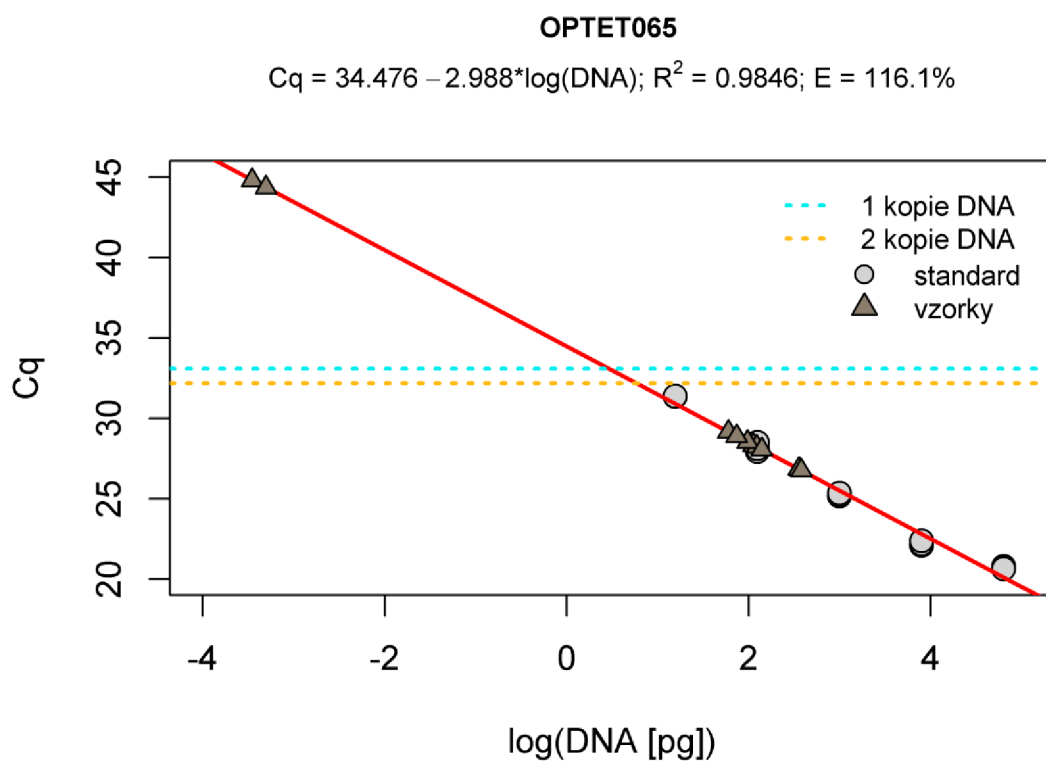
Tabulka 18: Parametry průběhu qPCR u potravin

PARAMETR	OPTET065	OPTET156
EFEKTIVITA (%)	116,1 %	94,6
R ²	0,98	0,97
SKLON KALIBRAČNÍ PŘÍMKY	-2,99	-3,46

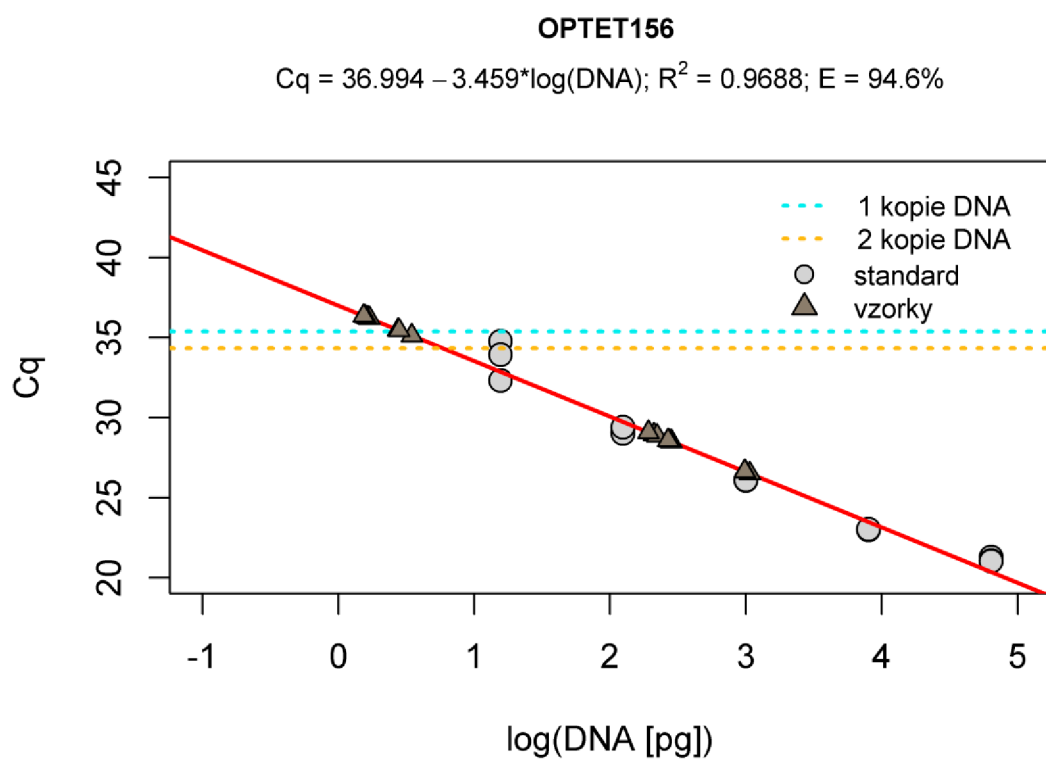
U kalibrační křivky pro OPTET065 se většina vzorků nacházela pod stanoveným limitem detekce (přerušované linie). Dva vzorky se nacházely výrazně nad limitem kolem 45. cyklu a lze je považovat za falešně pozitivní výsledky. Detekované množství logaritmu DNA se u všech vzorků pohybovalo kolem hodnoty 2. Kalibrační křivka s odhadovanými koncentracemi vzorků je zobrazena na Obr. 27.

U kalibrační křivky pro OPTET156 se vzorky nacházely pod stanoveným limitem detekce. Marker detekoval větší rozsah hodnot množství logaritmu DNA, který se nacházel mezi hodnotami 2 až 3. Hodnota C_q se u těchto vzorků pohybovala kolem 25 až 30 cykly. V blízkosti limitu detekce se nacházely vzorky s hodnotou logaritmu DNA mezi 0,5 až 0. Kalibrační křivku s odhadovanými koncentracemi vzorků zobrazuje Obr. 28.

