



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNologiÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# DETEKCE VYBRANÝCH DRUHŮ OVOCE V POTRAVINÁCH ROSTLINNÉHO PŮVODU POMOCÍ INSTRUMENTÁLNÍCH A MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÝCH METOD

DETECTION OF SELECTED FRUIT SPECIES IN PLANT-BASED FOODSTUFFS THROUGH INSTRUMENTAL  
ANALYSIS AND METHODS OF MOLECULAR BIOLOGY

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Petr Ondruch

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Lenka Fialová

BRNO 2020

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1576/2019 Akademický rok: 2019/20  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student: **Petr Ondruch**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Biotechnologie  
Vedoucí práce: **Ing. Lenka Fialová**

### Název bakalářské práce:

Detekce vybraných druhů ovoce v potravinách rostlinného původu pomocí instrumentálních a molekulárně biologických metod


### Zadání bakalářské práce:

1. Příprava modelových ovocných výrobků
2. Analýza modelových i reálných ovocných výrobků vybranými instrumentálními a molekulárně-biologickými metodami
3. Vzájemné srovnání výsledků instrumentálních a molekulárně biologických analýz

### Termín odevzdání bakalářské práce: 22. 5. 2020

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

  
-----  
Petr Ondruch  
Student

  
-----  
Ing. Lenka Fialová  
Vedoucí práce

  
-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31. 1. 2020

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

## **ABSTRAKT**

Potraviny se často stávají předmětem falšování, výjimkou nejsou ani ovocné výrobky obsahující jahody. Tato práce se zabývá detekcí jahod v modelových a reálných ovocných výrobcích, aby mohlo být i případné falšování odhaleno.

Cílem práce byla příprava modelových a reálných ovocných výrobků, jejich analýza pomocí vybraných instrumentálních a molekulárně-biologických metod a vzájemné srovnání výsledků těchto metod.

Za tímto účelem byly připraveny modelové a zakoupeny komerční směsi ovocných výrobků. Pomocí UV-VIS spektrofotometrie u nich byl stanoven obsah polyfenolů a flavonoidů, které byly podrobněji charakterizovány pomocí HPLC. Z ovocných pyré byla vyizolována DNA. Pomocí vhodných primerů byla potvrzena případná amplifikovatelnost a tvorba produktu specifického pro jahodu. Tento produkt byl ověřen elektroforetickou kontrolou. V instrumentální části byly pomocí extrakce a HPLC u modelových a komerčních směsí detekovány určité látky. U vybraných látek bylo stanoveno i jejich množství. Nejnižší množství jahodové DNA, které bylo možné pomocí vybraných primerů u metody PCR detekovat, činilo 0,7 ng/μl, u komerčních směsí se tuto DNA detekovat nepodařilo. U metody HPLC se při zaměření na určitý fingerprint a množství pelargonidin-3-glukosidu ve vzorcích podařilo detekovat jahodu ve všech vzorcích. Za vhodnější se v tomto případě dá považovat instrumentální metoda.

## **ABSTRACT**

Food is often subject to adulteration, including fruit products containing strawberries. This work deals with the detection of strawberries in model and real fruit products, so that possible falsification can be detected.

The aim of the work was the preparation of model and real fruit products, their analysis using selected instrumental and molecular-biological methods and mutual comparison of the results of these methods.

Model mixtures of fruit products were prepared and commercial ones were purchased. The content of polyphenols and flavonoids was determined by UV-VIS spectrophotometry, which were characterized in more detail by HPLC. DNA was isolated from the fruit purees, suitable primers confirmed the amplifiability and formation of a specific product for strawberry, and this product was verified by electrophoretic control. In the instrumental part, certain substances were detected by extraction from model and commercial mixtures and the HPLC method, and the amount of selected substances was determined. The lowest amount of strawberry DNA that could be detected by selected primers in the PCR method was 0.7 ng /μl, in commercial mixtures this DNA could not be detected. In the HPLC method, the strawberry was detected in all samples by focusing on a particular fingerprint and the amount of pelargonidin-3-glucoside in the samples. The instrumental method can be considered more suitable in this case.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Ovocné pyré, Ovoce, Jahoda, Falšování potravin, Izolace DNA, qPCR, HPLC

## **KEY WORD**

Fruit puree, Fruit, Strawberry, Food adulteration, DNA isolation, qPCR, HPLC

ONDRUCH, Petr. *Detekce vybraných druhů ovoce v potravinách rostlinného původu pomocí instrumentálních a molekulárně biologických metod* [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-07-29]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/124175>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Lenka Fialová.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tímto bych chtěl poděkovat vedoucí své práce, Ing. Lence Fialové za vedení, ochotu, trpělivost a pevné nervy. Mé díky patří taky Josefu Salátovi.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>8</b>
2.1	FALŠOVÁNÍ POTRAVIN.....	8
2.1.1	Metody falšování.....	8
2.1.2	Metody detekce falšování.....	8
2.2	JAHODNÍK ( <i>FRAGARIA L.</i> ) .....	8
2.2.1	Odrůdy jahodníku.....	9
2.2.2	Chemické složení jahod .....	9
2.2.3	Využití jahod .....	10
2.3	ROSTLINNÁ BUŇKA .....	10
2.3.1	Struktura rostlinné buňky .....	10
2.3.2	Cytologie .....	11
2.4	IZOLACE A PURIFIKACE DNA .....	12
2.4.1	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA .....	13
2.5	POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE .....	14
2.5.1	Komponenty pro PCR .....	15
2.5.2	Cyclery .....	16
2.6	POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE V REÁLNÉM ČASE.....	16
2.6.1	Kvantifikace .....	17
2.7	VYSOKOROZLIŠOVACÍ ANALÝZA KŘIVEK TÁNÍ.....	17
2.8	ELEKTROFORÉZA .....	17
2.8.1	Gelová elektroforéza .....	17
2.9	CHROMATOGRAFIE.....	18
2.9.1	Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	18
<b>3</b>	<b>CÍL PRÁCE</b> .....	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>21</b>
4.1	MATERIÁL.....	21
4.1.1	Analyzované výrobky obsahující jahody .....	21
4.1.2	Ovocný materiál .....	21
4.1.3	Chemikálie .....	21
4.1.4	Roztoky .....	22
4.1.5	Přístroje a pomůcky.....	22
4.2	PRACOVNÍ POSTUPY .....	23
4.2.1	Příprava modelových a komerčních směsí.....	23
4.2.2	Izolace DNA z rostlinného materiálu.....	23
4.2.3	Měření koncentrace a čistoty DNA .....	24
4.2.4	Polymerázová řetězová reakce .....	24
4.2.5	Detekce PCR produktů pomocí agarózové gelové elektroforézy .....	25
4.2.6	Stanovení celkových polyfenolů a flavonoidů spektrofotometricky.....	26
4.2.7	Stanovení fenolických látek pomocí HPLC .....	26

<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>28</b>
5.1	MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÉ METODY .....	28
5.1.1	Izolace DNA z jahod .....	28
5.1.2	Ověření amplifikovatelnosti DNA .....	28
5.1.3	Stanovení citlivosti PCR a výběr vhodných primerů .....	30
5.1.4	Izolace DNA z modelových a komerčních ovocných pyré .....	39
5.1.5	Ověření amplifikovatelnosti DNA, primery ITS2 .....	39
5.1.6	Průkaz jahodové složky v ovocných pyré pomocí druhově specifických primerů .....	41
5.2	STANOVENÍ OBSAHU CELKOVÝCH POLYFENOLŮ A FLAVONOIDŮ .....	45
5.3	HPLC .....	46
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....</b>	<b>50</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....</b>	<b>53</b>
<b>9</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>54</b>
9.1	CHROMATOGRAMY .....	54

# 1 ÚVOD

Jahody patří celosvětově mezi populární ovoce, díky své chuti i vysokému obsahu vitamínu C a dalších zdraví prospěšných látek. První zmínky o sběru jahod sahají až do doby kamenné. Kromě čerstvého stavu jsou jahody na trhu široce zastoupeny v řadě produktů jako jsou marmelády, džemy, ovocné šťávy apod. Tyto produkty bývají často objektem falšování, jelikož jahody patří k dražšímu ovoci. K detekci falšování potravin slouží řada metod. U ovoce bohatého na polyfenoly, jako jsou jahody, patří k nejrozšířenějším chromatografické metody. Jenže i ony mají určité nevýhody, které metody založení na analýze DNA postrádají (nákladná údržba, velké množství organických látek, nízká citlivost pro některé látky, komplexita, složitý vývoj nových metod). Proto stojí za to hledat molekulárně-biologické postupy pro detekci falšování výrobků z jahod i jiného červeného ovoce. [1, 2]

Na druhou stranu i molekulárně-biologické metody skýtají řadu nevýhod. Metoda PCR má tak vysokou citlivost, že v případě, kdy je vzorek kontaminovaný, může nastat falešná pozitivní reakce. Některé kontaminující látky naopak PCR inhibují, takže výsledkem může být falešně negativní reakce. Obtížný je i výběr primerů. Molekulárně-biologické metody často bývají nákladné, časově náročné, namáhavé, proto nejsou vždy příhodné pro každou identifikaci.

Cílem této práce byla analýza ovocných výrobků metodou analýzy DNA a metodou HPLC a následné srovnání těchto metod. U metody s analýzou DNA byla nejprve provedena izolace DNA, kontrola její amplifikace a pomocí specifických primerů detekován specifický produkt pro jahodu. Obsah polyfenolů a flavonoidů byl stanoven spektrofotometricky. U metody HPLC bylo cílem najít rozdíly ve fingerprintu jahody a maliny a detekce specifických látek pro jahodu.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Falšování potravin

Falšování potravin je vážným problémem u většiny potravinářských komodit. Ovocné produkty jsou často falšovány, nejčastěji se tak děje u ovocných šťáv. Již v roce 1950 byl v USA případ, kde byl vyráběn nápoj, který neobsahoval skoro žádnou ovocnou složku, přičemž byl označován jako 100% pomerančová šťáva. Produkty jako džusy, džemy, pyré, marmelády bývají falšovány za účelem vyššího finančního zisku nebo konkurenceschopnosti na trhu, např. nahrazením dražšího ovoce levnějším. Falšování vede ke zhoršení kvality těchto produktů a není snadné jej odhalit. Hlavním problémem při analýze je složitost produktů a velká rozmanitost látek specifických pro různé druhy ovoce. [3, 4]

#### 2.1.1 Metody falšování

Mezi hlavní způsoby falšování ovocných výrobků se řadí:

- Naředění šťávy vodou na úkor ovocné složky a doslazení, případné přidání kyselin
- Náhrada dražších druhů ovoce levnějšími
- Nesprávná deklarace způsobu zpracování
- Nesprávné nebo zavádějící označení výrobku [3]

#### 2.1.2 Metody detekce falšování

Na detekci falšování ovocných výrobků se používá řada metod, které mohou být dle principu rozděleny na:

- DNA analýzu, pomocí které se identifikuje druh ovoce a odrůda
- Fingerprinting, profilování a metabolomiku
- Izotopové metody
- Chemické a fyzikální markery autenticity, např. chromatografie a spektroskopické analýzy

Mezi nejčastější markery autenticity, pomocí kterých se odhalí pravost produktu, se řadí hustota, cukry, kyseliny, refraktometrická sušina nebo formolové číslo. Marker typický pro jahody je kyselina isocitronová. [3]

### 2.2 Jahodník (*Fragaria L.*)

Jahodník patří mezi vytrvalé ovocné rostliny, definované jako přechod mezi bylinou a keřem, tzv. polokeř, jehož velikost se pohybuje v řádu několika desítek centimetrů. Rostlina je tvořena listy, odnožemi, květními stvoly, na kterých jsou květy a plody, a dále kořenovou soustavou, která se nachází pod povrchem země. Mezi nadzemní a podzemní částí tvoří předěl kořenový krček. Listy jsou důležitým rozlišovacím znakem odrůd, jsou řapíkaté, mají různou délku (závisí na odrůdě). Květní stonky osázené květy tvoří vrcholičnatá květenství. Jednotlivé květy rozkvétají od obvodu do středu a nasazují plody. Plody vznikají zdužnatěním květnatého lůžka, které dohromady s nažkami vytváří nepravý plod. Plody narůstají do velikosti několika centimetrů, velikost plodu není odrůdovým znakem, je ovlivněna hlavně prostředím. Tvar plodu je také variabilní, může být např. kulatý, srdčitý nebo kuželovitý. Barva plodu je obvykle červená (různé odstíny) a závisí na odrůdě, stupni vyzrání, prostředí atd. [5, 6]



### 2.2.1 Odrůdy jahodníku

Jahodník je plastická rostlina vhodná pro mírné podnebí. Jahodník *Fragaria L.* řadíme do čeledi růžovitých *Rosaceae*, řádu růžovokvětých *Rosales* [7]

Historické zmínky o sběru jahod sahají až do doby kamenné. Roku 1766 byla pomocí cíleného křížení vyšlechtěna první kulturní odrůda velkoplodého jahodníku, tzv. *Fragaria ananassa*, na dvoře francouzského krále Ludvíka XV. Dnes jsou známy již desítky až stovky odrůd jahod po celém světě. [8]

### 2.2.2 Chemické složení jahod

Složení ovoce je ovlivněno jeho zralostí, mezi hlavní složky patří voda, sacharidy, organické kyseliny, v menší míře také lipidy (viz Tabulka 1). Dále jsou v ovoci zastoupeny aromatické látky a pigmenty, které ovlivňují sensorické vlastnosti ovoce, a vitamíny s minerály, které mají nutriční význam. [9]

Voda, nacházející se u plodů z velké části ve vakuolách buněk, je potřebná pro všechny biochemické pochody v ovoci. Vadnutí ovoce a ztráta hmotnosti jsou projevy vysokého výparu vody. [9, 10]

Hlavní složkou jahod jsou sacharidy, které tvoří více než 90 % sušiny. Obsah mono- a oligosacharidů roste v dozrávajícím ovoci díky asimilaci a v menší míře hydrolyzou polysacharidů a je závislý na druhu, odrůdě, zralosti ovoce, velikosti plodů a mnoha dalších faktorech. Hlavními cukry v ovoci jsou glukosa a sacharosa. Glykemický index jahod je okolo 40, což je relativně nízké číslo a znamená to, že konzumace jahod nevede k velkým nárůstům hladiny cukru v krvi, a nejsou nebezpečné pro lidi s cukrovkou. Vlákna a fruktosa může napomáhat k regulaci hladiny cukru utlumením trávení. Vlákna také přispívá ke kontrole příjmu kalorií pomocí jejího saturačního účinku. [9, 11, 12, 13, 14]

Jahody jsou vynikajícím zdrojem biologicky aktivních látek s vysokým obsahem základních živin. Obsahují vysoké množství vitamínu C a fenolických látek, z nichž nejdůležitější jsou antokyany, které spolu s ellagitaniny (hydrolyzovatelné taniny) patří mezi hlavní antioxidační sloučeniny. Při látkové výměně v buňkách jsou vedlejším produktem volné radikály, které jsou potenciálními spouštěči buněčných mutací. Právě antioxidanty dokážou tyto radikály inaktivovat a odstranit z buněk. K dalším antioxidantům patří vitamín A a prvky jako mangan, měď a zinek. Kromě vitamínu C jsou v jahodách také zastoupeny další vitamíny jako je vitamín A, vitamín E, vitamín B6, vitamín K, thiamin, riboflavin a niacin. Mezi hlavní antokyany se řadí pelargonidin-3-glukosid a kyanidin-3-glukosid. Mezi další fenolové sloučeniny obsažené v jahodách se řadí flavonoly, které mají antioxidační, antibakteriální, antihypertenzní a antialergické vlastnosti. Jahody jsou také zdrojem řady esenciálních aminokyselin, které jsou obsažené v semínkách jahod. Mají pro lidské tělo nutriční význam a některé také mohou ovlivnit chuť jahod. [14, 15]

Jahody dále mohou zmírnit záněty, zlepšit cévní funkce, snížit oxidaci LDL cholesterolu. Některé studie také prokázaly potenciální chemopreventivní aktivitu jahod a protirakovinné účinky jahod. [14, 16]

Tabulka 1 [14] Látkové složení jahody

Vybrané látky v jahodách	Obsah
Voda (%)	90,95
Proteiny (%)	0,67
Tuky (%)	0,30
Popel (%)	0,40
Vláknina (%)	2,00
Sacharidy (%)	7,68
Glukosa (%)	1,99
Fruktosa (%)	2,44
Sacharosa (%)	0,47
Vitamin C ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	5,88

Minerální látky se vyskytují jako soli organických a anorganických kyselin. Obsah minerálních látek v ovoci je obvykle 0,6 až 1,8 % a patří mezi ně více než 60 prvků, z nichž hlavní jsou dusík, sodík, vápník, železo, mangan, hliník, fosfor, chlor a síra. Množství draslíku a absence chloridu sodného dávají ovoci dietologickou hodnotu. Jahody patří mezi minerálně bohaté ovoce. [11]

Tabulka 2 [14] Prvky, obsažené v jahodě

Vybrané minerály	Obsah ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )
Ca	160
Fe	4,1
Mg	130
P	240
K	1530
Na	10
Zn	1,40
Cu	0,48
Mn	3,86

### 2.2.3 Využití jahod

Produktů obsahujících jahody je obrovské množství, jahody patří mezi oblíbené, hojně pěstované ovoce. Jahody se využívají např. při výrobě ovocných šťáv, pyré, marmelád, džemů, kompotů, nápojů, sirupů nebo přesnídávek. Dále jsou také součástí řady mléčných výrobků, využívají se v pekařství nebo v kosmetickém průmyslu. [4]

## 2.3 Rostlinná buňka

### 2.3.1 Struktura rostlinné buňky

Rozlišujeme dva základní typy buněk, prokaryotické a eukaryotické. Buňky eukaryotické se vyvinuly z prokaryotických, jsou větší a obsahují řadu membránových systémů. Název

eukaryotických buněk je odvozený od toho, že obsahují pravé jádro, to je odděleno od cytoplazmy jaderným obalem. Jsou rozděleny na kompartmenty a v jejich cytoplazmě se vyskytují organely, z nichž každá má svou specifickou funkci. Díky organelám mají eukaryotické buňky velkou schopnost se diferenciovat a specializovat. Jádro u eukaryotické buňky se dělí pomocí mitózy, oproti replikaci DNA (dělení u prokaryotického jádra) je to velmi složitý proces. [17]

## **2.3.2 Cytologie**

### **2.3.2.1 Vakuola**

Vakuoly představují největší organely u většiny buněk. Vyskytují se v buňkách rostlin a hub. Obvykle zaujímají asi třetinu prostoru buňky, může to však být až 90 procent. Vakuoly slouží jako zásobárna proteinů, které mohou být použity jako zdroj energie pro různé metabolické dráhy, velké vakuoly také obsahují protony a ionty jako  $\text{Ca}^{2+}$ , pomocí kterých může buňka regulovat své pH, aktivitu enzymů a membránové fúze. [18]

### **2.3.2.2 Eukaryotické jádro**

Téměř veškerá genetická informace buňky je obsažena v jejím jádře. Jádro buňku řídí, reguluje její diferenciaci, stárnutí, replikaci a přenos genetické informace do buňky nové. Dále řídí syntézu rRNA a tRNA a jejich následný import do cytoplazmy.

Kolem jádra buňky se nachází jaderný obal s dvojitou membránou, kde vnější membrána přechází v endoplazmatické retikulum. [17, 18]

### **2.3.2.3 Endoplazmatické retikulum**

Endoplazmatické retikulum zaujímá ústřední pozici mezi organelami sekreční dráhy. Je složeno z váčků a cisteren, obklopujících jádro. Endoplazmatické retikulum slouží zejména k syntéze membránových lipidů a proteinů a dále syntéze proteinů, určených na export.