Obrázek 27: Výsledek qPCR pro OPTET065 u vzorků potravin



Obrázek 28: Výsledek qPCR pro OPTET156 u vzorků potravin



6 Diskuze

Zásadním krokem při vývoji spolehlivé metody s použitím molekulárních markerů je kvalitně provedená izolace, což potvrzuje několik autorů (Sangwan et al. 2000; Kaňuková et al. 2020), kteří se zabývali izolací DNA z máku setého (*Papaver somniferum* L.). V rámci této práce byl využíván komerční kit, konkrétně DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Německo), pomocí kterého byla provedena izolace DNA ze tří různých vzorků.

První skupinou vzorků byly mladé listy potravinářského máku. U mladých, rychle rostoucích a zdravých rostlinných pletiv je provedení izolace nejefektivnější, jelikož mají větší počet buněk a ukládají méně škrobu a metabolitů (Varma et al. 2007). U vzorků tohoto typu je očekávána vysoká výtěžnost DNA, a proto byly využity při optimalizační a testovací fázi experimentu. Na základě spektrofotometrického ověření bylo zjištěno, že u mladých rostlin izolace poskytla DNA vyhovující kvality.

Druhou skupinu vzorků tvořila tepelně ošetřená semena, u kterých je provedení izolace značně složitější než u mladých rostlin. Olejnatá semena jsou bohatá na obsah lipidů, které zabraňují působení rozpouštědel. Dle autora Sangwan et al. (2000) lze postup izolace olejnatých semen modifikovat vyextrahováním lipidů před zahájením izolace, což zabrání vytvoření tukové vrstvy nad homogenátem, která ztěžuje odebrání supernatantu. Navíc semena máku obsahují sekundární metabolity, které spolu s DNA tvoří komplexní sloučeniny. Obtížné provedení izolace u semen máku potvrzuje i studie autorů Kaňuková et al. (2020). Kromě těchto faktorů byla výtěžnost DNA ze semen ovlivněna různými stupni tepelného ošetření. Kvalitní DNA poskytovaly vzorky ošetřené v mikrovlnné troubě, v autoklávu při 121 °C a v horkovzdušné troubě při 150 °C. U vyšších teplot byla kvalita izolované DNA nižší.

Třetí skupinou byly vzorky potravin. Izolace DNA z potravinové matrice je složitá, neboť obsahuje množství jiných složek, které ovlivňují výtěžnost DNA a mohou zapříčinit její degradaci a fragmentaci. Výtěžnost kvalitní DNA u potravin klesá s mírou zpracování (Peano et al. 2004; Smith et al. 2005) a s přítomností jiných nukleových kyselin v matrici potravin (Lipp et al. 2005).

U vzorků analyzovaných v této práci (P1 - P7) byla při výrobě použita pšeničná mouka, žitná mouka, ječná sladová mouka, sójová mouka a bramborový škrob. Kromě toho mohou obsahovat stopová množství ořechů, lněného semínka, sezamu nebo kmínu. Všechny tyto složky mohou mít vliv na kvalitu izolované DNA. Po spektrofotometrickém měření kvality bylo zjištěno, že kvalita izolované DNA z potravin nedosahovala doporučených hodnot.

Izolační metoda byla vzhledem ke složité povaze vzorků účinná a poskytovala kvalitní DNA, ovšem dle výsledků u laboratorně ošetřených semen lze usuzovat, že její účinnost klesala s narůstajícími teplotami ošetření. Teploty ošetření vyšší než 200 °C byly pro izolaci kvalitní DNA problematické, což platilo také u použitých vzorků potravin, které bývají při těchto teplotách zpracovávány. Vliv zpracování potravin na degradaci a zhoršenou detekci DNA potvrzuje množství studií (Bauer et al. 2003; Masataka et al. 2004; Peano et al. 2004; Chapela et al. 2007; Hrnčířová et al. 2008).

DNA ze všech zmíněných druhů vzorku byla využívána k amplifikaci v různých fázích experimentu této práce. Po ověření specifity markerů pomocí PCR v reálném čase byla DNA z ošetřených semen a potravin amplifikována s použitím primerů lemujících dva mikrosatelitní lokusy s odlišnou délkou fragmentu (~225 bp a ~135 bp). Delší lokus (OPTET065) byl účinně amplifikován v DNA izolované z mladých listů a ze semen ošetřených teplotami do 150 °C. V souladu s teoretickým předpokladem se u DNA izolované ze semen ošetřených teplotami nad 150 °C účinně amplifikoval pouze kratší mikrosatelitní lokus (OPTET156). V rámci validační fáze byla provedena amplifikace markerů i na reálných vzorcích potravin, která opět potvrdila účinnější amplifikaci kratšího mikrosatelitního lokusu. U vzorku P2 (kaiserka cereální) nebyla úspěšná amplifikace ani pomocí jednoho markeru, čímž byla potvrzena jejich specifita při detekci a kvantifikaci máku u vzorků potravin. Dále bylo prokázáno, že DNA z tepelně zpracovaných a jiných degradovaných rostlinných matric by měla být amplifikována pouze v krátkých sekvencích DNA, protože například pekařské výrobky bývají nejčastěji zpracovávány při teplotách kolem 200 °C (Doveri et al. 2006; Gryson et al. 2010). Strategii analýzy kratších sekvencí využívají i studie zabývající se analýzou DNA z geneticky modifikovaných organismů ve zpracovaných potravinách (Yoshimura et al. 2005). Tato studie zároveň doporučuje analýzu vysoce degradované DNA pomocí PCR v oblastech s vyšším obsahem GC bází, které vykazují větší stabilitu při tepelném zpracování.

Podstatou této práce bylo otestování konkrétních mikrosatelitních markerů na potravinách, ovšem dalším rozvojem této metody lze markery využít při detekci a rozlišování potravinářského a farmaceutického máku. Mák jako potravina je často postižen praktikami falšování, kdy kvalitní mák modré barvy a nasládlé chuti bývá falšován technickým/farmaceutickým mákem (šedočerná barva, bez chuti). Pro stanovení druhového původu se mohou použít chemické rozbory, které ale nejsou schopny identifikovat původ daného kultivaru. Pro tento účel jsou vhodné právě analýzy DNA, jako například PCR v reálném čase.

7 Závěr

Na závěr lze konstatovat, že zvolené cíle práce byly splněny. Shrnutí poznatků plynoucích z práce je uvedeno v následujících bodech:

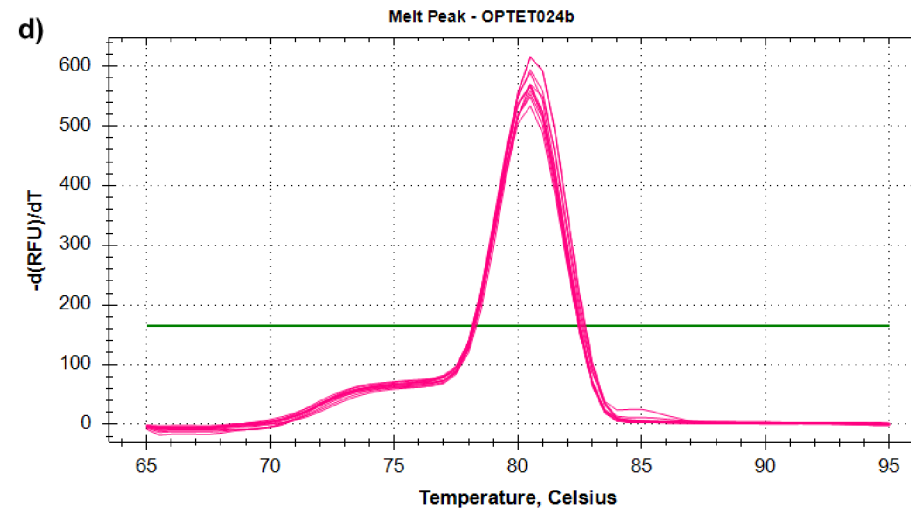
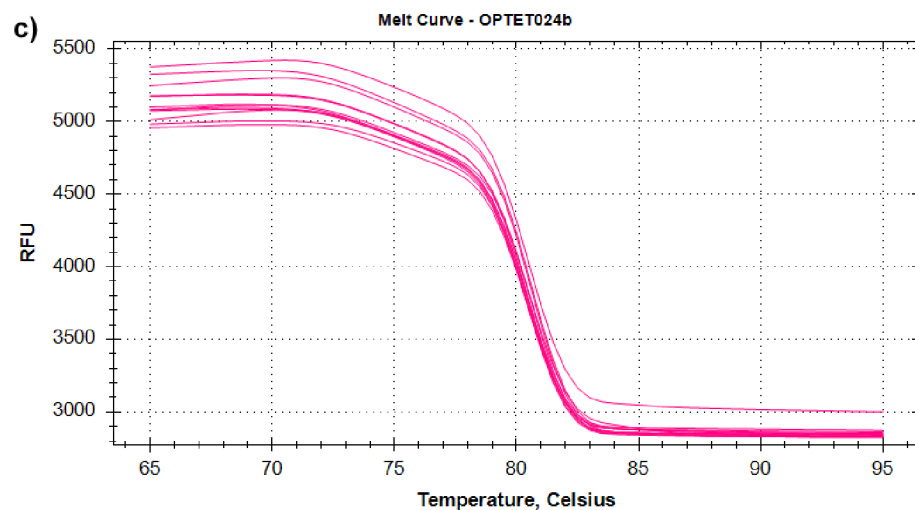
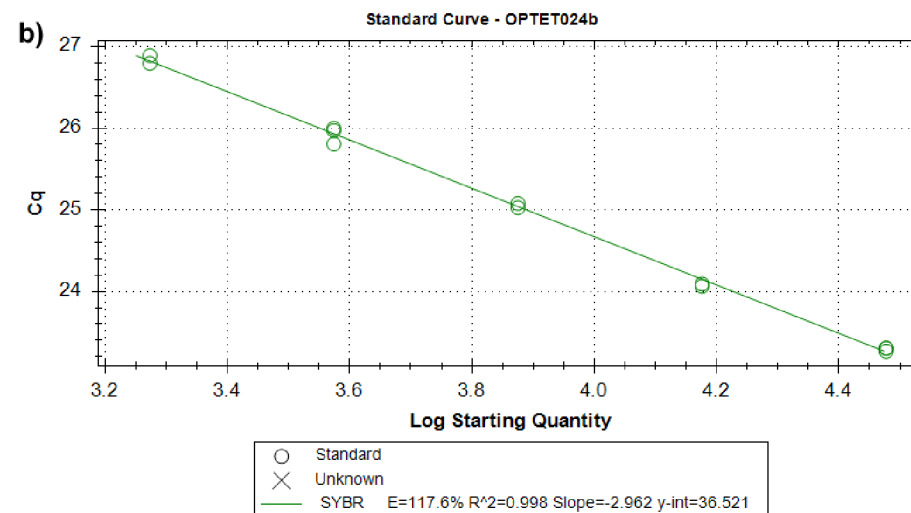
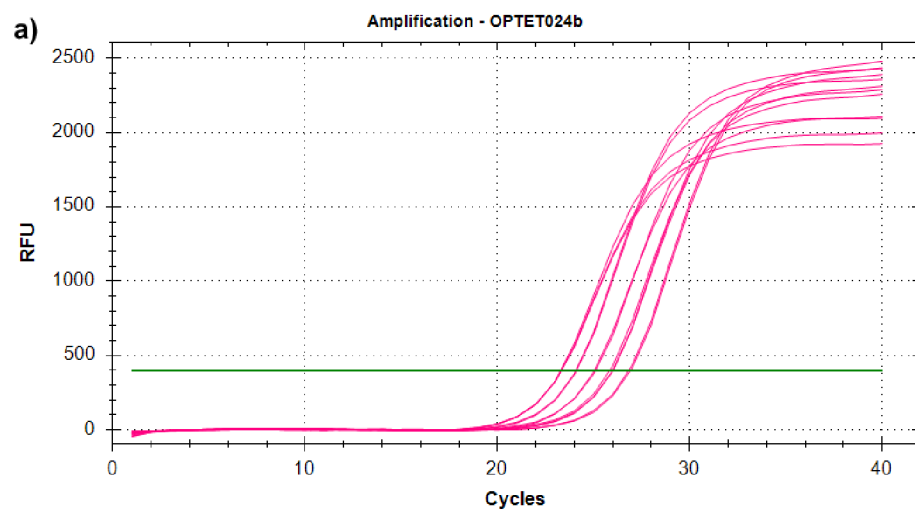
- Na základě kvantitativní PCR v reálném čase byly vybrány dva specifické STR markery pro detekci a kvantifikaci máku v potravinách.
- Byl hodnocen vliv tepelného ošetření na semena potravinářského máku na základě amplifikace dvou vybraných markerů u tepelně ošetřených semen máku.
- Laboratorně kontrolovaný pokus potvrdil hypotézu, že vlivem působení vysokých teplot dochází k degradaci DNA a vzniku fragmentů.
- Pro detekci a kvantifikaci máku v potravině je vhodnější použít marker s menší velikostí amplikonu.
- Vybrané genetické markery jsou specifické a je možné jejich využití při identifikaci a kvantifikaci máku v potravině.