Existují dva typy endoplazmatického retikula, drsné a hladké. Drsné váže na svůj povrch ribozomy, ve kterých poté dochází k syntéze různých proteinů. [17]

### **2.3.2.4 Golgiho aparát**

Golgiho aparát obvykle navazuje na endoplazmatické retikul, jak prostorově, tak funkčně. Je složen z diktyozomů – soubor cisteren, kde každá z nich je samostatným kompartmentem. Tyto cisterny slouží k úpravě, třídění a balení proteinů a lipidů pro sekrece nebo k transportu do jiných organel. [17]

### **2.3.2.5 Mitochondrie**

Spolu s chloroplasty patří mezi semiautonomní organely s vlastní kružnicovou DNA. Pro jejich ribozomy je charakteristická vlastní proteosyntéza, podobná proteosyntéze u bakterií. Mohou se rozmnožovat pouze dělením.

V každé buňce mohou být až stovky mitochondrií. Mitochondrie mají vnější a vnitřní membránu. Vnější membrána je hladká a velmi dobře propustná pro polární látky. Vnitřní membrána tvoří řadu vychlípenin zvaných mitochondriální kristy, nachází se na ní komplexy dýchacího řetězce, ATP syntázy a membránové přenašeče. Uvnitř mitochondrie se nachází matrix s enzymy aerobních metabolických drah. [17]

### **2.3.2.6 Chloroplasty**

Čočkovité organely s vnější membránou propustnou pro polární látky a vnitřní membránou se specifickou propustností, která obklopuje hmotu chloroplastu, tzv. stroma. Stroma obsahuje enzymy katalyzující cukry, dále tylakoidy, jejichž funkcí je zachycení a využití světelné energie. Tylakoidy obsahují enzym ATP syntázu a fotosyntetické pigmenty, mezi které patří např. chlorofyl. [17]

### **2.3.2.7 Cytoplazma**

Je to roztok, složený z částic různé velikosti, které jsou na sebe namačkány tak, že tento roztok vykazuje vlastnosti gelu. Cytoplazma vyplňuje prostor mezi organelami v buňce, odehrává se v ní řada chemických reakcí, které jsou stěžejní pro existenci buňky a její fungování. Probíhá zde velmi důležitá syntéza proteinů a také první kroky při odbourávání molekul potravy. [17]

### **2.3.2.8 Plazmatická membrána**

Plazmatická membrána je biomembrána, která je tvořena dvojitou vrstvou lipidů, do kterých jsou včleněny proteiny. Tato membrána buňku ohraničuje a reguluje transport specifických látek dovnitř a ven z buňky. Tento transport zajišťují membránové proteiny, které fungují jako receptory a umí komunikovat s okolím buňky. [17]

### **2.3.2.9 Buněčná stěna**

Buněčná stěna je tvořena z řady polysacharidů. U rostlinných buněk to je hlavně celulóza, která tvoří dlouhá, nevětvená vlákna, která se navzájem vážou vodíkovými vazbami a dodávají buněčné stěně pevnost. Další složkou buněčné stěny jsou hemicelulózy a pektiny, které udržují v buněčné stěně vodu, a ve zdřevnatělých částech buněčné stěny se nachází lignin, který buněčné stěně poskytuje tvrdost. [17]

## **2.4 Izolace a Purifikace DNA**

Izolace a purifikace nukleových kyselin z buněk a jejich oddělení od zbylých buněčných složek patří do počáteční fáze u většiny molekulárních metod. Účelem purifikace je získání nukleové kyseliny v určitém množství a o určité čistotě, jelikož kvalita izolované DNA je pro úspěšnost navazujících postupů a metod často rozhodující. [19] Výběr metody izolace DNA je ovlivněn faktory, jako je typ hledané DNA, požadovaná kvalita DNA nebo množství a povaha vzorku [20]. Izolaci DNA z rostlinného materiálu komplikuje řada vlastností rostlin, jako je přítomnost pigmentů nebo tuhé buněčné stěny z polysacharidů a neexistuje pro ni žádný univerzální izolační protokol. Dalšími faktory ovlivňující izolaci jsou věk, druh a skladování rostlinné tkáně. [21]

Obecně lze postup izolace DNA charakterizovat třemi základními kroky:

- Odstranění buněčné stěny a membrán kolem vybrané DNA
- Oddělení DNA od ostatních složek v buňce
- Ochrana DNA při izolaci před nukleázami a mechanickým stříhem a její purifikace

DNA se z buňky uvolní narušením buněčné stěny a cytoplazmatické membrány tak, aby nedošlo k fragmentaci DNA mechanickým stříhem. Tento proces ztěžuje přítomnost polysacharidů v buněčné stěně, která je díky nim velmi tuhá. K narušení buněčné stěny se používá řada fyzikálních a chemických disruptčních metod. Lýze buněk probíhá obvykle v přítomnosti kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA), která naváže  $Mg^{2+}$  ionty.  $Mg^{2+}$  ionty

jsou kofaktory DNáz a díky EDTA, která je chelatuje, se zabrání aktivaci DNáz, které by jinak DNA degradovaly. Rostlinné buněčné stěny by měly být ideálně štěpeny působením degradačních enzymů, např. celulóz. Při mechanickém štěpení může dojít k fragmentaci DNA. Rostlinné pletivo může být také rozdrceno v tekutém dusíku nebo rozetřeno v třence [21, 22, 23].

Spolu s DNA se z buňky uvolní řada kontaminantů, jimiž jsou zejména RNA, bílkoviny, polysacharidy, polyfenoly a nejaderná DNA. Zastoupení těchto kontaminantů je u jednotlivých druhů rostlin různé, proto je nutné izolační protokol přizpůsobit právě použitému rostlinnému materiálu. [21]

Kontaminující RNA může být odstraněna pomocí RNázy, která je tepelně ošetřena, aby neobsahovala kontaminující DNázu. [23]

Polysacharidy jsou významným kontaminantem, jelikož se při izolaci chovají podobně jako DNA, jsou inhibitory PCR a obtížně se odstraňují. Při přítomnosti velkého množství polysacharidů, je tkáňový homogenát vysoce viskózní a při spektrofotometrickém stanovení na UV-VIS nadsazují koncentraci DNA. Odstranit nebo snížit kontaminaci DNA polysacharidy lze provést zředěním extraktu DNA nebo opakovaným promytím extrakčním pufrem. Nejčastěji používané jsou pufry, které obsahují cetrimoniumbromid (CTAB). Polysacharidy a DNA mají v CTAB rozdílné rozpustnosti v závislosti na koncentraci chloridu sodného. Při nižších koncentracích je nerozpustná DNA a při vyšších polysacharidy. Úpravou koncentrace soli je možné polysacharidy a DNA odlišně vysrážet a izolovat. [21]

Proteiny, další kontaminanty, je důležité při purifikaci odstranit, jelikož buňky obsahují proteiny, které nukleové kyseliny degradují, nebo se na ně váží. Proteiny mohou být odstraněny pomocí proteáz [19]. Dalším klasickým způsobem pro odstranění proteinů je extrakce směsí fenolu a chloroformu, která je nemísitelná s vodou. Po přidání směsi do vodného prostředí buněčného lyzátu a promíchání dojde k denaturaci proteinů. Po centrifugaci emulze se vytvoří spodní organická fáze a horní vodná fáze, oddělená od fáze organické rozhraním denaturovaného proteinu. Extrakce je opakována do vymizení denaturovaných proteinů na fázovém rozhraní. [23]

Deproteinizovaný preparát může být příliš zředěný a může obsahovat stopy fenolu a chloroformu, které by mohly zapříčinit denaturaci enzymů využívaných v aplikacích DNA, např. DNA polymerázy nebo restriční ekdonukleázy. Proto se deproteinizovaná nukleová kyselina sráží alkoholem, obvykle ethanolem nebo izopropanolem za přítomnosti jednomocných kationtů [19]. DNA se z roztoku nechá vysrážet při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , po centrifugaci je peleta DNA rozpuštěna v pufru s EDTA, který slouží jako ochrana před nukleázami, které jsou přítomny nebo se dovnitř mohou dostat při manipulaci se vzorkem. [23]

Roztoky DNA lze skladovat při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu minimálně jednoho měsíce nebo mohou být zmrazeny. [23]

#### **2.4.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA**

Koncentraci a čistotu izolované DNA můžeme zjistit změřením absorbance v UV části spektra s rozsahem vlnových délek 220–320 nm. [24]

Maximum absorbance DNA je při 260 nm. Při stejné vlnové délce lze také stanovit koncentraci DNA, která je ovšem nadhodnocena obsahem RNA. Hodnota absorbance je

ovlivněna poměrem bází v nukleových kyselinách, proto je doporučeno odstranit RNA srážením při izolaci DNA. Vzorek také může obsahovat zbytky bílkovin, ty mají maximální absorpenci při 280 nm. Z poměru  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  lze zjistit, jestli má vzorek dostatečnou čistotu. Kontaminace RNA lze detekovat zvýšením tohoto poměru a kontaminace proteiny snížením. Čistá dsDNA má poměr  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  1,85 – 1,88, poměr RNA je asi 2,1. Poměr  $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$  je jemný indikátor látek absorbujících při 230 nm. Patří mezi ně chaotropní soli, EDTA, proteiny nebo fenol. Poměr  $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$  nabývá u čisté dsDNA hodnoty asi 1,8. [25, 26]

## 2.5 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce se používá k replikaci nukleových kyselin. Tato technologie má počátky v padesátých letech 20. století, kdy byla objevena první DNA-polymeráza a následně i purifikace tohoto enzymu, jenže moderní technologie PCR byla vyvinuta až v roce 1983. Objev termostabilních polymerázových enzymů stál na počátku revolucionizace PCR a umožnil její automatizaci a vysokou rychlost reakcí [23].

PCR je cyklicky se opakující in vitro enzymatická syntéza a amplifikace specifických sekvencí DNA ve směru 5' → 3' pomocí DNA-polymerázy, napodobující in vivo proces replikace DNA. Začíná amplifikací jedné molekuly dvouvláknové DNA, která se nazývá templátová nebo cílová. Po separaci (denaturaci) cílové sekvence je k templátu navázáno (hybridizováno) několik syntetických oligonukleotidů – primerů. Primery slouží jako výchozí bod pro připojení nukleotidů DNA pomocí DNA-polymeráz. In vitro můžeme tohoto procesu dosáhnout cyklickými změnami teploty, které usnadňují separaci řetězců DNA, hybridizaci primerů a syntézu nových řetězců DNA polymerizací. [19]

Tři základní kroky procesu PCR:

- Denaturace dvouřetězových molekul DNA

Zahřátím, asi na 95 °C, dojde k přerušení vodíkových vazeb, které drží obě vlákna pohromadě. Dvouvláknová DNA se rozdělí na jednovláknovou. Délka denaturace u klasické PCR odpovídá 15–30 sekundám.

- Nasednutí primerů k odděleným řetězcům DNA

Dochází ke snížení teploty, obvykle na 50–60 °C. Tato teplota umožní primerům, aby se navázaly na komplementární sekvence DNA a vytvořily se mezi nimi vodíkové vazby. Teplota a délka procesu (15–60 s) a se odvíjí od délky primeru. Teplota také musí být dostatečně nízká, aby došlo k hybridizaci primeru s řetězcem, a zároveň dostatečně vysoká, aby reakce byla specifická a primery se vázaly na komplementární část řetězce.

- Syntéza nových řetězců DNA pomocí DNA-polymerázy (elongace)

V tomto kroku dochází ke zvýšení teploty na hodnotu kolem 72 °C. Tato teplota je optimální pro aktivitu DNA polymerázy (nejčastěji se používá Taq polymeráza). DNA polymeráza nasedá na přihibridizovaný primer, k jeho 3' konci navazuje další nukleotidy a dochází k prodloužení primeru, čímž se vytváří nový komplementární řetězec DNA. Délka elongace závisí na délce cílové DNA, čím delší je cílová jednotka, tím déle proces trvá. Na syntézu 1000 párů bází stačí obvykle 1 minuta. [27]

Opakováním těchto procesů se vytváří až miliarda kopií daného úseku cílové molekuly. [19] Pokud by měla PCR 100% účinnost, z jedné cílové molekuly by vzniklo  $2^n$  molekul ( $n$  = počet cyklů). V praxi je běžně používáno 20–40 cyklů. Produktem PCR jsou amplikony,

úseky DNA, o definované délce. Jejich přítomnost se dokazuje pomocí elektroforézy v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. [23]

### **2.5.1 Komponenty pro PCR**

V reakční směsi se vyskytují následující složky:

#### **2.5.1.1 Matrice DNA**

Molekula DNA, obsahující cílová místa pro primery, podle které se syntetizuje nová DNA. Může být z jakéhokoli zdroje DNA, genomické, komplementární nebo plazmidové. Od složení a komplexity DNA se odvíjí její vstupní množství do PCR směsi. [28, 29]

#### **2.5.1.2 DNA polymeráza**

Enzym, katalyzující syntézu nové DNA. Pravděpodobně nejrozšířenější DNA polymerázou je Taq polymeráza. Má relativně vysokou termostabilitu, poločas rozpadu asi 40 minut při 95 °C a je vhodná pro standartní PCR. [28, 29]

#### **2.5.1.3 Primery**

Metodu PCR lze použít pouze tehdy, známe-li některé informace o sekvencích, aby bylo možné navrhnout primery, protože jejich sekvence a kombinace ve většině aplikací určují úspěšnost testu. Pokud známe sekvenci, která má být amplifikována, konstrukce primerů je relativně snadná vzhledem k značnému množství výpočetních nástrojů pro návrh primerů, které dodržují několik základních pravidel při jejich výběru (viz níže). Pokud sekvence známá není, je návrh primerů obtížnější, ale stále je možný při použití degenerovaných primerů. [23]

Primer je krátký oligonukleotid a slouží k replikaci DNA. Primery musí mít dostatečnou délku, aby byly specifické, jinak se nebudou vázat na konkrétní cílovou DNA, obvyklá délka primerů je asi 18 až 22 nukleotidů. Dále je důležitá sekvence primerů, která musí být komplementární k počátečním a koncovým bodům cílové DNA. Celkový obsah a pořadí bází G, C a A, T ovlivňuje účinnost PCR. Od sekvence primeru se odvíjí teplota tání primeru  $T_m$ .  $T_m$  je teplota, při které je právě polovina primerů vázána na komplementární sekvenci a druhá polovina navázána není. Páry bází A, T jsou vázány dvěma vodíkovými vazbami, zato páry bází G, C třemi. Čím více je obsaženo párů bází G, C, tím je potřeba vyšší teploty k disociaci primeru od cílové DNA. Obsah bází G, C by měl být v rozmezí 40 až 60 procent. PCR může ovlivnit i sekvence primerů. Nukleotidové sekvence primerů nemůžou mít komplementární báze, zejména na 3' konci primerů, jinak budou primery přednostně nasedat vzájemně na sebe a vzniknou dimery primerů. Na sekvenci primerů také závisí další problém, tzv. vlásenka. Ta vzniká, když jsou na jednom primeru dva navzájem se doplňující segmenty, které nasedají na sebe, místo na cílovou DNA. V takovém případě se primer sklopí a vzniká vlásenková struktura. [27]

#### **2.5.1.4 3'-deoxynukleotid-5-trifosfáty (dNTP)**

Směs dNTP je složena ze čtyř základních nukleotidů – dATP, dCTP, dGTP a dTTP – fungujících jako stavební bloky nových řetězců DNA. Obvykle jsou do PCR směsi přidávány v ekvimolárních množstvích, za účelem optimální začlenění báze. Doporučená koncentrace dNTP je 0,2 mM, vyšší koncentrace mohou inhibovat PCR, jelikož vyvazují hořčičné ionty. [28, 29]

### **2.5.1.5 $Mg^{2+}$ ionty**

$Mg^{2+}$  jsou nezbytné pro aktivitu DNA polymerázy, protože během PCR umožňují inkorporaci dNTP. V aktivním místě DNA polymerázy katalyzují tvorbu fosfodiesterové vazby mezi fosfátovou skupinou dNTP a 3' koncem primeru. Dále hořčnaté ionty napomáhají tvorbě komplexu primeru a templátu DNA. V PCR směsi se obvykle vyskytují v podobě chloridu hořčnatého a jejich běžná koncentrace je 1–4 mM. Nízké koncentrace způsobují nedostatečnou aktivitu DNA polymerázy a malé množství produktu. Vysoká koncentrace způsobuje zvýšenou stabilitu komplexu primer-templát, kdy dochází k produkci nespecifických produktů a špatnou inkorporaci dNTP, která způsobuje vyšší množství replikačních chyb. [28, 29]

### **2.5.1.6 Voda**

Používá se speciální voda pro PCR o odporu 18 m $\Omega$ , kterou se doplňuje směs na požadovaný objem. [28, 29]

### **2.5.1.7 Pufr pro PCR**

Slouží jako vhodné chemické prostředí pro aktivitu DNA polymerázy, pH pufru se pohybuje okolo hodnot 8,0 – 9,5 a je stabilizováno pomocí tris-HCl. Pufr obsahuje draselné ionty v podobě chloridu draselného a hořčnaté ionty zastoupené v chloridu hořčnatém. Draselné ionty podporují hybridizaci primerů. Pufr může také obsahovat různé chemické látky, které zlepšují specifickou amplifikaci. [28, 29]

## **2.5.2 Cyclery**

Cyclery jsou mikroprocesorem řízené stroje, tzv. termocyclery. Umožňují automatizaci PCR a v současnosti jsou nejvhodnějšími přístroji pro provádění PCR v laboratoři. Mají uživatelsky definované, teplotně řízené vzorkové bloky, díky kterým je zajištěno rovnoměrné nastavení teploty a vysoká reprodukovatelnost. [23]

Přesné hodnoty teplot a doba trvání jednotlivých kroků při cyklizaci je důležité optimalizovat. [19]

## **2.6 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase**

Metoda kvantitativní PCR v reálném čase je běžně používaná metoda, která umožňuje stanovit počet kopií dané cílové sekvence ve vzorku. [20] Kvantifikace amplikonu se uskutečňuje prostřednictvím detekce a kvantifikace fluorescenčního signálu v zařízení, které mimo cyklického střídání teploty dokáže detekovat fluorescenci a monitorovat vznik specifických amplikonů v reálném čase. [19] Kvantifikace je založena na intenzitě fluorescenční emise světla z interkalačního fluorescenčního barviva nebo z fluorogenní sondy. Termocyclery u real-time PCR kombinují PCR a detekci fluorescence. Během každého cyklu PCR je detekována intenzita fluorescenčního záření a ta odpovídá množství amplikonu v reakční směsi. Při této metodě jsme schopni zaznamenat a rozeznat, kolik kopií DNA se vytvořilo v každém cyklu. [27]

Fluorescenční signál je možné vytvořit několika způsoby, přidáním interkalačního fluorescenčního barviva, měřením množství produktu PCR pomocí fluorogenních sond nebo fluorescenčně značenými primery.

Interkalační fluorescenční barvivo volně v roztoku světlo emituje, ale emise je výrazně slabší, než když je navázané na dvouřetězovou DNA. Během PCR se zvyšuje množství



syntetizované DNA, na kterou se naváže fluorofor, který poté fluoreskuje, např. barvivo SYBR GREEN I. Nová dvouvláknová DNA vzniká pouze při procesu elongace. Při elongaci barvivo interkaluje do dvouřetězcové DNA a dochází k emisi fluorescence. Během denaturace a nasedání primerů je většina DNA ve zkumavce jednořetězcová, barvivo tedy zůstává v roztoku, kde fluoreskuje mnohem méně. Nevýhodou barviva SYBR GREEN I je, že intenzita jeho fluorescence roste v přítomnosti jakékoli dvoušroubovice DNA a nedokáže rozlišit různé sekvence. Při vzniku dimerů primerů nebo nespecifických produktů může dojít k nadhodnocení výsledné koncentrace DNA. [27]

Pro značení primerů a sond jsou používány specifické molekuly fluoroforů. Fluorofory po absorpci světla o určité vlnové délce emitují světlo o jiné vlnové délce, která je vždy větší než u absorbovaného světla. [19]

### 2.6.1 Kvantifikace

Real-time PCR používá ke kvantifikaci genové exprese dvě metody, relativní a absolutní kvantifikaci.