8 Přílohy

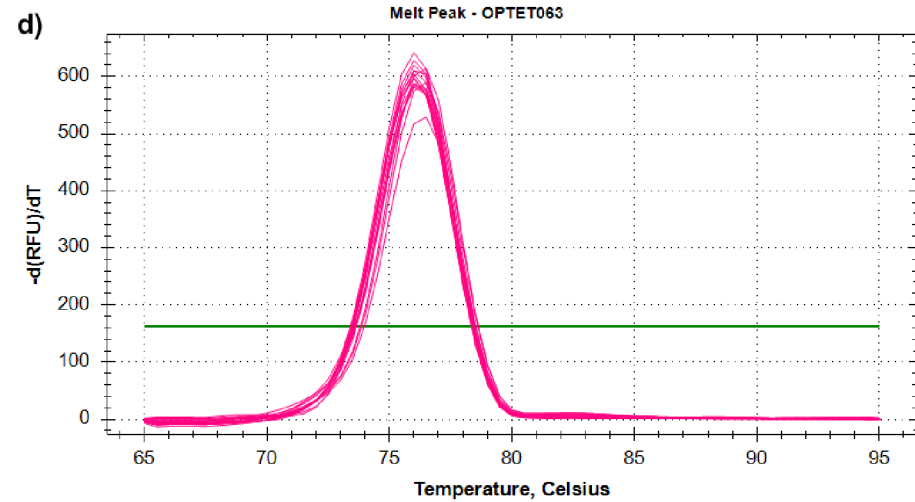
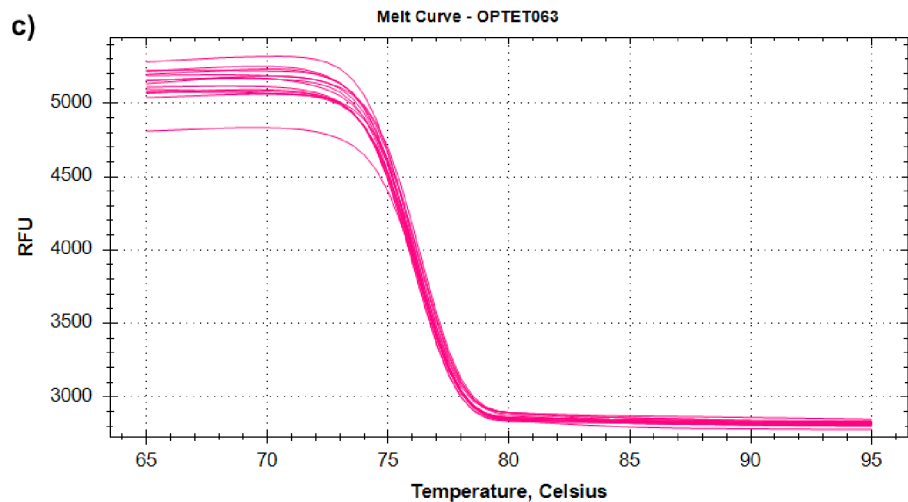
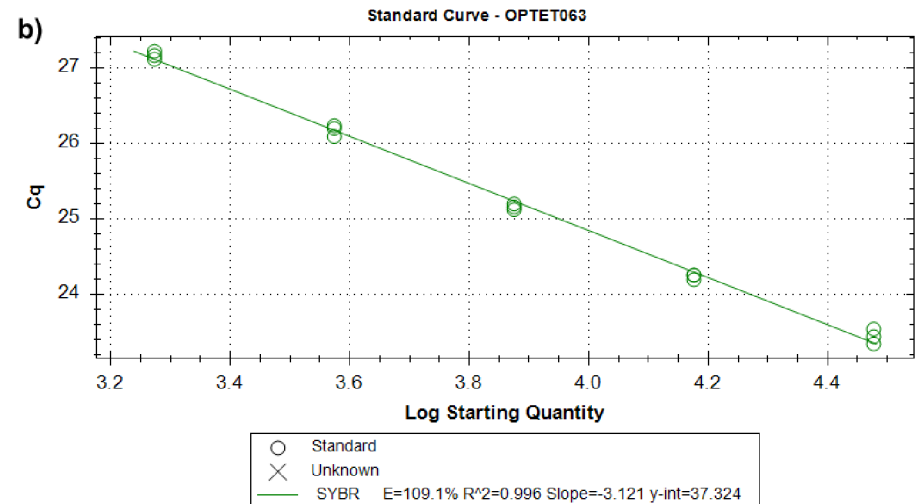
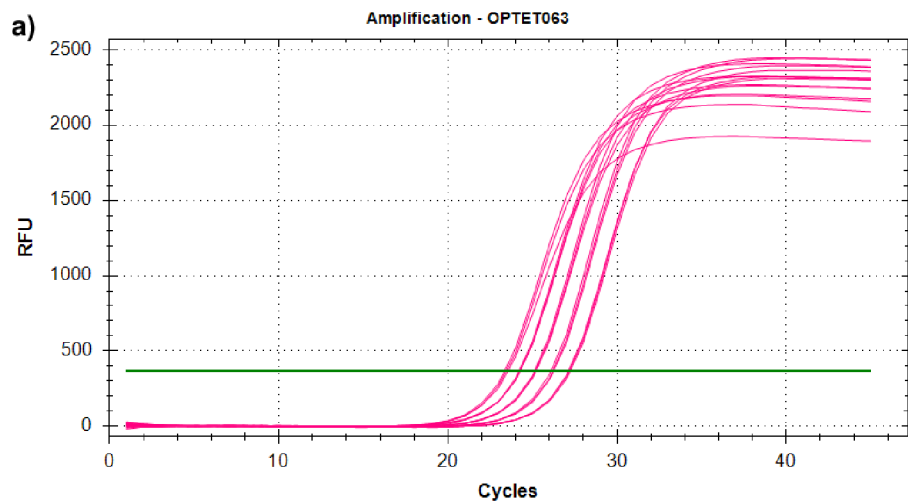
Příloha 1: Postup izolace DNA pomocí DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)

- 1) 100 mg vzorku bylo přeneseno do zkumavek, zmraženo tekutým dusíkem a rozdrceno v třecí misce s tloučkem.
- 2) Do každé zkumavky bylo přidáno 400 μ l pufru AP1 a 4 μ l RNase A (100 mg/ml). Následovalo krátké vortexování.
- 3) Následovala homogenizace na vibrační třepačce a 10 min inkubace v termobloku při 65 °C. Ručním převrácením zkumavky byly vzorky během intubace ještě 2x až 3x homogenizovány.
- 4) Poté bylo do zkumavek přidáno 130 μ l pufru AP2 a vzorky byly vloženy na 5 min do mrazničky.
- 5) Následovala centrifugace při 20 000 x g po dobu 5 minut a supernatant byl přemístěn do 2ml fialových zkumavek s filtrem (QIAshredder Mini spin column) pro zachycení nečistot.
- 6) Vzorky byly centrifugovány při 20 000 x g po dobu 2 minut. Filtrát byl přemístěn do čistých mikrozkušavek.
- 7) Byl přidán 1,5 objemu supernatantu (675 μ l) AW1 pufru s ethanolem.
- 8) Následovalo přepipetování do bílých zkumavek s filtrem (součást kitu) a byly centrifugovány 1 minutu při 6 000 x g. Dna byla navázána na filtr.
- 9) Filtry byly přemístěny do nových zkumavek (součást kitu).
- 10) Následovalo přidání 500 μ l promývacího pufru AW2 s ethanolem a byla provedena centrifugace při 6 000 x g po dobu 1 minuty.
- 11) Filtrát byl přelity do odpadní kádinky a krok 10 byl zopakován.
- 12) Po opětovném vylití filtrátu následovala centrifugace po dobu 2 minut při 20 000 x g.
- 13) Filtry byly přemístěny do čistých zkumavek a bylo přidáno 50 μ l pufru AE předehřátého na 65 °C.
- 14) Následovala inkubace vzorků s pufrům po dobu 5 min v centrifuze za pokojové teploty a poté centrifugace po dobu 1 minuty při 6 000 x g. Tento krok zajišťuje eluci DNA z filtru do pufru.
- 15) Do zkumavek bylo přidáno dalších 50 μ l předehřátého pufru AE a krok 15 byl zopakován. Izolovaná DNA byla zmražena.

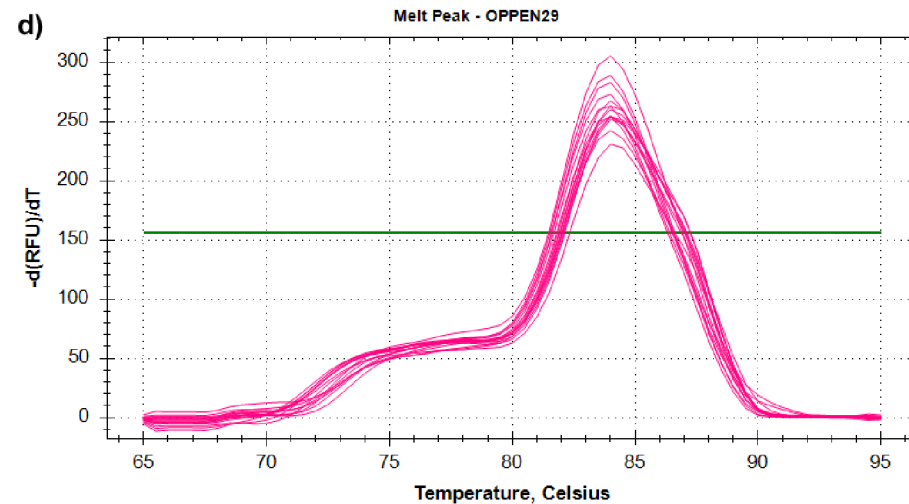
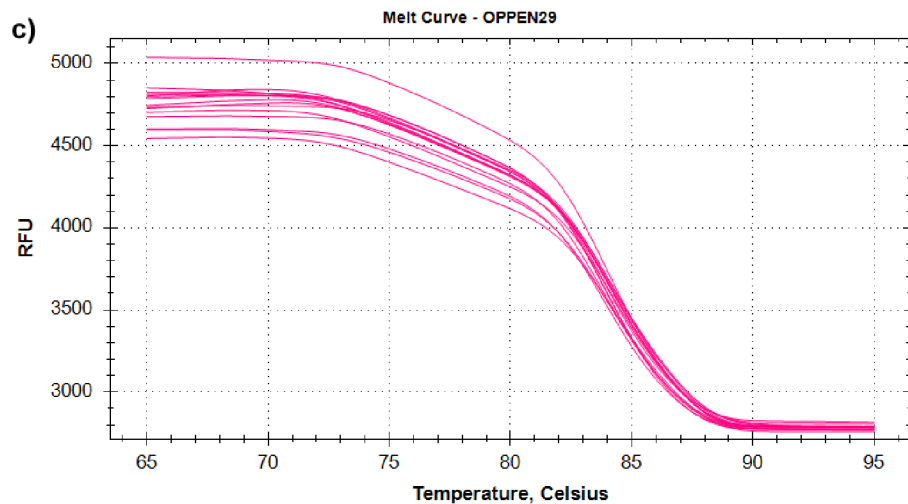
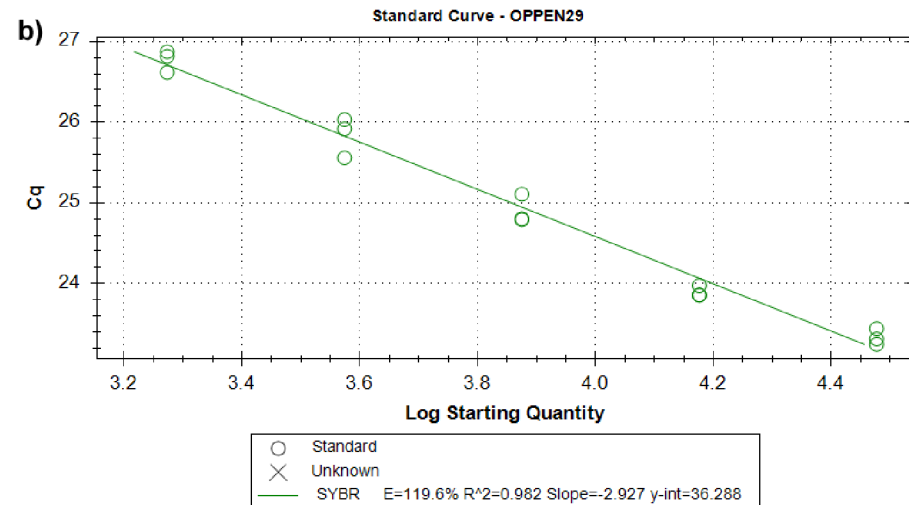
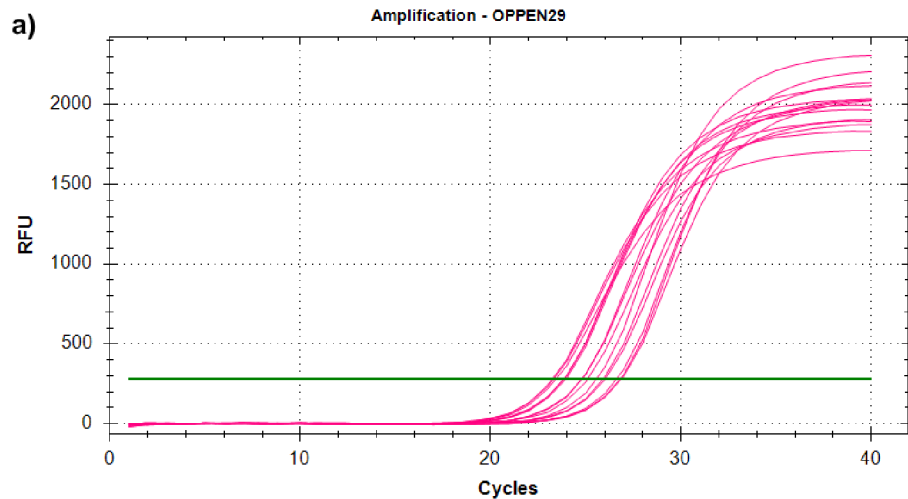
Příloha 2: Výsledky qPCR v optimalizační a testovací fázi u ostatních markerů