- Absolutní kvantifikace využívá standardní křivky, připravené ze vzorků o známé koncentraci templátu. S těmito vzorky se pak porovnají vzorky o neznámé koncentraci, která se zjistí interpolací jejich PCR signálu do standardní křivky.
- Relativní kvantifikace srovnává genovou expresi vzorku s expresí vzorku jiného, např. vzorky, které byly ošetřeny léčivem s neošetřenou kontrolou [30]

### 2.7 Vysokorozlišovací analýza křivek tání

Vysokorozlišovací analýza křivek tání je velmi citlivá a rychlá metoda pro analýzu PCR amplikonů. Součástí PCR-HRM je amplifikace cílových sekvencí DNA za přítomnosti interkalačního barviva, které emituje při navázání na dvoušroubovici DNA fluorescenční signál. Teplota tání  $T_m$  je teplota, při které je právě polovina párů bází disociovaná. Postupnou denurací amplifikované DNA dochází ke snížení emise fluorescence. Graf relativní intenzity fluorescence v závislosti na teplotě tvoří křivku tání. U různých sekvencí DNA je možné křivky tání rozlišit podle rozdílného tvaru. Touto metodou je možné rozlišit i amplikony, které jsou rozdílné pouze v jediné dvojici bází. [31]

### 2.8 Elektroforéza

Elektroforéza je klasická metoda používaná k separaci makromolekul, při které se v elektrickém poli částice s nenulovým nábojem pohybují k jedné z elektrod v závislosti na jejich molekulové hmotnosti, celkovém náboji a tvaru. DNA obsahuje záporně nabitě fosfátové skupiny, které jsou hlavním nositelem náboje nukleové kyseliny, v elektrickém poli se pohybují od záporné elektrody směrem ke kladné. [19]

#### 2.8.1 Gelová elektroforéza

Elektroforéza se neprovádí přímo v roztoku, ale ve vhodném nosiči, kterým bývá obvykle gel. Gel pro separaci nukleových kyselin bývá nejčastěji tvořen polyakrylamidem nebo agarózou, ty vytváří hustou síťovou strukturu polymerních molekul s póry. Velikost pórů můžeme ovlivnit složením roztoku a koncentrací polymeru. Pro separaci nukleových kyselin o velikosti od 100 bp po cca 50 kb se používají agarózové gely, pro separaci menších molekul od 10 bp do

1000 bp jsou vhodné polyakrylamidové gely. Podle polohy gelu v elektroforetické aparatuře se rozlišuje horizontální a vertikální gelová elektroforéza.

Rychlost pohybu molekul, tzv. elektroforetická rychlost, je nepřímo úměrná logaritmu jejich velikosti. Při hodnocení elektroforetické pohyblivosti dané molekuly DNA nemusíme uvažovat velikost náboje, jelikož náboj v nukleové kyselině je rovnoměrně rozložen a jeho velikost je na jednotku molekuly stejná. Ke stanovení velikosti molekuly DNA nebo jejího fragmentu o neznámé velikosti slouží délkové standardy, molekuly o známé velikosti, jejichž elektroforetická pohyblivost se srovná s pohyblivostí molekul o neznámé velikosti.

Po elektroforéze se identifikuje poloha separovaných molekul. Molekuly nejsou pouhým okem viditelné, ale můžeme je zviditelnit obarvením vhodným barvivem. Můžeme použít ethidiumbromid, který s DNA vytváří komplex a po osvětlení ultrafialovým světlem červeně fluoreskuje. Stejně velké molekuly DNA jsou pak na gelu patrné jako proužky a jejich intenzita je úměrná koncentraci DNA. Dále mohou být použita fluorescenční kyanová barva s komerčním názvem SYBR, metoda radioaktivního označení molekul nukleových kyselin nebo použití hybridizace se značenou sondou. [19]

Mezi základní technické vybavení pro elektroforézu patří elektroforetický zdroj napětí, elektroforetické vany a UV-transluminátor a eventuálně nalévací vany pro lepší manipulaci s gelem. Pro úspěšnost agarózové separace je důležitá i velikost nanášecích jamek. Prokazatelné horší výsledky separace fragmentů jsou u vzorků, které jsou nanášeny do užších a menších jamek. Fragmenty DNA nanášené do jamek, které jsou menší, než 1,5 mm mají v elektroforetickém poli horší rozlišení, a to především v případech, kdy se dělí fragmenty o podobné velikosti. Nejpoužívanějším elektroforetickým prostředím je zásobní pufr pro analytické gely, TBE (10x). [32]

## **2.9 Chromatografie**

Chromatografii poprvé použil a popsal botanik M.S. Cvět v roce 1903, který pomocí organických rozpouštědel a skleněné kolony plněné  $\text{CaCO}_3$  provedl rozdělení chloroplastových pigmentů z rostlinných extraktů. Chromatografie patří mezi separační metody a využívá se k oddělení složek směsi. [33]

### **2.9.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie**

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie neboli HPLC (High Performance Liquid Chromatography) je rozšířená chromatografická metoda, vyvinutá v roce 1970 a používaná k rozdělení složek směsi, k jejich identifikaci a ke stanovení jejich množství – metoda kvalitativní a kvantitativní. HPLC je velmi spolehlivá metoda, jejíž výhody oproti ostatním separačním metodám jsou např. velká přesnost a citlivost (podle citlivosti detektoru), možnost měřit spoustu druhů látek. Mezi další výhody patří vysoká rychlost analýzy vzorků, částečná automatizace a nízká spotřeba vzorku. Vzhledem k čím dál lepší dostupnosti vybavení a množství používaných materiálů je to v současnosti nejrozšířenější separační metoda. U HPLC se používají kolony s velmi malými částicemi, což způsobuje velký odpor mobilní fáze. Proto se analýza provádí za zvýšeného tlaku a separace jednotlivých složek směsi je rychlá a účinná. [33, 34]

### 2.9.1.1 Princip HPLC

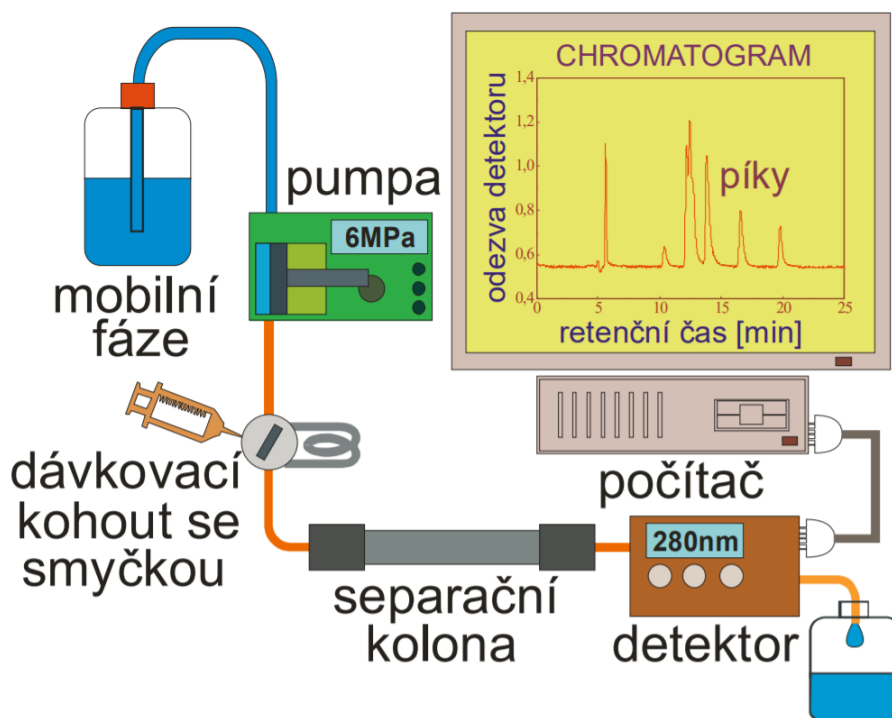
Princip chromatografie spočívá v rozdělení separovaných složek směsi mezi dvě navzájem nemísitelné fáze – mobilní a stacionární. U HPLC je mobilní fází kapalina, která je čerpadlem dávkována do chromatografu za vysokého tlaku. Stacionární fází je nejčastěji pevná látka (méně často také kapalina), která je uchycena na pevném nosiči. Vzorek se vloží na začátek stacionární fáze a je unášen pohybem mobilní fáze. Jednotlivé složky vzorku jsou poté separovány jejich afinitou k stacionární a mobilní fázi, zachycují se na stacionární fázi a tím pádem se při pohybu zdržují. Čím silněji je složka poutána ke stacionární fázi, tím déle se také zdrží. Tímto způsobem se od sebe složky postupně separují, na konec stacionární fáze se dostávají nejdříve složky, které jsou zdržovány nejméně. Při distribuci složek směsi dochází mezi stacionární a mobilní fází k neustálému ustavování rovnováhy. K popisu rozdělení složek mezi stacionární a mobilní fází slouží distribuční konstanta. [33, 35]

HPLC analýza se rozlišuje podle způsobu průtoku mobilní fáze na dva režimy – isokratickou a gradientovou eluci. U isokratické eluce protéká chromatografem mobilní fáze o konstantním složení v čase. Pokud se poměr složek mobilní fáze mění a přibývá jedné z elučnic složek, jedná se o gradientovou eluci.

Selektivita a účinnost separace se odvíjí od kolony. Kolona u HPLC je obvykle tenká trubice o různé velikosti, tvořená ze syntetických polymerů nebo nerezové oceli, uvnitř které je ukotvena stacionární fáze, obvykle ze silikagelu. Pro účinné oddělení látek je podstatná kvalita sorbentu (velikost, tvar, struktura, porozita a stejnoměrnost částic). [35]

### 2.9.1.2 Instrumentace HPLC

Aparatura pro HPLC analýzu je obvykle složena ze zásobní nádoby s mobilní fází, odplyňovačem, čerpadlem dávkovacím zařízením, kolonou, detektorem a zařízením pro sběr a analýzu dat. [34]

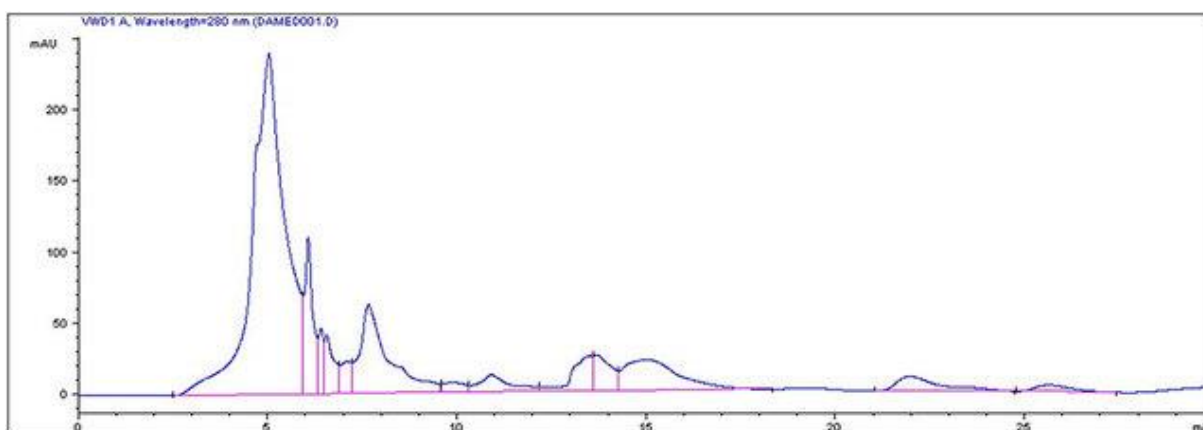


Obrázek 1 Instrumentace vysokoúčinné kapalinové chromatografie [36]

### 2.9.1.3 Charakteristika procesu HPLC

Mobilní fáze protéká při HPLC analýze stálou rychlostí. Čas, který analyt stráví v separační koloně (od nástřiku do dosažení maxima eluční křivky), charakterizuje retenci látky v koloně a je označován jako retenční čas. Množství mobilní fáze potřebné k eluci látky se nazývá retenční objem. Eluci je možné popsat jako časovou nebo objemovou závislost.

Průběh píku určuje koncentrační profil zóny, proto je plocha píku (nad nulovou linií) totožná s množstvím látky v zóně a používá se pro kvantitativní analýzu. Plocha píku se zjistí integrací jeho křivky pomocí chromatografického softwaru. Z ploch píků se obsah složek ve vzorku určuje pomocí standardů se známou koncentrací. [35]



Obrázek 2 Chromatogram HPLC (jahodová šťáva) [37]

## 3 CÍL PRÁCE

1. Příprava modelových ovocných výrobků
2. Analýza modelových i reálných ovocných výrobků vybranými instrumentálními a molekulárně-biologickými metodami
3. Vzájemné srovnání výsledků instrumentálních a molekulárně biologických analýz

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Analyzované výrobky obsahující jahody

##### 4.1.1.1 Ovocná přesnídávka s jahodami a s vitamínem C, Hello

Složení:

65 % hm. jablečná dřeň, 20 % hm. jahodová dřeň, voda, cukr, modifikovaný škrob, barvicí ovocné a rostlinné extrakty (koncentrát z karotky a granátového jablka), kyselina askorbová

Datum spotřeby:

od ukončeného 6. měsíce

Energetická hodnota na 100 g výrobku:

322 kJ/76 kcal



Obrázek 3 Přesnídávka Hello

##### 4.1.1.2 Sunárek 100 % ovoce do ručičky s jahodami, Hero

Složení:

80 % hm. jablečné pyré, 20 % hm. jahodové pyré, koncentrát citronové šťávy, kyselina askorbová

Datum spotřeby:

od ukončeného 4. měsíce

Energetická hodnota na 100 g výrobku:

239 kJ/57 kcal



Obrázek 4 Přesnídávka Sunárek

##### 4.1.1.3 Erdbeere mit Himbeere in Apfel, Hipp

Složení:

77 % jablka, 10 % jahody, 8 % banán, 4% maliny, mrkvová šťáva z koncentrátu

Datum spotřeby:

od ukončeného 4. měsíce

Energetická hodnota na 100 g výrobku:

219 kJ/52 kcal



Obrázek 5 Přesnídávka Hipp

#### 4.1.2 Ovocný materiál

Jahody byly zakoupeny v mražené formě v obchodu, maliny byly získány z domácího sběru. Ovocný materiál byl skladován v mrazničce při teplotě – 18 °C.

#### 4.1.3 Chemikálie

- Izolační kit Eligene Plant DNA, Elisabeth Pharmacon, ČR
- qPCR 2x SYTO-9, Master Mix, Top-Bio
- PCR ultra H<sub>2</sub>O, Top-Bio
- Primery (sekvence viz Tabulka X, Elisabeth Pharmacon spol., ČR)
- Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA), Serva, Německo
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris-báze), Serva, Německo
- Kyselina boritá, Penta, ČR

- Agaróza pro rutinní použití, Sigma-Aldrich, USA
- GelRed Nucleic Acid Stain, Biotium
- DNA standard 100 bp žebříček, Malamité, ČR
- Nanášecí pufr Yellow load, Top-Bio, ČR
- Folin-Ciocalteu činidlo, Penta, ČR
- Uhličitan sodný bezvodný p.a, LachNer, ČR
- Kyselina gallová, Sigma-Aldrich, Německo
- Dusitan sodný p.a, LachNer, ČR
- Chlorid hlinitý p.a, LachNer, ČR
- Hydroxid sodný, LachNer, ČR
- Katechin, Sigma-Aldrich, Německo
- Methylalkohol p.a., Penta, ČR
- n-Hexan 99% p.a., Penta, ČR
- Acetonitril, Chromasolv Plus, for HPLC,  $\geq 99,9\%$ , Honeywell Riedel-de Haën
- Kyselina trifluoroctová, 99%, Acros Organics

#### 4.1.4 Roztoky

##### 4.1.4.1 0,5x TBE pufr

Nejprve byl připraven roztok 5x TBE pufr: 54 g Tris-báze, 27,5 g kyseliny borité a 20 ml 0,5 M EDTA bylo doplněno do objemu 1 l destilovanou vodou.

0,5x TBE pufr byl získán doplněním 100 ml 5x TBE na objem 1 l destilovanou vodou.

#### 4.1.5 Přístroje a pomůcky

- Centrifuga Z216 MK, Hermle, Germany
- Combi-spin FVL-2400N Mini centrifuge, Biosan
- MS2 Minishaker Vortexer, IKA, Works, USA
- MiniIncubator, Labnet, USA
- Váhy KERN 440-33N, 200 digitální
- RotorGene-6000, Corbett Research, UK
- Biosan DNA/RNA UV-CLEANER UVC/T-AR
- Mikrovlnná trouba SMW 5020, Sencor
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro Power Supplies 300V, Labnet International, Woodbridge, USA
- Elektroforetické vany B2 a D2, Owl Separation systems, Inc., USA
- Azure Imager c600, Azure biosystem
- Nanodrop Spectrophotometer 2000, Thermo Scientific
- Mikropipety Biohit, Biotech s.r.o., ČR
- Mikrozkuhavky Eppendorf
- Homogenizační kuličky
- Lednice a mrazák
- Laboratorní sklo
- Dionex UltiMate 3000 series
- Thermo Scientific
- PDA detektor UltiMate
- Autosampler Dionex UltiMate 3000
- Pump UltiMate

- Kolona Kinetex F5, 2,6  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 150 mm, Phenomenex
- Další laboratorní pomůcky (Sterilní buničina, špičky, pinzety, špachtle...)

## 4.2 Pracovní postupy

### 4.2.1 Příprava modelových a komerčních směsí

Na přípravu modelových směsí byly z rozmixovaných jahod a malin odváženy do centrifugačních zkumavek směsi o určitých poměrech (Tabulka 3) s hmotností 4 g. Z komerčních výrobků byly do centrifugačních zkumavek taktéž odváženy 4 g.

Tabulka 3 Poměry modelových směsí

Vzorek	Jahoda [%]	Malina [%]	Jahoda [g]	Malina [g]
1	100	0	4,0	0
2	50	50	2,0	2,0
3	40	60	1,6	2,4
4	30	70	1,2	2,8
5	20	80	0,8	3,2
6	10	90	0,4	3,6
7	0	100	0	4,0

Všechny směsi byly zcentrifugovány (30 minut, 4400 ot/min), do mikrozkušavek byl odpipetován supernatant. Supernatant se uschoval pro další měření.

### 4.2.2 Izolace DNA z rostlinného materiálu

Izolace byla provedena použitím komerčního balíčku EliGene® Plant DNA Isolation Kit podle přiloženého návodu.

Do 1,5 ml mikrozkušavky bylo přidáno 0,2 g homogenizačního písku a 0,05 g vzorku. Pomocí homogenizačního tloučku byl vzorek rozmělněn a bylo přidáno 450  $\mu\text{l}$  roztoku P1. Obsah zkumavky byl promíchán.

Bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  roztoku P2, vortexováním byl obsah zkumavky lehce promíchán a nechal se inkubovat 10 minut při 70 °C za občasného promíchání.

Následovala centrifugace po dobu 3 minut při 10 000 x g a pokojové teplotě.

Supernatant byl převeden do čisté 1,5 ml mikrozkušavky, bylo přidáno 175  $\mu\text{l}$  roztoku P3. Obsah zkumavky byl po dobu 5 s vortexován a 5 minut inkubován na ledu.

Obsah zkumavky byl zcentrifugován (3 minuty, 10 000 x g, pokojová teplota), 500  $\mu\text{l}$  supernatantu bylo převedeno do čisté 2 ml mikrozkušavky a k němu bylo přidáno 500  $\mu\text{l}$  roztoku P4. Obsah zkumavky byl vortexován (5 sekund) a krátce zcentrifugován.

Do zkumavky bylo přidáno 500  $\mu\text{l}$  roztoku P5, vzniklý roztok byl krátce vortexován a zcentrifugován.