Příloha 2 (pokračování): Výsledky qPCR v optimalizační a testovací fázi u ostatních markerů



Příloha 2 (pokračování): Výsledky qPCR v optimalizační a testovací fázi u ostatních markerů



Příloha 3: Hodnoty odhadovaných množství DNA ve vzorcích semen pro OPTET065

ZPŮSOB OŠETŘENÍ	VZOREK	MNOŽSTVÍ DNA (pg)	LOGARITMUS MNOŽSTVÍ DNA
A	CE16	10146,25	4,01
A	CE18	8857,19	3,31
A	CE20	15435,45	3,06
A	CE26	16920,48	1,27
A	CE27	7187,89	2,00
B	CE16	2037,87	0,81
B	CE18	6361,64	0,83
B	CE20	355,25	3,95
B	CE26	1973,53	3,80
B	CE27	1784,91	2,68
C	CE16	1143,54	2,21
C	CE18	476,57	0,90
C	CE20	314,97	0,66
C	CE26	1559,85	4,19
C	CE27	241,79	2, 55
D	CE16	18,80	2,50
D	CE20	4,10	0,61
D	CE26	44,15	1,78
D	CE27	91,75	1,02

Příloha 3 (pokračování): Hodnoty odhadovaných množství DNA ve vzorcích semen pro OPTET065

ZPŮSOB OŠETŘENÍ	VZOREK	MNOŽSTVÍ DNA (pg)	LOGARITMUS MNOŽSTVÍ DNA
E	CE16	98,98	0,18
E	CE18	161,65	4,23
E	CE20	60,05	3,30
E	CE26	57,83	3,19
E	CE27	8,80	1,64
F	CE16	6,39	1,76
F	CE18	7,91	0,61
F	CE20	10,36	0,36
F	CE26	4,11	3,86
G	CE16	6,71	3,25
G	CE18	4,59	2,38
G	CE20	1,53	1,96
G	CE26	2,28	0,94

9 Literatura

- Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics* **5**(2):209–219.
- Bauer T, Weller P, Hammes WP, Hertel C. 2003. The effect of processing parameters on DNA degradation in food. *European Food Research Technology* **217**:338–43
- Bermingham N, Luetlich K. 2003. Polymerase chain reaction and its applications. *Current Diagnostic Pathology* **9**(3):159-164.
- Bio-Rad Laboratories Inc. 2006. *Real-Time PCR Applications Guide*:2–4.
- Brouwer JR, Willemsen R, Oostra BA. 2009. Microsatellite repeat instability and neurological disease. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and development biology* **31**(1):71-83.
- Butler JM. 2012a. DNA Quantitation. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing*:49–67. Academic Press.
- Butler JM. 2012b. Capillary Electrophoresis: Principles and Instrumentation. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing*:141–165. Academic Press. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123745132000063> (accessed March 9, 2022).
- Cai Y, Li X, Lv R, Yang J, Li J, He Y, Pan L. 2014. Quantitative analysis of pork and chicken products by droplet digital PCR. *BioMed Research International* **2014**:810209
- Cao Y, Yu M, Dong G, Chen B, Zhang B. 2020. Digital PCR as an emerging tool for monitoring of microbial biodegradation. *Molecules* **25**(3):706.
- Carlin MG, Dean JR, Ames JM. 2020. Opium alkaloids in harvested and thermally processed poppy seeds. *Frontiers in Chemistry* **8**:737.
- Carolan JC, Hook ILI, Chase MW, Kadereit JW, Hodkinson TR. 2006. Phylogenetics of *Papaver* and related genera based on DNA sequences from ITS nuclear ribosomal DNA and plastid trnL intron and trnL-F intergenic spacers. *Annals of Botany* **98**(1):141–155.

Casado-Hidalgo G, Morante-Zarcelero S, Pérez-Quintanilla D, Sierra I. 2021. Opium alkaloids in food products: Current and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology* **108**:92–102.

Český modrý mák. 2020. Druhy máku. Available from <https://ceskymodrymak.cz/cs/mak/druhy-maku> (accessed March 2022).

Český modrý mák. 2020. Legislativa v ČR. Available from <https://ceskymodrymak.cz/cs/mak-jako-komodita/legislativa-mak> (accessed March 2022).

D'Angelo S, Motti ML, Meccariello R. 2020. ω -3 and ω -6 Polyunsaturated Fatty Acids, Obesity and Cancer. *Nutrients* **12**(9):2751

Doveri S, O'Sullivan DM, Lee D. 2006. Non-concordance between genetic profiles of olive oil and fruit: A cautionary note to use of DNA markers for provenance testing. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **54**(24): 9221-9226

Downey N. 2014. Interpreting melt curves: An indicator, not a diagnosis. Available from <https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/interpreting-melt-curves-an-indicator-not-a-diagnosis> (accessed February 2022)

Eckert KA, Hile SE. 2009. Every microsatellite is different: Intrinsic DNA features dictate mutagenesis of common microsatellites present in the human genome. *Molecular carcinogenesis* **48**(4):379-388

Elkins KM. 2013. *Forensic DNA Biology: a laboratory manual*. Academic Press.

Ellegren H. 2004. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nature reviews Genetics* **5**(6):435-445.

Fialová E, Zdeňková K, Jablonská E, Demnerová K, Ovesná J. 2019. Digitální PCR: Princip a aplikace. *Chemické listy* **113**(9):545–552.

Gariyban L, Avashia N. 2013. Polymerase chain reaction. *The Journal of Investigative Dermatology* **133**(3):1–4.

Gryson N. 2010. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: A review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **396**(6):2003–2022.

- Hrnčířová Z, Bergerová E, Siekel P. 2008. Effects of technological treatment on DNA degradation in selected food matrices of plant origin. *Journal of Food and Nutrition Research* 47:23–8.
- Huang QY, Xu FH, Shen H, Deng HY, Liu YJ, Liu YZ, Li JL, Recker RR, Deng HW. 2002. Mutation patterns at dinucleotide microsatellite loci in humans. *Page American Journal of Human Genetics*. 70(3):625-634.
- Chapela MJ, Sotelo CG, Pérez-Martín RI, Pardo MA, Pérez-Villareal B, Gilardi P. 2007. Comparison of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for species identification. *Food Control* 18:1211–5
- Iwobi A, Huber I, Busch U. 2012. The Application of PCR-Based Methods in Food Control Agencies-A Review, INTECH Open Access Publisher. Available from <http://www.intechopen.com/books/howtoreference/polymerase-chain-reaction/theapplication-of-pcr-based-methods-in-food-control-agencies-a-review> (accessed February 2022)
- Kaňuková Š, Mrkvová M, Mihálik D, Kraic J. 2020. Procedures for DNA extraction from opium poppy (*Papaver Somniferum* L.) and poppy seed-containing products. *Foods* 9(10):1429.
- Knutsen HK, Alexander J, Barregard L, Bignami M, Bruschiweiler B, Ceccatelli S, Cottrill B et al. 2018. Update of the Scientific Opinion on opium alkaloids in poppy seeds. *EFSA Journal* 16(5) (e05243) DOI: 10.2903/j.efsa.2018.5243.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27(2-3):95–125.
- Labanca F, Ovesnà J, Milella L. 2018. *Papaver somniferum* L. taxonomy, uses and new insight in poppy alkaloid pathways. *Phytochemistry Reviews* 17(4):853–871.
- LabGuide. 2019. Kvalitativní real-time PCR. Available from <https://labguide.cz> (accessed January 2022).

- Lahiri R, Lal RK, Sarkar S, Kumar D, Dubey BK, Shukla S, Singh S. 2017. Genetics of alkaloids in poppy straw with other morphological traits in opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* **7**:74–83.
- Li H, Zhai Z, Liu G, Tang T, Lin Z, Zheng M, Qin A, Dai K. 2013. Sanguinarine inhibits osteoclast formation and bone resorption via suppressing RANKL-induced activation of NF- κ B and ERK signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **430**(3):951–956.
- Lipp M, Shillito R, Giroux R, Spiegelhalter F, Charlton S, Pinero D, Song P. 2005. Polymerase chain reaction technology as analytical tool in agricultural biotechnology. *Journal of AOAC International* **88**(1):136–155.
- Macherey N. 2019. "NucleoSpin® Food." Available from <https://www.mn-net.com> (accessed March 2022)
- Makovnyka JGA. 2020. Opium Poppy Agriculture and Consumption. *The Arbutus Review* **11**(2):91–101.
- Masataka U, Tomohiro N, Katsumi T. 2004. Thermostability of DNA from wheat in heated products. *Food Preservation Science* **30**:195–8.
- Ministerstvo zemědělství. 2020. Zprávy z ministerstva zemědělství. Available from <http://ceskymodrymak.cz/> (accessed March 2021)
- Němcová I, Čermáková L, Rychlovský P. 1997. *Spektrometrické analytické metody*. Praha: Karolinum.
- Nocker A, Camper A. 2006. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(3):1997-2004
- Oliveira J, Gomes Pádua J, Zucchi MI, Vencovsky R, Lúcia M, Vieira C. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* **29**(2):293-307.
- Özcan M, Atalay Ç. 2006. Determination of seed and oil properties of some poppy (*Papaver somniferum* L.) varieties. *Grasas Y Aceites* **57**:169-174.

Parlament České republiky. 1997. Zákon ze dne 24. dubna 1997 o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů. Pages 2178-2188 in Sběrka zákonů České republiky, 1997, částka 38. Česká republika

Peano C, Samson MC, Palmieri L, Gulli M, Marmiroli N. 2004. Qualitative and quantitative evaluation of the genomic DNA extracted from GMO and non-GMO foodstuffs with four different extraction methods. *Journal of agricultural and food chemistry* **52**(23):6962–6968.

Primrose SB, Twyman RM. 2006. *Principles of Gene Manipulation and Genomics* 7th Edition. Blackwell Publishing, Oxford.

Quan PL, Sauzade M, Brouzes E. 2018, April 20. DPCR: A technology review. *Sensors* **18**(4):1271.

R Core Team. 2022. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available from <https://www.R-project.org/>.