750  $\mu\text{l}$  supernatantu bylo přemístěno do mikrozkušavky s filtrem (spinfiltr). Následovala centrifugace (1 minuta, 10 000 x g, pokojová teplota). Odstředěný roztok byl odstraněn a zbylý supernatant převeden na filtr. Opět následovala centrifugace (1 minuta, 10 000 x g, pokojová teplota).

Filtr byl přemístěn do nové 2 ml mikrozkušavky a bylo na něj nanášeno 500  $\mu$ l roztoku P6 a obsah zkúavky byl zcentrifugován (1 minuta, 10 000 x g, pokojová teplota).

Poté byl filtr vyjmut a po odstranění roztoku ze zkúavky byl filtr zase vrácen zpět.

Dále bylo na filtr nanášeno 500  $\mu$ l roztoku P7 a proběhla centrifugace (1 minuta, 10 000 x g).

Následovalo opět odstranění roztoku ze zkúavky a centrifugace (2 minuty, 12 000 x g), z důvodu kompletního vysušení membrány filtru.

Po centrifugaci byl filtr opatrně vyjmut a přemístěn do nové 2 ml mikrozkušavky.

Na filtr bylo nanášeno 100  $\mu$ l roztoku P8, následovala centrifugace (1 minuta, 10 000 x g), poté byl vyjmut filtr. Získaná DNA byla ponechána ve zkúavce a uložena do lednice.

### 4.2.3 Měření koncentrace a čistoty DNA

U DNA získané z postupu 4.2.2 byla na přístroji NanoDrop 2000 proměřena absorbance DNA. Při měření byly použity 2  $\mu$ l vzorku, vzorek byl měřen proti elučnímu pufru P8 z izolačního kitu (4.2.2). Bylo proměřeno celé spektrum v UV oblasti. Z hodnoty absorbance při 260 nm byla stanovena koncentrace DNA ve vzorku a z poměrů  $A_{260/280}$  a  $A_{260/230}$  byla určena čistota vzorku.

### 4.2.4 Polymerázová řetězová reakce

#### 4.2.4.1 Příprava směsi pro PCR

Komponenty pro PCR byly rozmrazeny, zcentrifugovány a promíchány. PCR byla namíchána z komponent uvedených v Tabulce 4, 5.

Tabulka 4 Složení směsi pro PCR s výslednou koncentrací primerů 400 nM (primery ITS2, APX1B, CADIC)

Komponenta	Objem [ $\mu$ l]
Voda	9,5
Syto	12,5
Primer 1	1
Primer 2	1
Matrice DNA	1
Celkem	25

Tabulka 5 Složení směsi pro PCR s výslednou koncentrací primerů 200 nM (primery APX1B a CADIC)

Komponenta	Objem [ $\mu$ l]
Voda	10,5
Syto	12,5
Primer 1 (c=400 nM)	0,5
Primer 2 (c=200nM)	0,5
Matrice DNA	1
Celkem	25



#### 4.2.4.2 Použité primery pro PCR

Tabulka 6 Primery pro PCR, jejich sekvence a očekávaná délka produktů [38, 39]

Primery	Sekvence primeru 5' - 3'	Očekávaná délka produktů PCR
<b>ITS2</b>		
S2F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	163–311 bp
S3R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT	
<b>APX1B (APX2)</b>		
APX1B_F	CTGGAGTTGTTGCTGTTGAGG	685 bp
APX1B_R	CTTCCAGCATCAGGAAGACG	
<b>CAD1C</b>		
CAD1C_F	GAGGAGGAAGCTCTTAAACACC	209 bp
CAD1C_R	GCAGAAACTGTGTCAATGATCC	

#### 4.2.4.3 Teplotní profily PCR

Tabulka 7 Program pro primery ITS2

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	
Počáteční denaturace	95	300	
Denaturace	40 cyklů	30	
Hybridizace primerů		61	30
Polymerace		72	30
Elongace		72	300

Tabulka 8 Program pro primery APX1B a CAD1C

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	
Počáteční denaturace	94	120	
Denaturace	40 cyklů	30	
Hybridizace primerů		60	45
Polymerace		72	60
Elongace		72	300

U programu pro primery APX1B a CAD1C proběhl touchdown a to během 10 cyklů na teplotu 55 °C

#### 4.2.5 Detekce PCR produktů pomocí agarózové gelové elektroforézy

Pro přípravu 1,2 % gelu byla navážka 1,2 g agarózy povařením rozpuštěna v 100 ml 0,5x TBE pufru. Suspenze se nechala vychladnout asi na 60 °C, bylo přidáno 10 µl fluorescenčního barviva GelRed. Gel byl nalit do formy, byl do něj vložen hřebínek. Po 30 minutách tuhnutí byl hřebínek vyjmut, do jedné komůrky bylo nanášeno 5 µl délkového standardu. PCR produkty byly v poměru 5:1 smíchány s nanášecím pufrům Yellow load a 15 µl z těchto směsí bylo nanášeno jednotlivě do komůrek v připraveném gelu. Forma s gelem byla vložena do elektroforetické vany a zalita po rysku 0,5x TBE pufrům. Vana byla připojena ke zdroji.

Elektroforéza probíhala 90 minut při napětí 80 V. Po elektroforéze byl gel vyfocen při vlnové délce 305 nm v UV transluminátoru Azure Imager.

#### 4.2.6 Stanovení celkových polyfenolů a flavonoidů spektrofotometricky

##### 4.2.6.1 Polyfenoly

Do zkumavky byl odpipetován 1 ml Folin-Ciocalteu činidla (zředěného destilovanou vodou 1:9), 1 ml destilované vody a 50  $\mu$ l vzorku. Obsah zkumavky byl promíchán a 5 minut se nechal inkubovat při laboratorní teplotě. Byl přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného (24,9 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  na 150 ml destilované vody), směs byla opět promíchána a nechala se inkubovat 15 minut. Poté byla změřena absorbance při 750 nm proti slepému vzorku, který byl připraven stejně jako zkoumané vzorky, místo 50  $\mu$ l vzorku u něj byl použit stejný objem vody.

Jako standard byla použita kyselina gallová (o koncentraci  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), ze které byla namíchána koncentrační řada v rozsahu koncentrací  $0,1 - 0,7 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Obsah polyfenolů byl stanoven z rovnice kalibrační křivky kyseliny gallové:

$$A = 1,5996 \cdot c$$

Z koncentrace bylo vypočítáno množství celkových polyfenolů v 1 g vzorku. Vzorky byly proměřeny v tripletu a zprůměrovány.

##### 4.2.6.2 Flavonoidy

Do zkumavky bylo odpipetováno 0,5 ml vzorku, 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5% roztoku dusitanu sodného (5 g  $\text{NaNO}_2$  rozpuštěno v 100 ml destilované vody). Obsah zkumavky byl promíchán a pět minut se ponechal inkubovat při laboratorní teplotě. Bylo přidáno 0,2 ml 10% roztoku chloridu hlinitého (10 g  $\text{AlCl}_3$  rozpuštěno v 100 ml destilované vody), roztok byl promíchán a pět minut se inkuboval. Dále bylo přidáno 1,5 ml 5% roztoku NaOH (5 g NaOH rozpuštěno v 100 ml destilované vody) a 1 ml destilované vody. Roztok byl promíchán a 15 minut ponechán v klidu. Poté byla změřena absorbance při 510 nm proti slepému vzorku, který byl připraven stejně jako zkoumané vzorky, místo 0,5 ml vzorku byl doplněn stejným množstvím vody.

Jako standard byl použit katechin o koncentraci  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , ze kterého byla namíchána koncentrační řada v rozsahu koncentrací  $0,05 - 0,30 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Obsah flavonoidů byl stanoven z rovnice kalibrační křivky katechinu:

$$A = 3,1648 \cdot c$$

Z koncentrace bylo vypočítáno množství celkových flavonoidů v 1 g vzorku.

#### 4.2.7 Stanovení fenolických látek pomocí HPLC

Do zkumavky bylo napipetováno 1 ml supernatantu (vzorku) a 2 ml hexanu. Obsah zkumavky byl protřepáván 1 minutu. Dále bylo přidáno 1 ml methanolu, obsah zkumavky byl promíchán a ponechán 5 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Dolní (methanolvá) fáze byla odpipetována do vialky. Vzorky ve vialkách byly poté analyzovány pomocí metody HPLC popsané v kapitole 2.9.1. Každého vzorku bylo nadávkováno 20  $\mu$ l, teplota byla nastavena na  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . Příslušné látky byly detekovány při vlnové délce 260 nm, 280 nm, 300 nm a 680 nm. Průtok byl nastaven na 0,4 ml/min, mobilní fáze byly fáze A: MiliQ voda s 0,1 % TFA, fáze B: Acetonitril.

Obsah vybraných látek byl stanoven z rovnic kalibračních křivek uvedených v Tabulce 9.

Tabulka 9 Rovnice kalibračních křivek pro vybrané látky, HPLC

Látka	Rovnice kalibrační křivky
Kyselina gallová	$A = 5315,7 \cdot c$
Resveratrol	$A = 3036,8 \cdot c$
Kyselina kumarová	$A = 4962,2 \cdot c$
Pelargonidin-3-glukosid	$A = 6535 \cdot c$
Kvercetin-3-glukosid	$A = 19347 \cdot c$

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 5.1 Molekulárně-biologické metody

#### 5.1.1 Izolace DNA z jahod

Izolace DNA z jahod byla provedena podle postupu uvedeném v kapitole 4.2.2. Koncentrace a absorpční spektra izolované DNA byly proměřeny spektrofotometricky v UV oblasti na přístroji Nanodrop 2000. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 10.

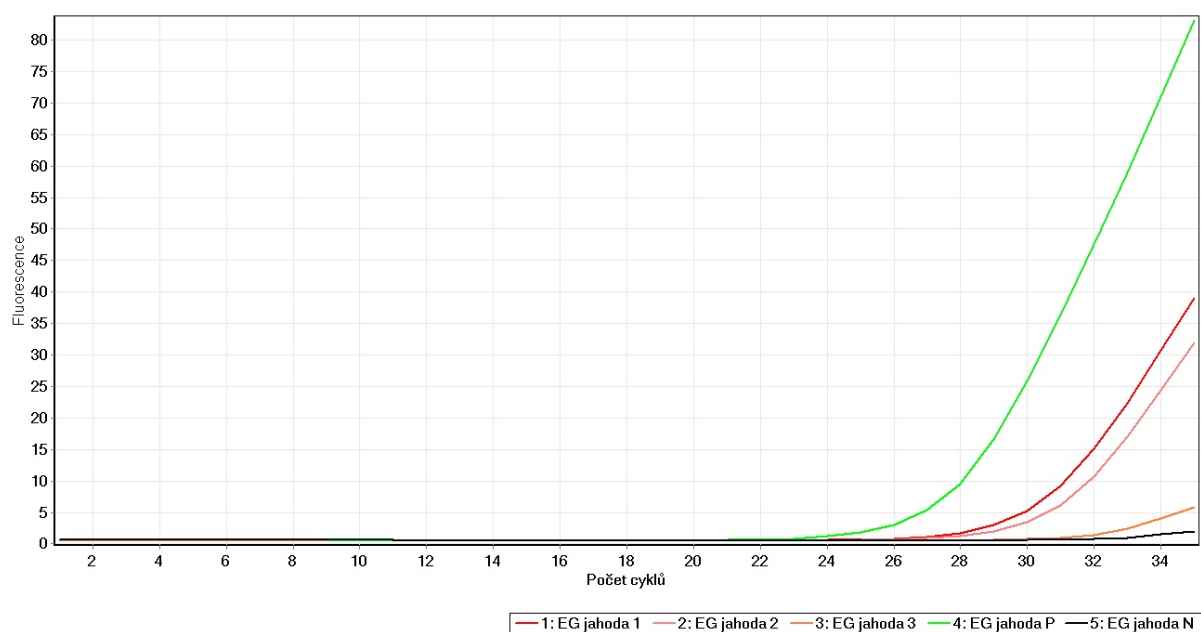
Dle poměru absorbancí  $A_{260/280}$  se jeví jako nejméně kontaminovaný vzorek 1, ideálně se hodnota pro čistou DNA pohybuje okolo 1,85. Hodnota 2,02 je ještě v toleranci, zbylé vzorky by mohly být kontaminované RNA, která tuto hodnotu navyšuje. Poměr absorbancí  $A_{260/230}$  je u všech vzorků nižší než ideální hodnota (asi 1,8), což by mohlo značit přítomnost zbytků činidel z izolačního kitu, fenolických látek nebo proteinů.

Tabulka 10 Spektrofotometricky stanovená koncentrace a čistota DNA, Jahoda

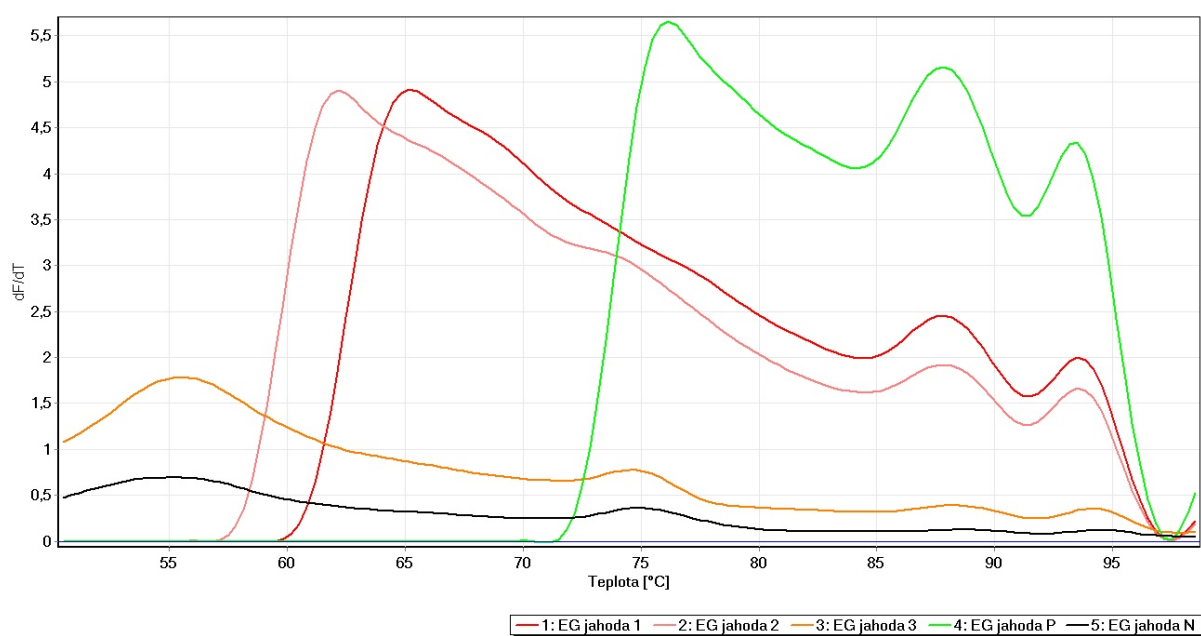
Vzorek	Název	c [ng/μl]	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
1	Jahoda 1	9,1	2,02	1,33
2	Jahoda 2	6,8	2,24	1,52
3	Jahoda 3	6,1	2,30	1,43

#### 5.1.2 Ověření amplifikovatelnosti DNA

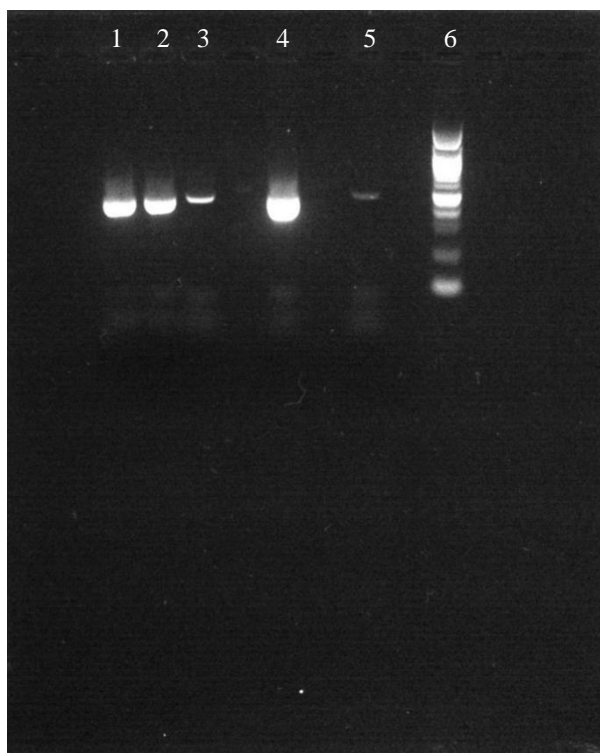
Izolovaná DNA byla využita pro real-time PCR analýzy. Sekvence primerů a teplotní profily všech PCR reakcí jsou uvedeny v kapitole 4.2.4. Výsledky PCR jsou na Obrázcích 6 a 7. Analýzou PCR s použitím primerů ITS 2 byla ověřena amplifikovatelnost izolátů DNA z jahod. V pozitivní kontrole (DNA z plodu jahody, u níž byla ověřena amplifikovatelnost) byly detekovány dva píky pro specifické produkty s teplotou tání 87,6 °C a 93,5 °C (Obrázek 6). Nejlépe se amplifikovaly vzorky Jahoda 1 a Jahoda 2, u kterých byly detekovány specifické produkty se stejnou teplotou tání jako produkty v pozitivní kontrole. Vzorek Jahoda 3 se amplifikoval mnohem méně. Nejspíš proto, že vzorek obsahoval inhibitory, jelikož poměr absorbancí  $A_{260/280}$  u tohoto vzorku byl relativně vysoký, což značí přítomnost RNA. Absorpční spektrum vzorku Jahoda 3 mělo odlišný tvar od čisté DNA (Obrázek 7), u tohoto vzorku je specifický produkt možné zaznamenat mnohem hůře, píky produktů jsou příliš široké a jejich teploty tání jsou oproti čisté DNA posunuté. Důvodem můžou být kontaminanty ve vzorku DNA. Po amplifikaci DNA byly v pozitivní kontrole a testovaných vzorcích pomocí agarózové gelové elektroforézy (Obrázek 8) detekovány stejně dlouhé specifické produkty PCR o velikosti přibližně 400 bp, což je další potvrzení vzniku specifických produktů. Délka specifických produktů byla u ITS2 primerů delší než očekávaná (163–311, kapitola 4.2.4.2), protože ITS oblast je vysoce variabilní, a v použitém zdroji byla těmito primery amplifikována DNA jiných druhů rostlin s jinou sekvencí v této oblasti. Pro další analýzy byl vybrán jako nejvhodnější vzorek o nejvyšší koncentraci, Jahoda 1.



Obrázek 6 Amplifikační křivky reakčních směsí s použitím primerů ITS2



Obrázek 7 Křivky tání ampliconů s použitím primerů ITS2



Obrázek 8 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (400 bp), při použití primerů ITS2  
 Tabulka 11 Seznam vzorků, jejich koncentrace a amplikace pro Obrázek 8 (– nedetekováno, detekce produktu: + slabé, ++ střední, +++ silné intenzity)

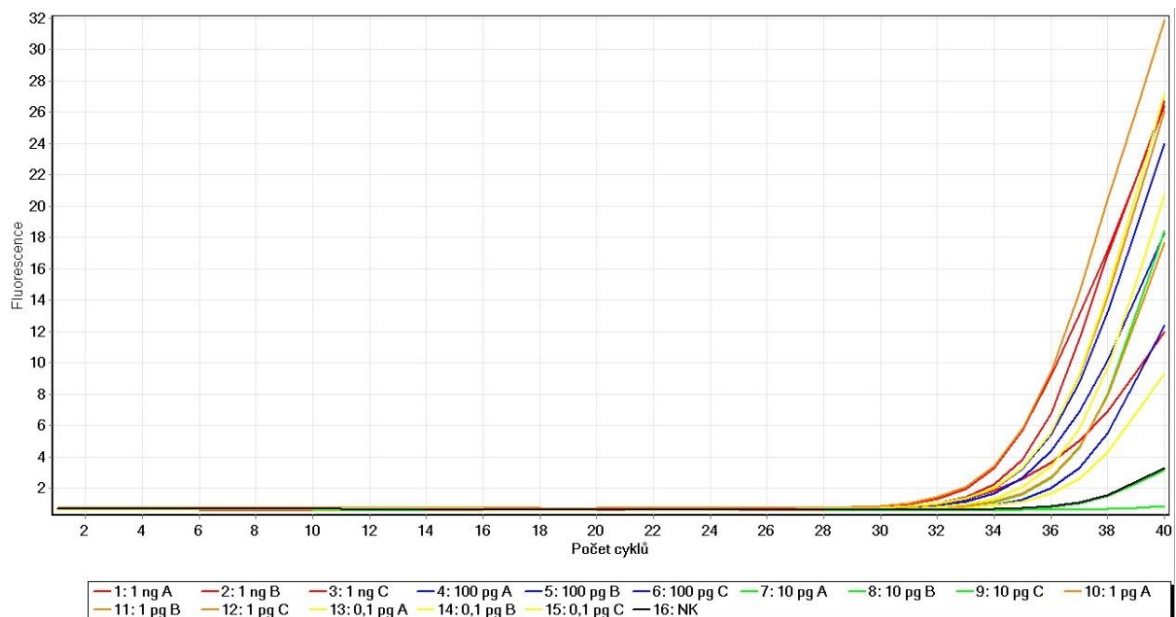
Běh č.	Vzorek	c DNA [ $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ]	Amplikon
1	Jahoda 1	9,1	+++
2	Jahoda 2	6,8	+++
3	Jahoda 3	6,1	+
4	PK	–	+++
5	NK	–	–
6	DNA standard	–	+++

### 5.1.3 Stanovení citlivosti PCR a výběr vhodných primerů

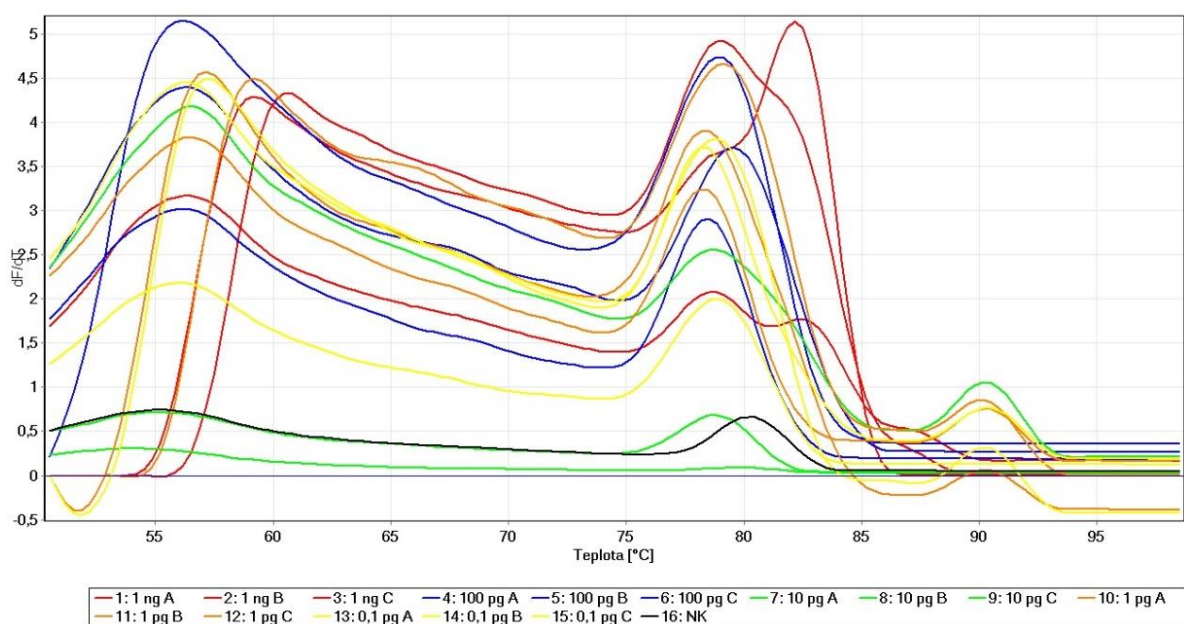
Po ověření amplifikovatelnosti DNA byly otestovány dva páry primerů: APX1B a CAD1C, a zjišťovalo se jaké nejnižší množství DNA dokážou detekovat ve směsi PCR a amplifikovat ji. Nejprve byla DNA ze vzorku Jahoda 1 o koncentraci 9,1  $\text{ng}/\mu\text{l}$  zředěna na koncentrace 1  $\text{ng}/\mu\text{l}$  – 0,1  $\text{pg}/\mu\text{l}$ . Byly připraveny reakční směsi pro real-time PCR se dvěma různými koncentracemi primerů (200 nM a 400 nM), byly provedeny real-time PCR reakce s následnou analýzou křivek tání, a u všech vzorků byla provedena agarózová gelová elektroforéza. U primerů APX1B s koncentrací 400 nM (Obrázek 9, 10) byl specifický produkt zachycen u koncentrací DNA 1  $\text{ng}/\mu\text{l}$  a částečně u 100  $\text{pg}/\mu\text{l}$  a u stejných primerů s poloviční koncentrací (Obrázek 12, 13) specifický produkt téměř nevznikal. Specifické produkty o délce přibližně 700 bp byly potvrzeny agarózovou gelovou elektroforézou U primerů CAD1C s koncentrací 400 nM (Obrázek 15, 16) a 200 nM (Obrázek 18, 19) byly detekovány specifické produkty s koncentrací 1  $\text{ng}/\mu\text{l}$ . Elektroforéza potvrdila čistotu negativní kontroly a vznik specifických produktů o délce

přibližně 200 bp, což odpovídá očekávané délce produktů u primerů CAD1C. Primery APX1B s koncentrací 400 nM detekovaly DNA i o koncentraci 100 pg/μl, a u vzorků s nižší koncentrací byl místo dlouhého detekován jiný, kratší specifický fragment, a u primerů APX1B je tím pádem možnost úpravy teplotního profilu PCR, tak aby se přednostně amplifikoval tento kratší fragment. U primerů CAD1C vznik tohoto krátkého fragmentu nebyl pozorován, a proto byly pro další měření vybrány primery APX1B.

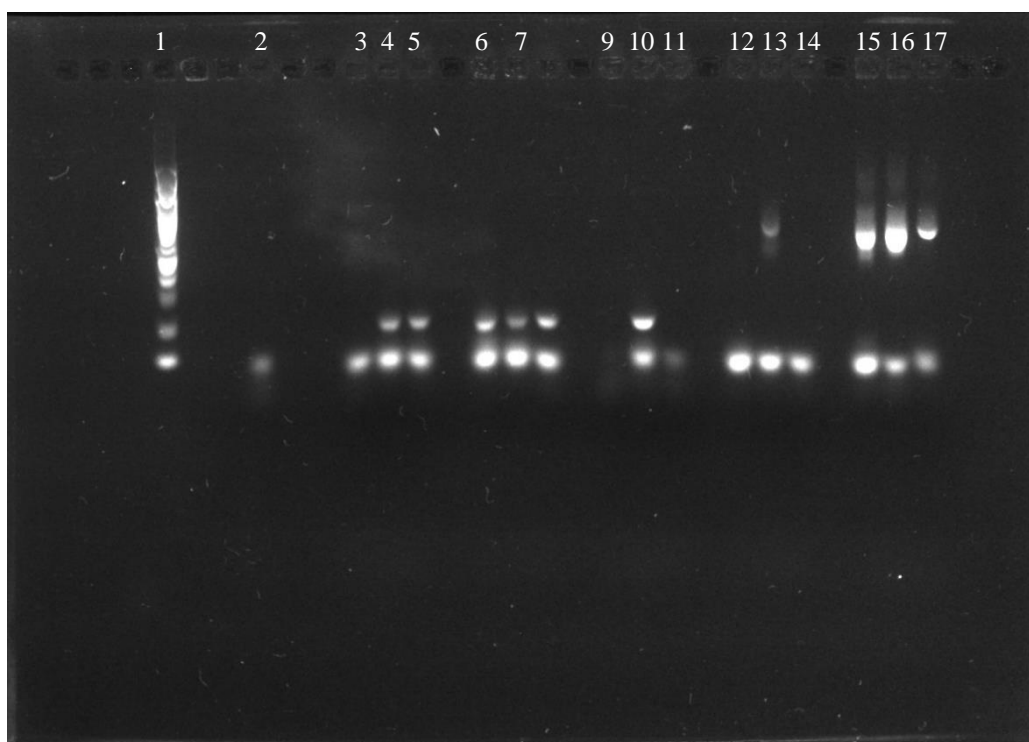
Je důležitý fakt, že primery APX1B dokázaly zachytit i DNA o koncentraci 100 pg/μl. Komerční ovocné pyré jsou totiž většinou směsí a z nich vyzolovaná DNA není pouze z jahod, jahodová DNA tvoří pouze část, a proto je důležité, aby primery dokázaly zachytit i nižší koncentrace DNA než 1 ng/μl.



Obrázek 9 Amplifikační křivky reakčních směsí s použitím primerů APX1B o koncentraci 400 nM



Obrázek 10 Křivky tání amplikonů s koncentrací primerů APX1B o koncentraci 400 nM

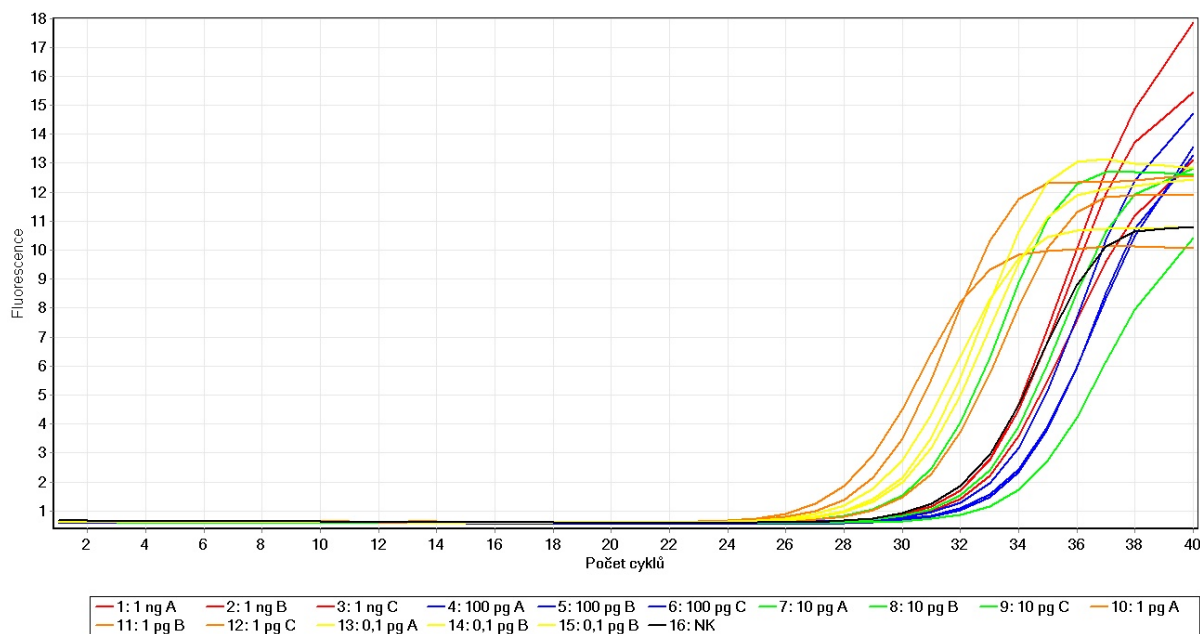


Obrázek 11 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (700 bp), při použití primerů APX1B (400 nM)

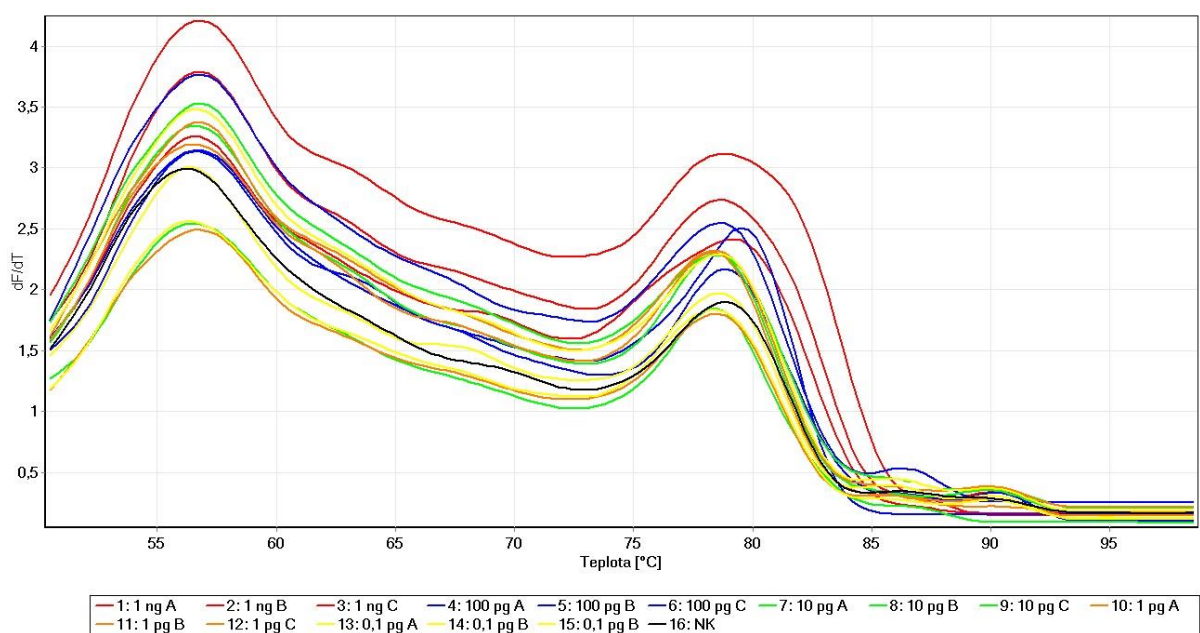
Tabulka 12 Seznam vzorků, jejich koncentrace a amplikace pro Obrázek 11 (– nedetekováno, detekce produktu: + slabé, ++ střední, +++ silné intenzity)

Běh č.	Vzorek	c DNA [ng·μl <sup>-1</sup> ]	Amplikon
1	DNA standart	–	+++
2	NK	–	–
3	Jahoda 1	0,1 pg	–
4			–
5			–
6		1 pg	–
7			–
8			–
9		10 pg	–
10			–
11			–
12		100 pg	–
13			+
14			–
15		1 ng	+++
16			+++
17			++

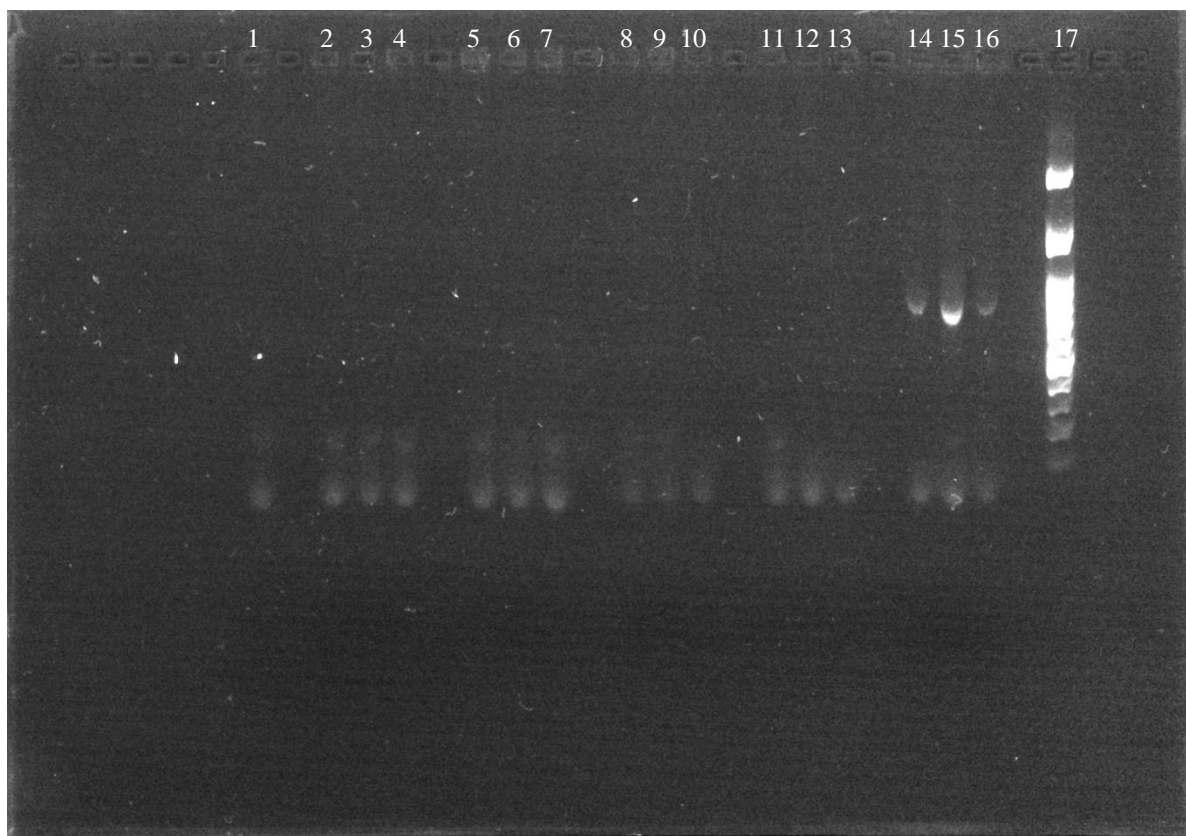




Obrázek 12 Amplifikační křivky reakčních směsí s použitím primerů APX1B o koncentraci 200 nM



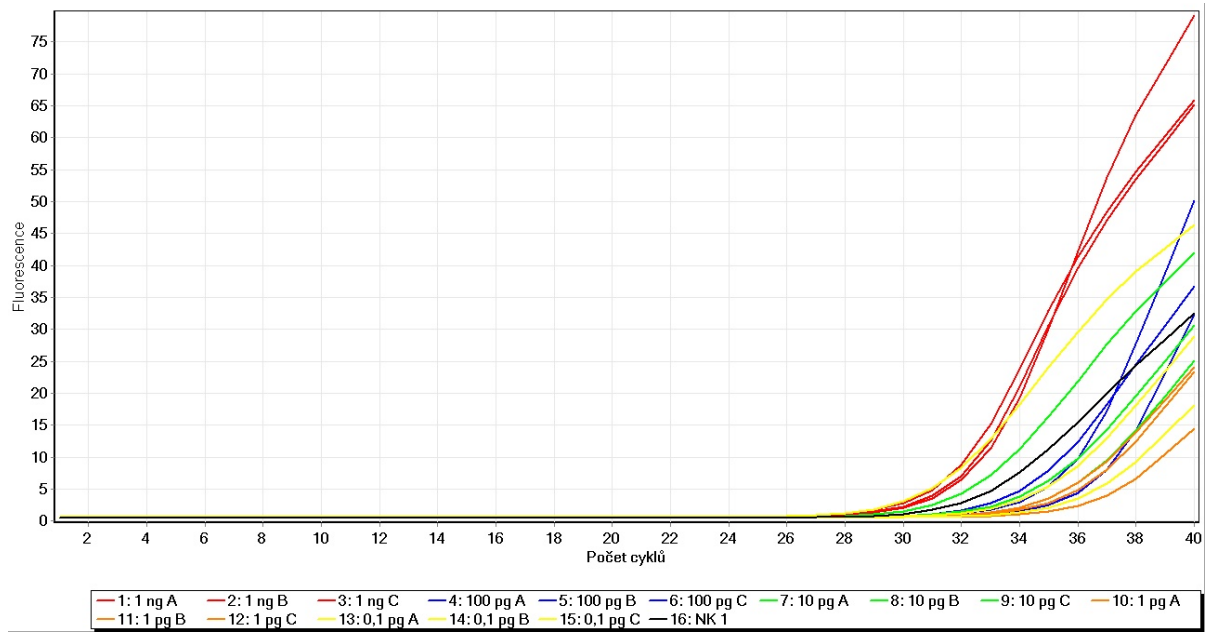
Obrázek 13 Křivky tání amplikonů s použitím primerů APX1B o koncentraci 200nM