Rahmanian-Devin P, Baradaran Rahimi V, Jaafari MR, Golmohammadzadeh S, Sanei-Far Z, Askari VR. 2021. Noscapine, an Emerging Medication for Different Diseases: A Mechanistic Review. *Evidence-based complementary and alternative medicine* **2021**:8402517.

Salihah NT, Hossain MM, Lubis H, Ahmed MU. 2016. Trends and advances in food analysis by real-time polymerase chain reaction. *Journal of food science and technology* **53**(5):2196-2209.

Sangwan RS, Yadav US, Sangwan NS. 2000. Isolation of genomic DNA from defatted oil seed residue of opium poppy (*Papaver somniferum*). *Plant molecular biology reporter* **18**:265–270.

Senila L, Neag E, Cadar O, Kovacs MH, Becze A, Senila M. 2020. Chemical, nutritional and antioxidant characteristics of different food seeds. *Applied Sciences* **10**(5):1589.

Smith DS, Maxwell PW, De Boer SH. Comparison of several methods for the extraction of DNA from potatoes and potato-derived products. *Journal of agricultural and food chemistry* **53**(26):9848–9859.

StatSoft, Inc. 2013. STATISTICA (data analysis software system), version 12. Available from www.statsoft.com.

Šmarda J, Doškař J, Pantůček R, Růžičková V, Koptíková J. 2005. *Metody molekulární biologie*, 1. vydání. Masarykova univerzita, Brno.

Tétényi P. 1997. Opium Poppy (*Papaver somniferum*): Botany and Horticulture. *Horticultural Reviews* **19**:373-408.

Valones MA, Guimarães RL, Brandão LA, de Souza PR, de Albuquerque Tavares Carvalho A, Crovela S. 2009. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Brazilian Journal of Microbiology* **40**(1):1–11.

Varma A, Padh H, Shrivastava N. 2007. Plant genomic DNA isolation: An art or a science. *Biotechnology journal* **2**(3):386–392.

Vašek, J., Čilová, D., Melounová, M., Svoboda, P., Zdeňková, K., Čermáková, E., & Ovesná, J. (2021). OpiumPlex is a novel microsatellite system for profiling opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *Scientific reports*, **11**(1), 1-15.

Vieira MLC, Santini L, Diniz AL, Munhoz C de F. 2016. Microsatellite markers: What they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology* **39**(3):312-328.

Wang Y, Prosen DE, Mei L, Sullivan JC, Finney M, vander Horn PB. 2004. A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance in vitro. *Nucleic Acids Research* **32**:1197–1207.

Yadav G. 2015. SSO7D fusion polymerase: A review of what it is and how it helps PCR. Available from <https://www.bioradiations.com/so-how-can-the-ss07d-fusion-polymerase-technology-help-your-pcr/> (accessed March 2022).

Yoshimura T, Kuribara H, Matsuoka T, Kodama T, Iida M, Watanabe T, Akiyama H, Maitani T, Furui S, Hino A. 2005. Applicability of the quantification of genetically

modified organisms to foods processed from maize and soy. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **53**(5):2052–2059.

10 Seznam tabulek

Tabulka 1: Rozdělení rodu Papaver do sekcí (Carolan et al. 2006).....	12
Tabulka 2: Analyzovaná semena	31
Tabulka 3: Analyzované potraviny	31
Tabulka 4: Způsoby ošetření a přípravy semen máku	32
Tabulka 5: Reakční směs pro ddPCR.....	35
Tabulka 6: Teplotní cyklus pro ddPCR.....	35
Tabulka 7: Složení reakční směsi pro qPCR.....	37
Tabulka 8: Teplotní cyklus pro qPCR.....	38
Tabulka 9: Sekvence vybraných primerů.....	39
Tabulka 10: Hodnoty koncentrací a poměru absorbancí u DNA ze vzorků potravin.....	41
Tabulka 11: Hodnoty koncentrací a poměru absorbancí u DNA ze semen	42
Tabulka 12: Parametry průběhu reakce u testovaných markerů	43
Tabulka 13: Parametry kalibračních křivek u markerů OPTET065 a OPTET156	46
Tabulka 14: Výsledky testů explorační analýzy	49
Tabulka 15: Výsledky F-testu	50
Tabulka 16: Výsledky Tukeyho testu pro OPTET065	
Tabulka 17: Výsledky Tukeyho testu pro OPTET156.....	51
Tabulka 18: Parametry průběhu qPCR u potravin	53

11 Seznam obrázků

Obrázek 1: Mák setý (<i>Papaver somniferum</i> L.)	11
Obrázek 2: Nařezané tobolky s vytékajícím latexem	13
Obrázek 3: Modrá semena potravinářského máku	14
Obrázek 4: Znázornění denaturace.....	19
Obrázek 5: Znázornění hybridizace	20
Obrázek 6: Znázornění extenze.....	20
Obrázek 7: Průběh PCR	21
Obrázek 8: Detekce produktů PCR na agarózovém gelu	21
Obrázek 9: Navázané interkalační barvivo na dsDNA	23
Obrázek 10: TaqMan sonda	23
Obrázek 11: Amplifikační křivka	24
Obrázek 12: Absolutní kvantifikace.....	25
Obrázek 13: Analýza křivky tání	26
Obrázek 14: Princip digitální PCR	28
Obrázek 15: Rozdělení reakční směsi na kapičky	29
Obrázek 16: S-111107 NanoPhotometer (Implen).....	34
Obrázek 17: PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad).....	36
Obrázek 18: T100 Thermal Cycler (Bio-Rad).....	36
Obrázek 19: CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System	38
Obrázek 20: Výsledek qPCR pro marker OPTET065 v testovací a optimalizační fázi.....	44
Obrázek 21: Výsledek qPCR pro marker OPTET156 v testovací a optimalizační fázi.....	45
Obrázek 22: Výsledek qPCR pro experimentální fázi u OPTET065 a OPTET156.....	47
Obrázek 23: Krabicový diagram pro OPTET065	48
Obrázek 24: Krabicový diagram pro OPTET156	49
Obrázek 25: Krabicový diagram Tukeyho testu	50
Obrázek 26: Krabicový diagram Tukeyho testu pro OPTET156.....	52
Obrázek 27: Výsledek qPCR pro OPTET065 u vzorků potravin	54
Obrázek 28: Výsledek qPCR pro OPTET156 u vzorků potravin	54