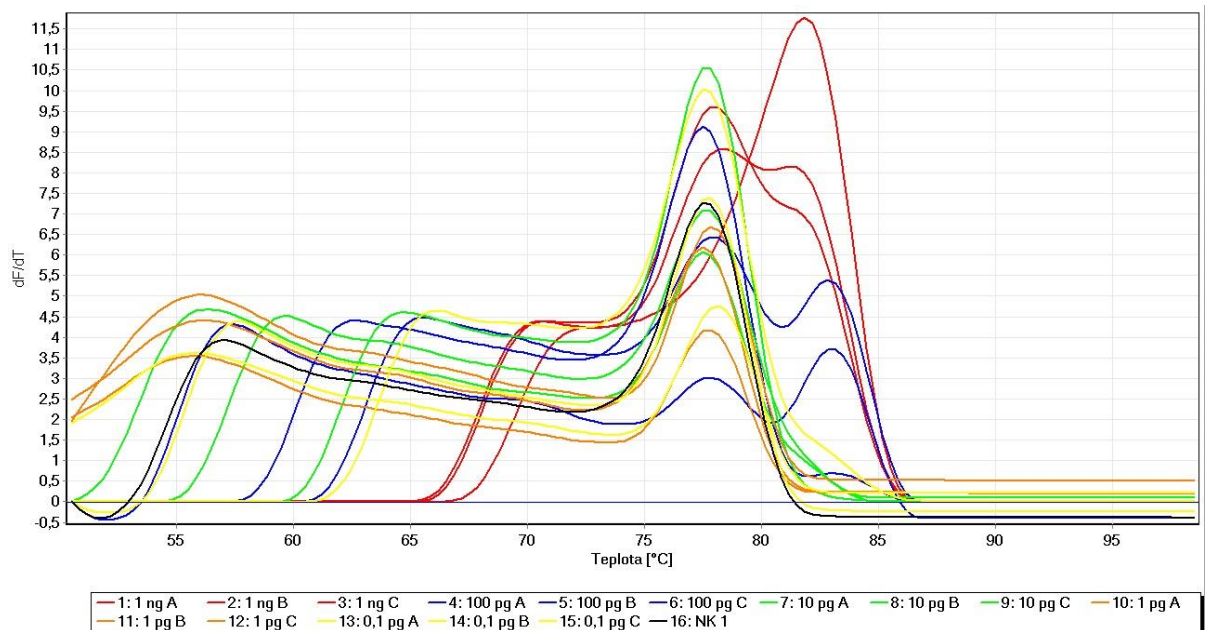
Obrázek 14 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (700 bp), při použití primerů APX1B (200 nM)

Tabulka 13 Seznam vzorků, jejich koncentrace a amplikace pro Obrázek (– nedetekováno, detekce produktu: + slabé, ++ střední, +++ silné intenzity)

Běh č.	Vzorek	c DNA [ $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ]	Amplikon
1	NK	–	–
2	Jahoda 1	0,1 pg	–
3			–
4			–
5			–
6		1 pg	–
7			–
8			–
9			–
10		10 pg	–
11			–
12			–
13			–
14		1 ng	+
15			++
16			+
17		DNA standart	–



Obrázek 15 Amplifikační křivky reakčních směsí s použitím primerů CADIC o koncentraci 400 nM



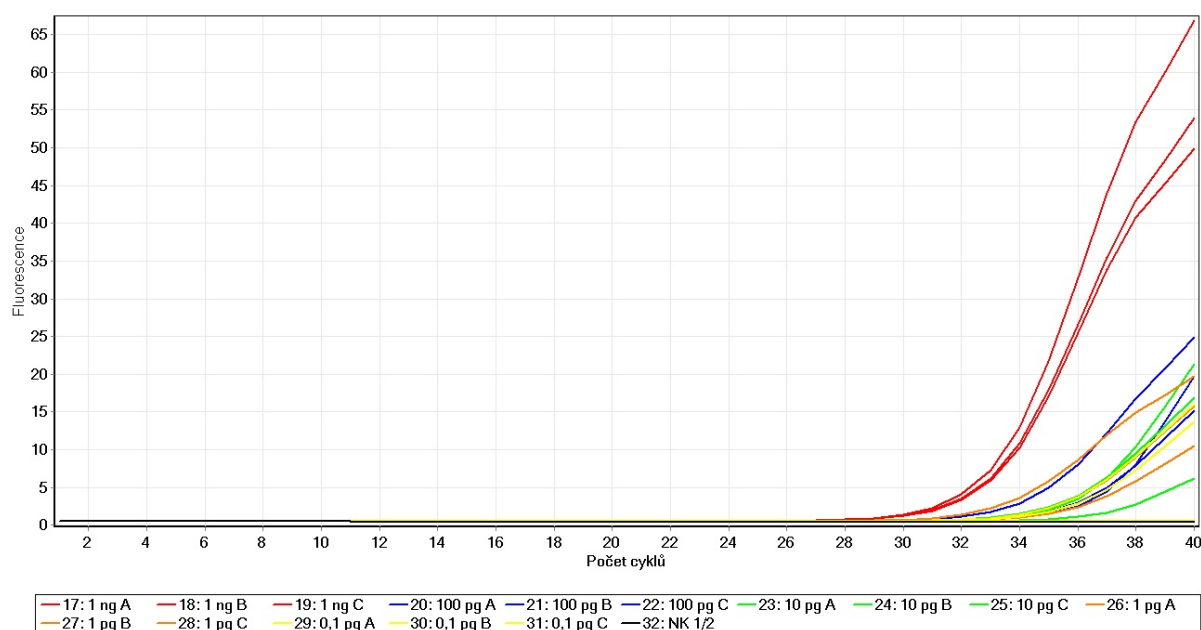
Obrázek 16 Křivky tání amplikonů s použitím primerů CADIC o koncentraci 400nM



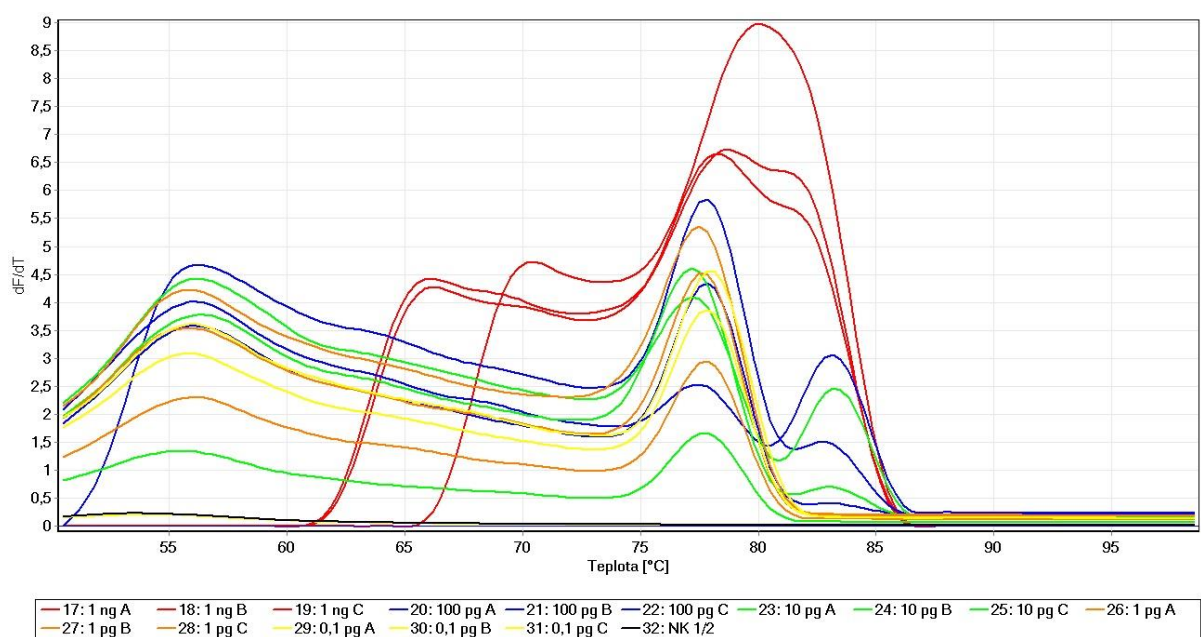
Obrázek 17 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (200 bp), při použití primerů CAD1C (400 nM)

Tabulka 14 Seznam vzorků, jejich koncentrace a amplikace pro Obrázek 17 (– nedetekováno, detekce produktu: + slabé, ++ střední, +++ silné intenzity)

Běh č.	Vzorek	c DNA [ $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ]	Amplikon
1	DNA standart	–	+++
2	NK	–	–
3	Jahoda 1	0,1 pg	–
4			–
5			–
6		1 pg	–
7			–
8			–
9		10 pg	–
10			–
11			–
12		100 pg	++
13			++
14			+
15		1 ng	+++
16			+++
17			+++



Obrázek 18 Amplifikační křivky reakčních směsí s použitím primerů CADIC o koncentraci 200 nM



Obrázek 19 Křivky tání amplikonů s použitím primerů CADIC o koncentraci 200nM



Obrázek 20 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (200 bp), při použití primerů CAD1C (200 nM)

Tabulka 15 Seznam vzorků, jejich koncentrace a amplikace pro Obrázek 20 (– nedetekováno, detekce produktu: + slabé, ++ střední, +++ silné intenzity)

Běh č.	Vzorek	c DNA [ng·μl <sup>-1</sup> ]	Amplikon
1	DNA standart	–	+++
2	NK	–	–
3	Jahoda 1	0,1 pg	–
4			–
5			–
6		1 pg	–
7			–
8			–
9		10 pg	++
10			+
11			–
12		100 pg	++
13			+
14			+
15		1 ng	+++
16			+++
17			+++

#### 5.1.4 Izolace DNA z modelových a komerčních ovocných pyré

Byly připraveny modelové směsi, složené z jahod a malin (4.2.1). Z těchto modelových směsí a komerčních směsí, dostupných v komerční obchodní síti, byla izolována DNA (4.2.2). Koncentrace a čistota izolované DNA byly stanoveny spektrofotometricky na přístroji Nanodrop 2000. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 16.

Koncentrace DNA u modelových směsí se pohybovala v rozmezí hodnot 7–11 ng/μl. U komerčních směsí byla koncentrace vyizolované DNA nižší. Poměry absorbancí  $A_{260/280}$  byly u většiny vzorků v rozmezí 1,8–2,0, vzorky, které měly tento poměr vyšší mohly být kontaminovány RNA (nejvyšší hodnota u vzorku Hello). Vzorek Hipp měl jako jediný tuto hodnotu nižší než 1,8, což mohlo být způsobeno přítomností proteinů. Poměry absorbancí  $A_{260/230}$  byly u všech vzorků nízké, hlavně u komerčních směsí. U čisté DNA má tento poměr hodnotu blízkou 1,8. Tyto hodnoty mohly být nízké kvůli přítomnosti polyfenolů, které mají maximum absorpance při vlnové délce 230 nm. U vzorků, jejichž koncentrace je nižší než 10 ng/μl může docházet ke zkreslení výsledků a nepřesných hodnot absorbancí. [40]

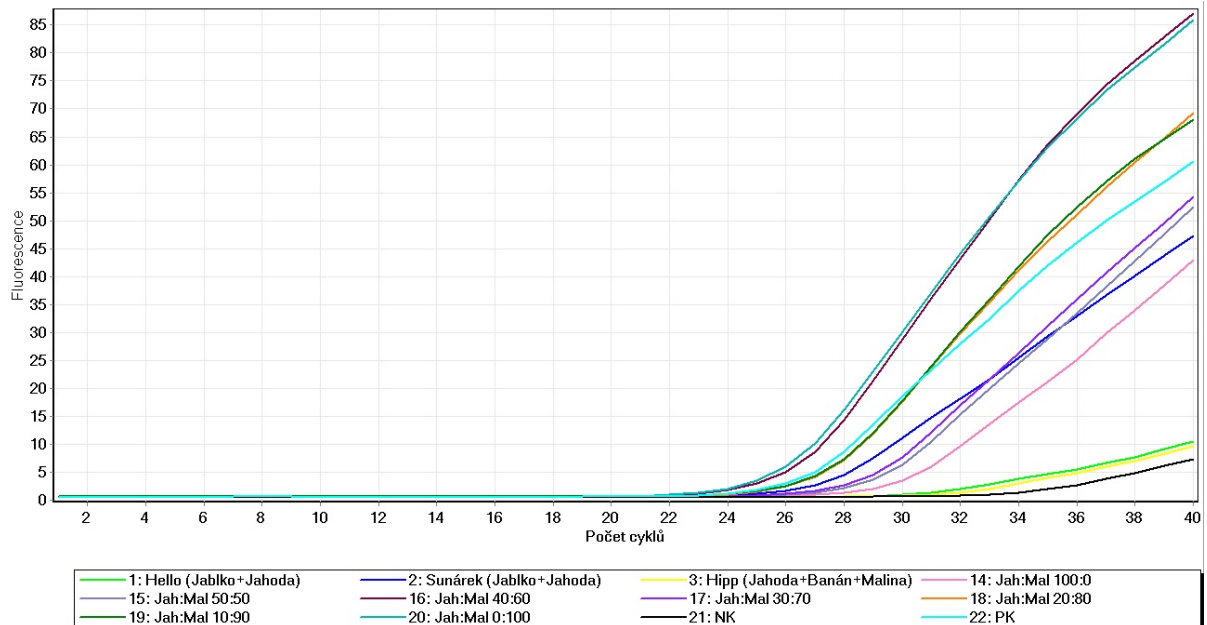
Tabulka 16 Koncentrace modelových a komerčních směsí

Vzorek	c DNA [ng·μl <sup>-1</sup> ]	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
Hello (Jablko+Jahoda)	1,8	2,61	0,54
Sunárek (Jablko+Jahoda)	3,6	2,02	0,51
Hipp (Jahoda+Banán+Malina)	2,1	1,52	0,32
Jahoda:Malina	100:0	10,3	0,90
	50:50	8,2	0,70
	40:60	11,0	0,96
	30:70	7,2	0,67
	20:80	8,5	0,81
	10:90	7,0	0,86
	0:100	10,5	0,95

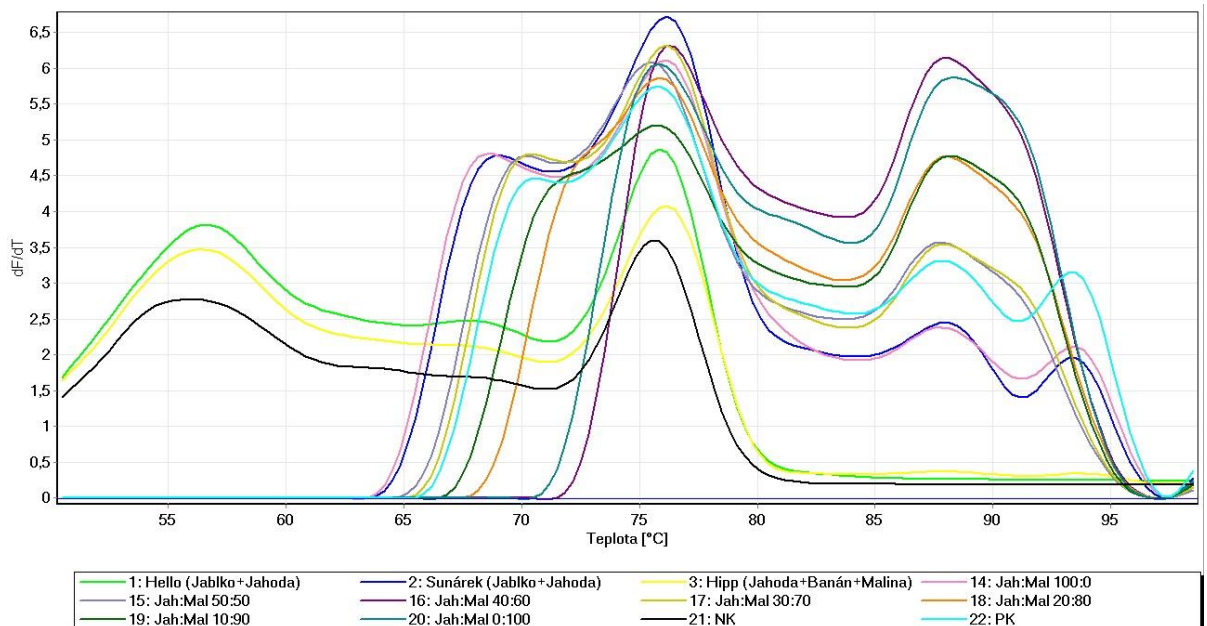
#### 5.1.5 Ověření amplifikovatelnosti DNA, primery ITS2

U DNA komerčních i modelových směsí byla ověřena amplifikovatelnost pomocí real-time PCR s primery ITS2 (4.2.4.1). Jako pozitivní kontrola byla použita DNA z plodu meruňky s ověřenou amplifikovatelností. Izoláty DNA z přesnídávek Hello a Hipp se ve srovnání s modelovými směsmi amplifikovaly mnohem hůře, možným důvodem byla nízká koncentrace použité DNA nebo přítomnost inhibitorů vzhledem k poměrům absorbancí uvedených v Tabulce 16, či vyšší stupeň degradace DNA v komerčních výrobcích. V pozitivní kontrole byly detekovány specifické produkty. V negativní kontrole byly detekovány pouze dimery primerů. Kromě vzorků Hello a Hipp, které měly podobný tvar křivek tání jako negativní kontrola, byly specifické produkty detekovány u všech vzorků. Pomocí agarózové gelové elektroforézy (4.2.5) byly ve všech modelových směsích a komerční směsi Sunárek detekovány stejně dlouhé specifické produkty PCR o velikosti přibližně 300 až 400 bp, stejná velikost byla zaznamenána i u pozitivní kontroly, což je další potvrzení vzniku specifických produktů u těchto vzorků. U negativní kontroly nebyly detekovány žádné specifické produkty o této

velikosti, což značí její čistotu. Fakt, že se vzorky Hello a Hippo amplifikovaly minimálně a nevznikly u nich specifické produkty mohl být způsoben nízkou koncentrací vyizolované DNA a přítomností inhibitorů. Modelové i komerční vzorky byly podrobeny další PCR analýze se specifickými primery APX1B.

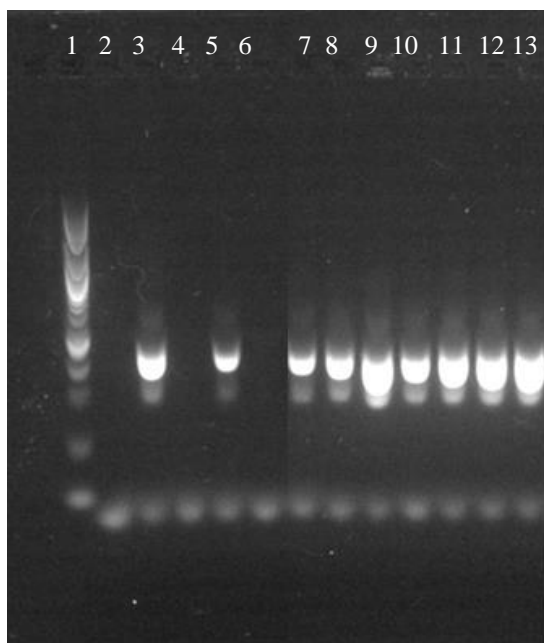


Obrázek 21 Komerční a modelové směsi ITS2



Obrázek 22 Komerční a modelové směsi ITS analýza křivek tání





Obrázek 23 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (400 bp), při použití primerů ITS2, komerční a modelové směsi

Tabulka 17 Seznam vzorků, jejich koncentrace a amplikace pro Obrázek 23 (– nedetekováno, detekce produktu: + slabé, ++ střední, +++ silné intenzity)

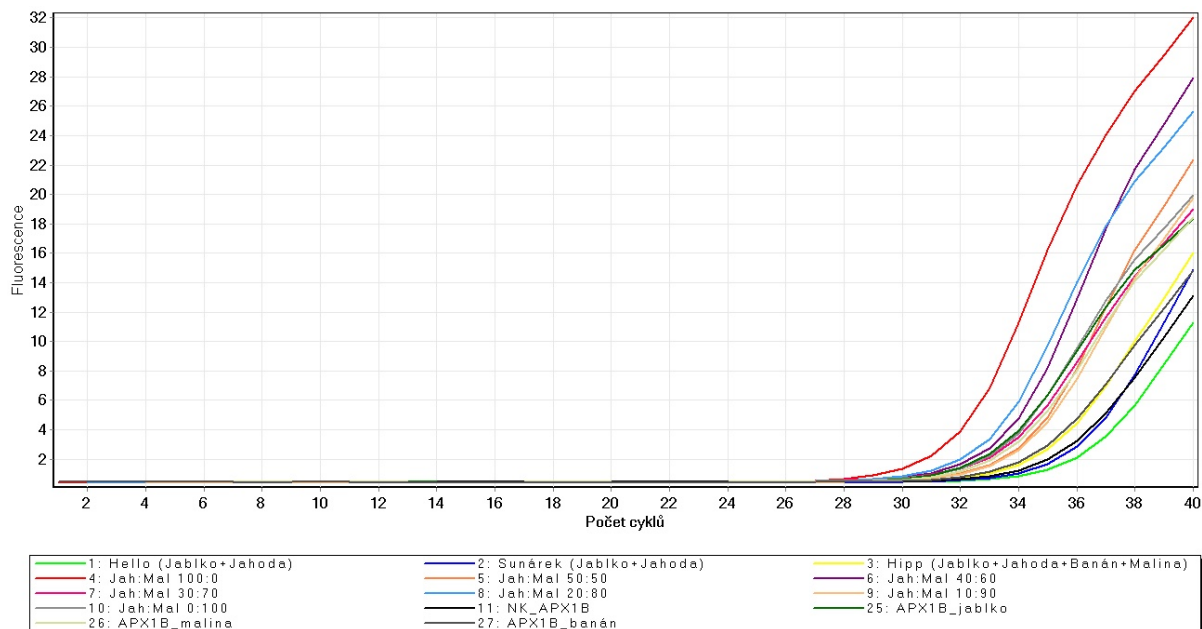
Běh č.	Vzorek	c DNA [ng·μl <sup>-1</sup> ]	Amplikon
1	DNA standart	–	+++
2	NK	–	–
3	PK	–	+++
4	Hello	1,8	–
5	Sunárek	3,6	+++
6	Hipp	2,1	–
7	Jahoda:Malina	100:0	+++
8		50:50	+++
9		40:60	+++
10		30:70	+++
11		20:80	+++
12		10:90	+++
13		0:100	+++

### 5.1.6 Průkaz jahodové složky v ovocných pyré pomocí druhově specifických primerů

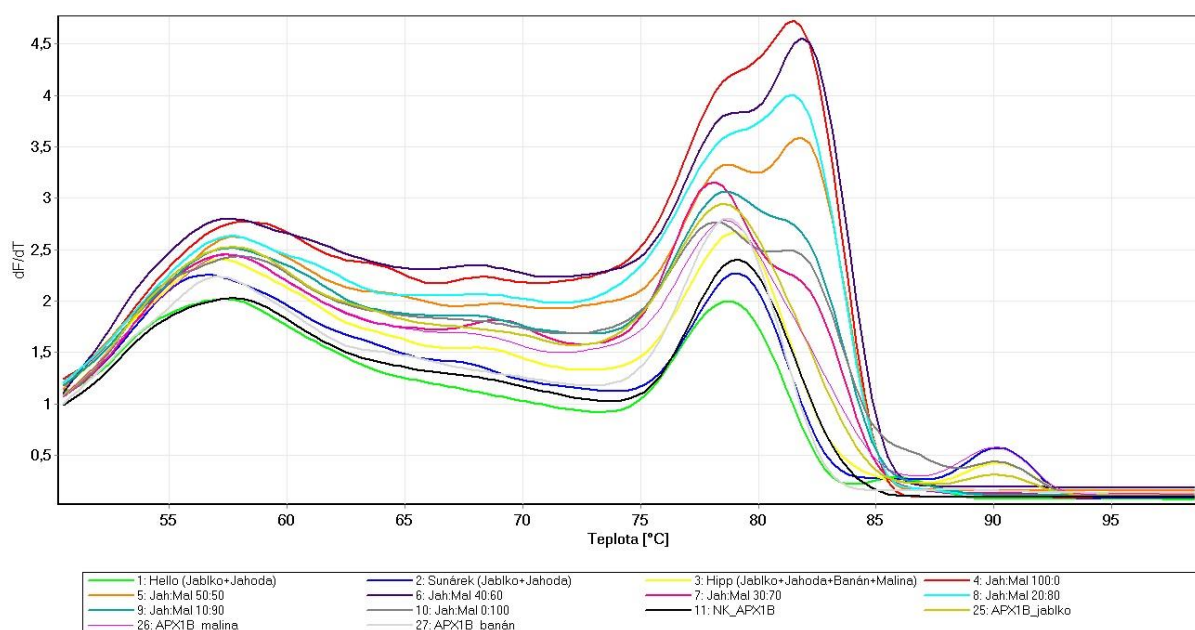
Z DNA komerčních směsí, modelových směsí a již dříve úspěšně amplifikované DNA plodů maliny, jablka a banánu byly s párem primerů APX1B připraveny směsi PCR a provedena PCR analýza (4.2.4). Se zvyšujícím se množstvím jahodové složky v modelové směsi se zvyšovalo i množství specifických produktů primerů APX1B (Obrázek 24, 25). V negativní kontrole byla pozorována zdánlivá amplifikace (Obrázek 21), ale analýza křivek tání amplikonů a elektroforetická kontrola (Obrázek 26) ukazují, že zde vznikly pouze dimery primerů, nikoli specifický amplikon. U DNA z maliny, jablka a banánu specifický produkt při této teplotě

nevznikal, čímž bylo potvrzeno, že využití primery byly dostatečně specifické. Specifické jahodové produkty s teplotou tání přibližně 82 °C byly detekovány v určité míře ve všech modelových směsí s obsahem jahod. Lze zaznamenat i pík u modelové směsi s podílem jahod deset procent, koncentrace DNA tohoto vzorku je 7,0 ng/μl, což znamená zastoupení jahod v koncentraci 0,7 ng/μl. U komerčních pyrů s obsahem jahod nebyly specifické amplikony detekovány. Pravděpodobným důvodem nepřítomnosti specifického amplikonu u komerčních směsí bylo nízké množství jahodové složky v těchto směsích (4.1.1) a z něj vyplývající nízké zastoupení DNA jahod v příslušných izolátech. Elektroforéza potvrdila nepřítomnost specifických produktů v negativní kontrole a komerčních směsích. Délka produktů u modelových směsí byla přibližně 700 bp, což odpovídá očekávané délce produktů u primerů APX1B (4.2.4.2).

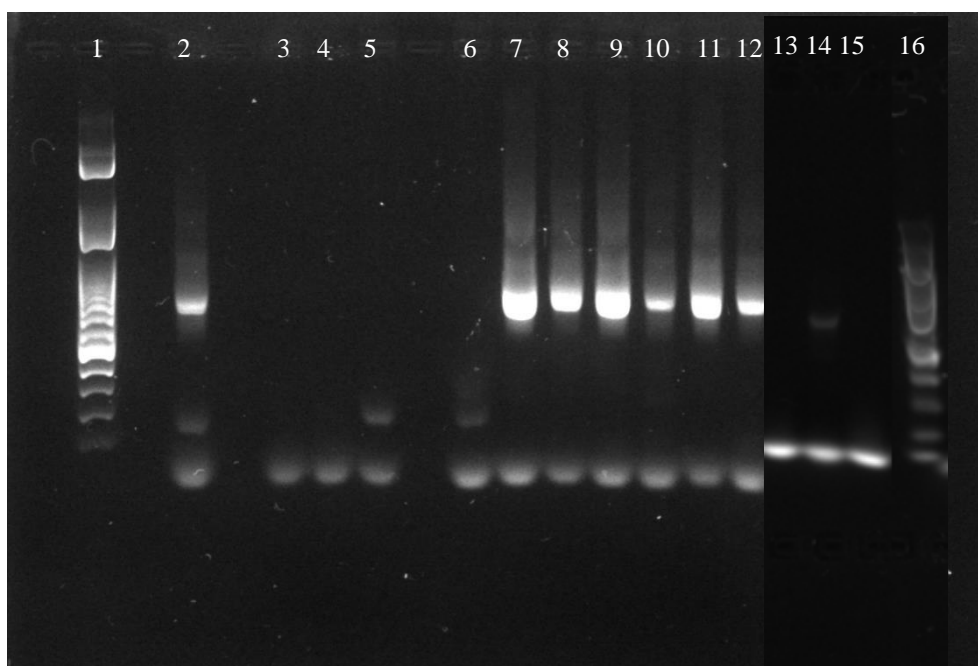
Nejmenší množství jahodové DNA, které jsme byli pomocí primerů APX1B schopni u modelových směsí detekovat bylo 0,7 ng/μl, u DNA vyizolované z komerčních směsí se jahodovou složku detekovat nepodařilo. K lepším výsledkům by bylo potřeba např. zefektivnit izolaci jahodové DNA, upravit koncentraci primerů nebo upravit teplotní profil PCR.



Obrázek 24 Komerční a modelové směsi APX1B



Obrázek 25 Komerční a modelové směsi APX1B analýza křivek tání



Obrázek 26 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (700 bp), při použití primerů APX1B (400 nM), komerční a modelové směsi

Tabulka 18 Seznam vzorků, jejich koncentrace a amplikace pro Obrázek 26 (– nedetekováno, detekce produktu: + slabé, ++ střední, +++ silné intenzity)

Běh č.	Vzorek		c DNA [ng·μl <sup>-1</sup> ]	Amplikon
1	DNA standart		–	+++
2	Jahoda:Malina	0:100	10,5	–
3	NK		–	+++
4	Hello		1,8	–
5	Sunárek		3,6	+++
6	Hipp		2,1	–
7	Jahoda:Malina	100:0	10,3	+++
8		50:50	8,2	+++
9		40:60	11,0	+++
10		30:70	7,2	+++
11		20:80	8,5	+++
12		10:90	7,0	+++
13	PK meruňka		–	–
14	PK jablko		–	+
15	PK banán		–	–
16	DNA standard		–	++

## 5.2 Stanovení obsahu celkových polyfenolů a flavonoidů

Stanovení celkových polyfenolů a flavonoidů v komerčních a modelových směsích bylo provedeno podle postupu uvedeném v kapitole 4.2.6. Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 19.

Tabulka 19 Obsah celkových polyfenolů a flavonoidů v modelových a komerčních směsích

Vzorek		Celkové polyfenoly	Celkové flavonoidy
Modelové směsi			
Jahoda [%]	Malina [%]	[mg/kg váhy]	[mg/kg váhy]
100	0	1004,42	192,59
50	50	1021,32	202,35
40	60	1052,07	218,92
30	70	953,37	198,55
20	80	1105,28	227,46
10	90	1131,60	223,04
0	100	1202,85	212,74
Komerční směsi			
		[mg/kg váhy]	[mg/kg váhy]
Hello		220,90	41,04
Sunárek		675,98	216,83
Hipp		818,21	288,46

Obsah celkových polyfenolů v jahodách se pohybuje okolo hodnot 2350 mg/kg a obsah celkových flavonoidů nabývá hodnot přibližně 450 mg/kg.

V našich vzorcích byl obsah flavonoidů i polyfenolů nižší, což mohlo být způsobeno jiným druhem jahod, než je udán ve zdrojích, různým zastoupením jahod a ostatních ovocných složek ve směsích nebo stářím směsí. [41, 42]

### 5.3 HPLC

Podle postupu 4.2.1 a 4.2.7 byly ze supernatantů komerčních a modelových směsí připraveny vzorky a provedena HPLC analýza.

Práce byla zaměřena na určitý fingerprint, na porovnání tvaru spekter (chromatogramů) všech směsí se spektry jednodruhových pyré a bylo zkoumáno, jestli se tímto způsobem podaří odhalit v těchto směsích jahodu. Chromatogram z modelové směsi obsahující čistou jahodu je uveden na Obrázku 27, všechny ostatní se nacházejí v příloze v kapitole 9.1.

Pomocí retenčních časů byly ve vzorcích detekovány látky, které jsou uvedeny v Tabulce 21. V Tabulce 22 jsou uvedena množství vybraných detekovaných látek vypočítaných z rovnic kalibračních křivek (Kapitola 4.2.7.)

Tabulka 20 Seznam analyzovaných vzorků a jejich číslování

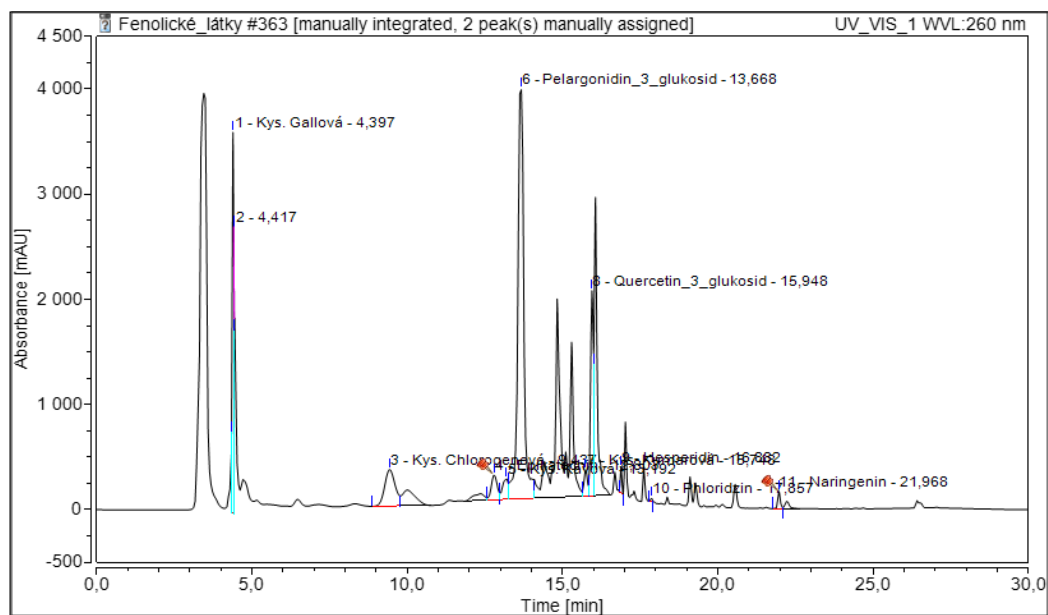
Vzorek č.	Vzorek	
1	Jahoda:Malina	100:0
2		50:50
3		40:60
4		30:70
5		20:80
6		10:90
7		0:100
8	Hello (Jablko+Jahoda)	
9	Sunárek (Jablko+Jahoda)	
10	Hipp (Jahoda+Banán+Malina)	

Tabulka 21 Látky detekované ve vzorcích (Tabulka 20), „x“ – daná látka byla ve vzorku detekována

Detekovaná látka	Vzorek									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Kyselina gallová	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Kyselina chlorogenová	x		x	x	x	x		x	x	x
Kyselina vanilová					x		x		x	
Epikatechin	x		x	x					x	
Kyselina kávová	x					x				x
Pelargonidin-3-glukosid	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Kyselina Kumarová	x	x	x	x	x	x		x	x	x
Quercetin-3-glukosid	x		x	x	x	x	x	x	x	
Hesperidin	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Phloridzin	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Resveratrol				x	x	x				
Naringenin	x									

Tabulka 22 Množství vybraných látek v analyzovaných vzorcích

Detekovaná látka	Vzorek									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Obsah [mg/kg váhy]									
Kyselina gallová	0,0170	0,0475	0,0006	0,0007	0,0007	0,0042	0,0021	0,0039	0,0425	0,0494
Pelargonidin-3-glukosid	0,0643	0,0589	0,0584	0,0411	0,0362	0,0258	0,0059	0,0002	0,0044	0,0027
Kyselina Kumarová	0,0031	0,0022	0,0035	0,0016	0,0014	0,0013	–	–	0,0011	0,0010
Quercetin-3-glukosid	0,0046	–	0,0006	0,0004	0,0124	0,0002	0,0005	0,0002	0,0031	–
Resveratrol	–	–	–	0,0034	0,0035	0,0038	–	–	–	–



Obrázek 27 Chromatogram, Vzorek 1 (modelová směs, 100 % jahoda)

U modelových směsí obsahujících jahodu byly detekovány většinou stejné látky, nejvíc se odchyloval vzorek 2 (50 % jahoda, 50 % malina), u kterého bylo detekováno mnohem méně látek a rezervatrol byl detekován pouze u vzorků 4, 5 a 6 (vzorky se zastoupením jahody 30, 20 a 10 %). Dále byly u analyzovaných vzorků detekovány i další píky, které dokazovaly přítomnost dalších látek, které však nebylo možné identifikovat.

Množství vybraných látek byla vypočítána z ploch píku dosazených do kalibračních rovnic (4.2.7). U modelových směsí lze korelaci mezi množstvím látky a množstvím jahody ve vzorku zaregistrovat pouze u pelargidin-3-glukosidu, který je pro jahodu specifický. Vzorek 1, který je složen čistě z jahod obsahuje nejvíce této látky a s postupným ubýváním jahod ve řadě směsí, se snižuje i množství pelargodin-3-glukosidu. V modelové směsi obsahující čistou malinu je množství této látky násobně nižší než i u směsi, která obsahuje pouze 10 % jahod.

Při porovnání vzorku 1 (čistá jahoda) a vzorku 7 (čistá malina) se vzorky liší obsahem několika látek. U vzorku 7 nebyla detekována kyselina chlorogenová, epikatechin a kyselina kumarová, zato u vzorku 1 detekovány byly, což by se dalo považovat za určitý rozdíl a dalo by se použít pro rozlišení těchto druhů ovoce.

Kyselina gallová, kyselina chlorogenová, hesperidin, phloridzin, quercetin-3-glukosid, kyselina kumarová, to jsou látky, které byly detekovány u všech nebo u většiny modelových směsí obsahující jahodu a komerčních směsí. Stejně tak byl u i komerčních směsí detekován pelargodin-3-glukosid (specifický pro jahodu). Byl u nich obsažen v mnohem menším množství než u modelových směsí, vzorky 8 a 9 by teoreticky měly obsahovat podobné množství jako vzorek 5, jelikož v obou případech bylo v původním pyré 20 % jahod, stejně tak vzorek 10 by měl obsahovat obdobné množství pelargodin-3-glukosidu jako vzorek 6 (10 % jahod). Nízká detekce mohla být způsobena např. tím, že jahody použité pro modelové směsi byly zmrazeny, mohly být kvalitnější než jahody obsažené v komerčních směsi nebo mělo na složení vliv různé stáří použitého ovocného materiálu a komerčních směsí.

Z výsledků můžeme vyvodit, že tato metoda má určitý potenciál, ale bylo by potřeba ji více prozkoumat a provést více měření. Možným způsobem pro zdokonalení by byla vhodnější extrakce látek, např. použití jiného rozpouštědla, nebo optimalizace použité HPLC metody.



## 6 ZÁVĚR

V experimentální části práci jsme se zabývali analýzou vzorků pomocí instrumentálních (UV-VIS spektrofotometrie, HPLC) a molekulárně-biologických (real-time PCR, agarózová gelová elektroforéza) metod.

Pomocí molekulárně-biologických metod jsme byli schopni s primery APX1B zachytit jahodovou DNA u všech modelových směsí, a to v nejmenším množství 0,7 ng/μl. U komerčních směsí se nám jahodovou složku zachytit nepodařilo.

S metodou HPLC jsme byli při zaměření na pelargonidin-3-glukosid schopni detekovat jahodu ve všech vzorcích, avšak obsah této látky byl u komerčních směsí mnohem nižší než by odpovídalo ekvivalentu u modelových směsí.

Z výsledků můžeme vyvodit, že v tomto případě je metoda HPLC úspěšnější. Obě metody potřebují optimalizovat. Možným zdokonalením molekulárně-biologické metody je úprava primerů a úprava teplotního profilu PCR. Pro HPLC by to zase mohla být vhodnější extrakce látek nebo optimalizace metody pro směsi obsahující látky specifické pro jahodu.

Po úpravě těchto metod a předpokladu, že falšování potravin je stále se rozvíjející a zdokonalující disciplína, by mohlo být účinné tyto metody zkombinovat a použít dvojí analýzu a kontrolu.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] PARDO-MATES, Naiara, Alex VERA, Sergio BARBOSA, 2017. Characterization, classification and authentication of fruit-based extracts by means of HPLC-UV chromatographic fingerprints, polyphenolic profiles and chemometric methods. *Food Chemistry* [online]. **221**, 29-38 [cit. 2020-07-27]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.10.033. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616316508>
- [2] OBÓN, J.M., M.C. DÍAZ-GARCÍA a M.R. CASTELLAR, 2011. Red fruit juice quality and authenticity control by HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. **24**(6), 760-771 [cit. 2020-07-27]. DOI: 10.1016/j.jfca.2011.03.012. ISSN 08891575. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S088915751100086X>
- [3] ČÍŽKOVÁ, Helena, [2019]. *Falšování potravin*. Praha: Verlag Dashöfer. ISBN 978-80-87963-88-3.
- [4] FÜGEL, R., R. CARLE a A. SCHIEBER, 2005. Quality and authenticity control of fruit purées, fruit preparations and jams—a review. *Trends in Food Science & Technology* [online]. **16**(10), 433-441 [cit. 2020-07-13]. DOI: 10.1016/j.tifs.2005.07.001. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224405001573>
- [5] DLOUHÁ, Jana, 2003. *Pěstujeme jahodník, maliník, ostružiník*. Praha: Brázda. ISBN 80-209-0315-1.
- [6] LUŽA, J. Rybíz, angrešt, maliny a jahody: malá pomologie 5. 1967. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1967. ISBN 07-020-67-04/44.
- [7] VACHŮN, Zdeněk, 2004. *Ovocnictví: pěstování jahodníku*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 80-715-7806-1.
- [8] HARANT, Miloš a Vladimír ZACHA, 1986. *Jahody*. 4. vydání. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. ISBN 07-108-86.
- [9] BULKOVÁ, V. Rostlinné potraviny. Vyd. 1. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2011, 162 s. ISBN 978-807-0135-327.
- [10] HANOUSEK, M. Domácí výroba moštů. 1. vyd. Praha: Grada, 2006, 75 s., ISBN 80-247-1445-0.
- [11] DAUTHY, Mircea Enachescu. Fruit and vegetables processing. Vyd. 1. Řím: Food and Agriculture Organization of the United Nations. ISBN 92-5-103657-8.
- [12] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ, 2009. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [13] ATKINSON, F. S., K. FOSTER-POWELL a J. C. BRAND-MILLER, 2008. International Tables of Glycemic Index and Glycemic Load Values: 2008. *Diabetes Care* [online]. **31**(12), 2281-2283 [cit. 2020-07-07]. DOI: 10.2337/dc08-1239. ISSN 0149-5992. Dostupné z: <http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/dc08-1239>
- [14] GIAMPIERI, Francesca, Sara TULIPANI, Josè M. ALVAREZ-SUAREZ, Josè L. QUILES, Bruno MEZZETTI a Maurizio BATTINO, 2012. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition* [online]. **28**(1), 9-19 [cit. 2020-07-07]. DOI: 10.1016/j.nut.2011.08.009. ISSN 08999007. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900711003066>
- [15] KEUTGEN, Anna J. a Elke PAWELZIK, 2008. Contribution of amino acids to strawberry fruit quality and their relevance as stress indicators under NaCl salinity. *Food Chemistry* [online]. **111**(3), 642-647 [cit. 2020-07-07]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.04.032. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608004755>

- [16] JORDÁN, V.; HEMZALOVÁ, M. Antioxidanty: zázračné zbraně: vitaminy, minerály, stopové prvky, aminokyseliny a jejich využití pro zdravý život. Vyd. 1. Brno: Jota, 2001, 153 s. ISBN 80-721-7156-9.
- [17] ROSYPAL, Stanislav, 2003. *Nový přehled biologie*. Praha: Scientia. ISBN 80-7183-268-5.
- [18] BUCHANAN, Bob B., Wilhelm GRUISSEM a Russell L. JONES, 2000. *Biochemistry & molecular biology of plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists. ISBN 978-0-943088-39-6.
- [19] ŠMARDA, Jan, 2005. *Metody molekulární biologie: a laboratory manual*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-3841-1.
- [20] SINGLETON, Paul. *Dictionary of DNA and genome technology*. 2nd ed. Chichester [u.a.]: Wiley-Blackwell, 2010. ISBN 978-0-470-74731-5
- [21] VARMA, Astha, Harish PADH a Neeta SHRIVASTAVA, 2007. Plant genomic DNA isolation: An art or a science. *Biotechnology Journal* [online]. **2**(3), 386-392 [cit. 2020-07-07]. DOI: 10.1002/biot.200600195. ISSN 18606768. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/biot.200600195>
- [22] VONDREJS, Vladimír a Zuzana STORCHOVÁ, 2003. *Genové inženýrství*. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-0586-4.
- [23] WALKER, John M. a Ralph RAPLEY, 2000. *Molecular biology and biotechnology*. 4th ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry. ISBN 0-85404-606-2.
- [24] SINDEN, R.R. *DNA structure and function*. San Diego: Academic Press, c1994. ISBN 0126457506.
- [25] ZVÁROVÁ, J. a I. MAZURA. *Metody molekulární biologie a bioinformatiky*. Praha: Karolinum, 2012. Biomedicínská informatika. ISBN 9788024621500.
- [26] KOETSIER, Giron a Eric CANTOR, 2019. A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers. In: *Bioke* [online]. Ipswich: New England Biolabs [cit. 2020-07-07]. Dostupné z: <https://www.bioke.com/support/appnotes/1345/a-practical-guide-to-analyzing-nucleic-acid-concentration-and-purity-with-microvolume-spectrophotometers.html>
- [27] CLARK, David P., Nanette J. PAZDERNIK a Michelle R. MCGEHEE, 2019. Polymerase Chain Reaction. *Molecular Biology* [online]. Elsevier, 2019, s. 168-198 [cit. 2020-07-07]. DOI: 10.1016/B978-0-12-813288-3.00006-9. ISBN 9780128132883. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128132883000069>
- [28] ŠPANOVÁ, A. a B. RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010, 86 s. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [29] PCR Setup—Six Critical Components to Consider. *ThermoFisher* [online]. [cit. 2020-07-14]. Dostupné z: <https://www.thermoFisher.com/cz/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-component-considerations.html>
- [30] Absolute Quantification of Gene Expression using SYBR Green in the Eco™ Real-Time PCR System, 2010. In: *Illumina* [online]. San Diego [cit. 2020-07-07]. Dostupné z: [https://www.illumina.com/Documents/products/technotes/technote\\_eco\\_absolute\\_quantification\\_using\\_sybrgreen.pdf](https://www.illumina.com/Documents/products/technotes/technote_eco_absolute_quantification_using_sybrgreen.pdf)
- [31] IBARRONDO, Oliver, Andrés LOPEZ-OCEJA, Miriam BAETA a Marian M. DE PANCORBO, 2019. A Statistical Method to Enhance the Analysis of the Differences Among High-Resolution Melting (HRM) Curves of PCR-Amplified DNA Fragments. *Journal of Food Science* [online]. **84**(10), 2719-2728 [cit. 2020-07-07]. DOI: 10.1111/1750-3841.14814. ISSN 0022-1147. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1750-3841.14814>

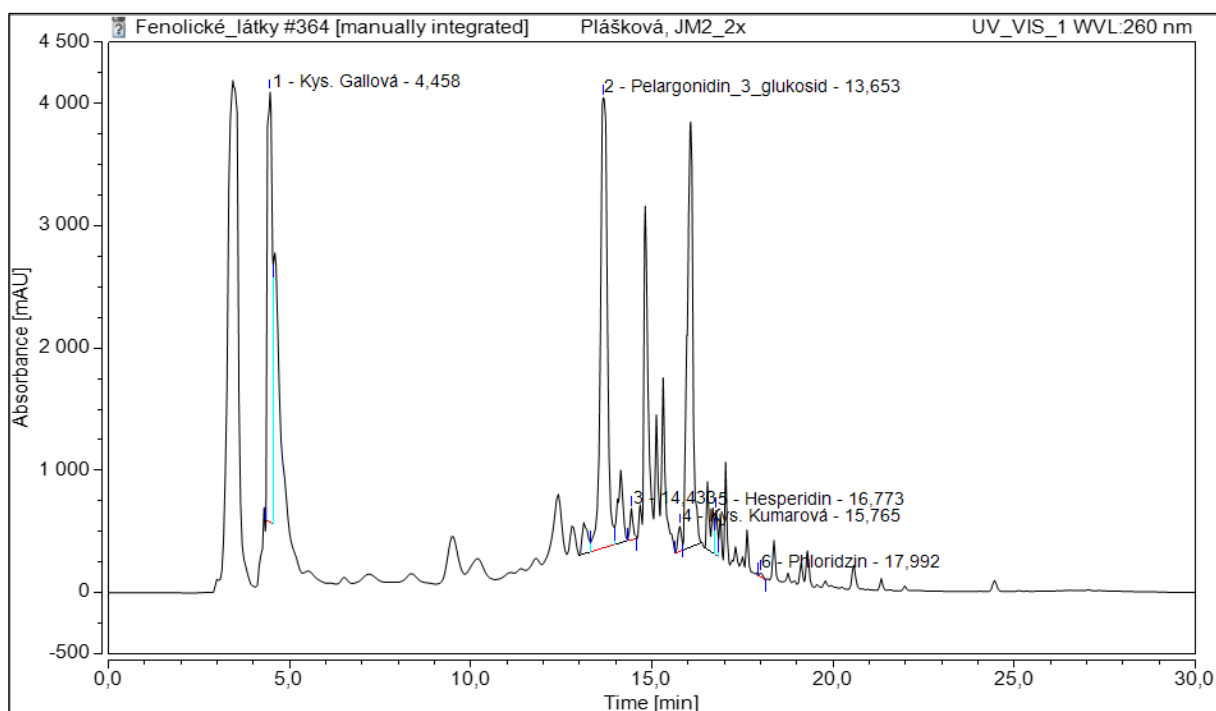
- [32] MAZURA, Ivan, 1999. *Speciální metody molekulární biologie*. Praha: Karolinum. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0258-X.
- [33] P. KLOUDA, Moderní analytické metody, 2. vydání, Ostrava, 2003, s. 9–26, ISBN 80-86369-07-2
- [34] Laboratory info, High Performance Liquid Chromatography: Principle, Types, Instrumentation and Applications [cit. 2020-6-25]. Dostupné z: <http://laboratoryinfo.com/hplc/>
- [35] L. NOVÁKOVÁ, M. DOUŠA a kol. Moderní HPLC separace v teorii a praxi I, 2013, ISBN 978-80-260-4243-3
- [36] BOSÁKOVÁ. Separace [online] 2012 [cit. 2020-06-21]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/analchem/bosakova/separace.pdf>
- [37] ELKHADRAGY, Manal F. a Ahmed E. ABDEL MONEIM, 2017. Protective effect of *Fragaria ananassa* methanolic extract on cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>)-induced hepatotoxicity in rats. *Toxicology Mechanisms and Methods* [online]. **27**(5), 335-345 [cit. 2020-07-03]. DOI: 10.1080/15376516.2017.1285973. ISSN 1537-6516. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15376516.2017.1285973>
- [38] CHEN, Shilin, Hui YAO, Jianping HAN, et al., 2010. Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. *PLoS ONE* [online]. **5**(1) [cit. 2020-07-29]. DOI: 10.1371/journal.pone.0008613. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0008613>
- [39] SARGENT, D. J., A. RYS, S. NIER, D. W. SIMPSON a K. R. TOBUTT, 2006. The development and mapping of functional markers in *Fragaria* and their transferability and potential for mapping in other genera. *Theoretical and Applied Genetics* [online]. **114**(2), 373-384 [cit. 2020-07-29]. DOI: 10.1007/s00122-006-0441-9. ISSN 0040-5752. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00122-006-0441-9>
- [40] Assessment of Nucleic Acid Purity, 2015. In: *ThermoFisher* [online]. [cit. 2020-07-27]. Dostupné z: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>
- [41] PÉREZ-JIMÉNEZ, J, V NEVEU, F VOS a A SCALBERT, 2010. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *European Journal of Clinical Nutrition* [online]. **64**(S3), S112-S120 [cit. 2020-07-26]. DOI: 10.1038/ejcn.2010.221. ISSN 0954-3007. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/ejcn2010221>
- [42] WIN A, Nyo AMT, Moe WW et.al. Study on total flavonoid content of fruit of *Fragaria × ananassa* Duch. *International Journal of Research and Review*. 2019; 6(8):252-255

## **8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ**

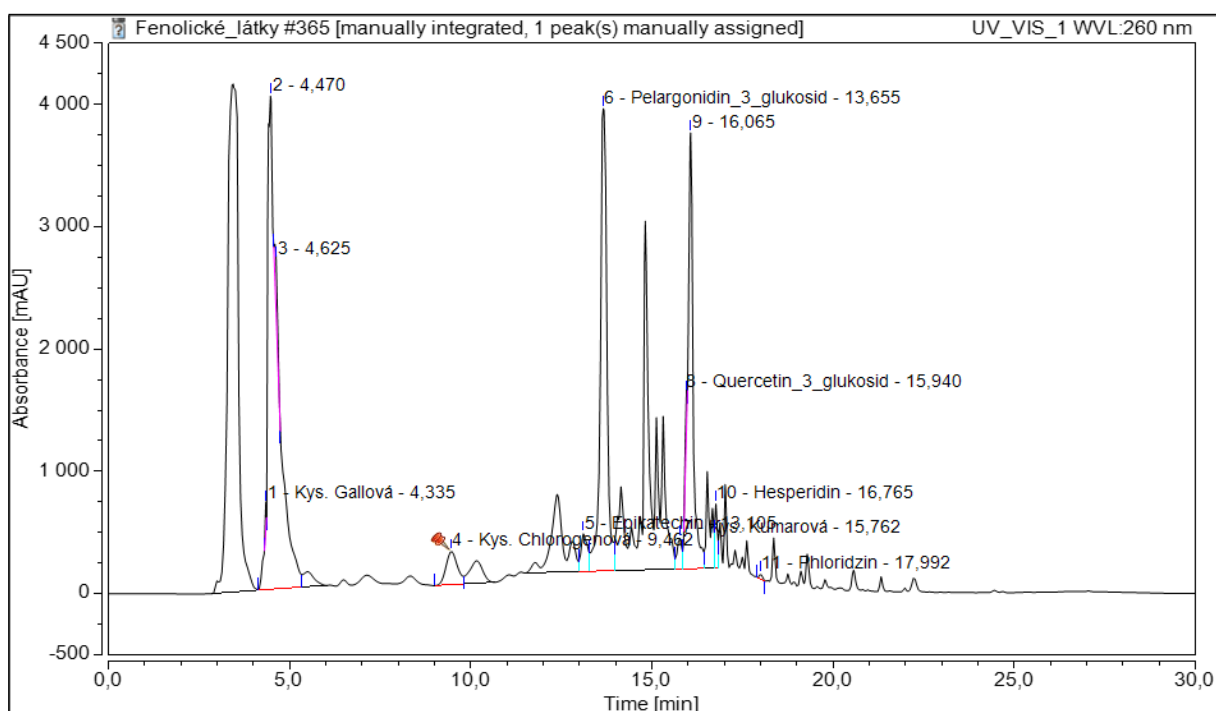
- DNA: Deoxyribonukleová kyselina
- RNA: Ribonukleová kyselina
- ATP: Adenosintrifosfát
- EDTA: Ethylendiamintetraoctová kyselina
- PCR: Polymerázová řetězová reakce
- CTAB: Cetrimoniumbromid
- TBE: Trisborát EDTA pufr
- HPLC: Vysokoučinná kapalinová chromatografie
- HRM: Vysokorozlišovací analýza křivek tání
- UV: Ultrafialové záření
- bp: počet párů bází

## 9 PŘÍLOHY

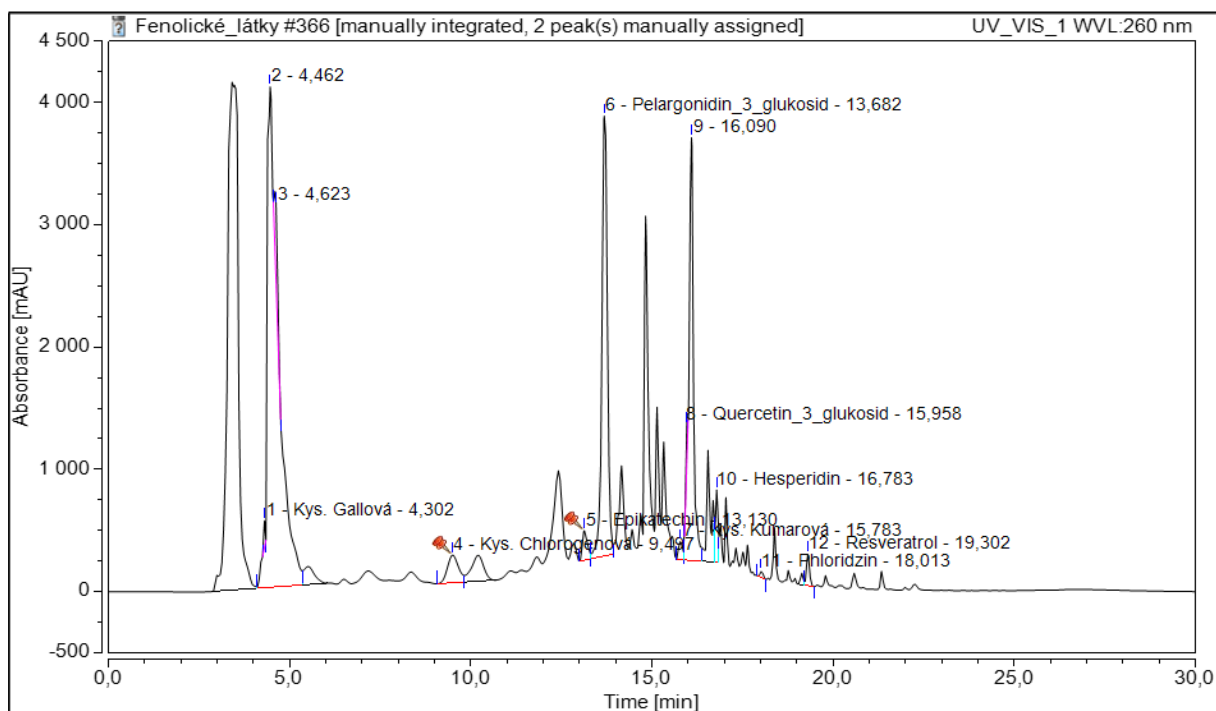
### 9.1 Chromatogramy



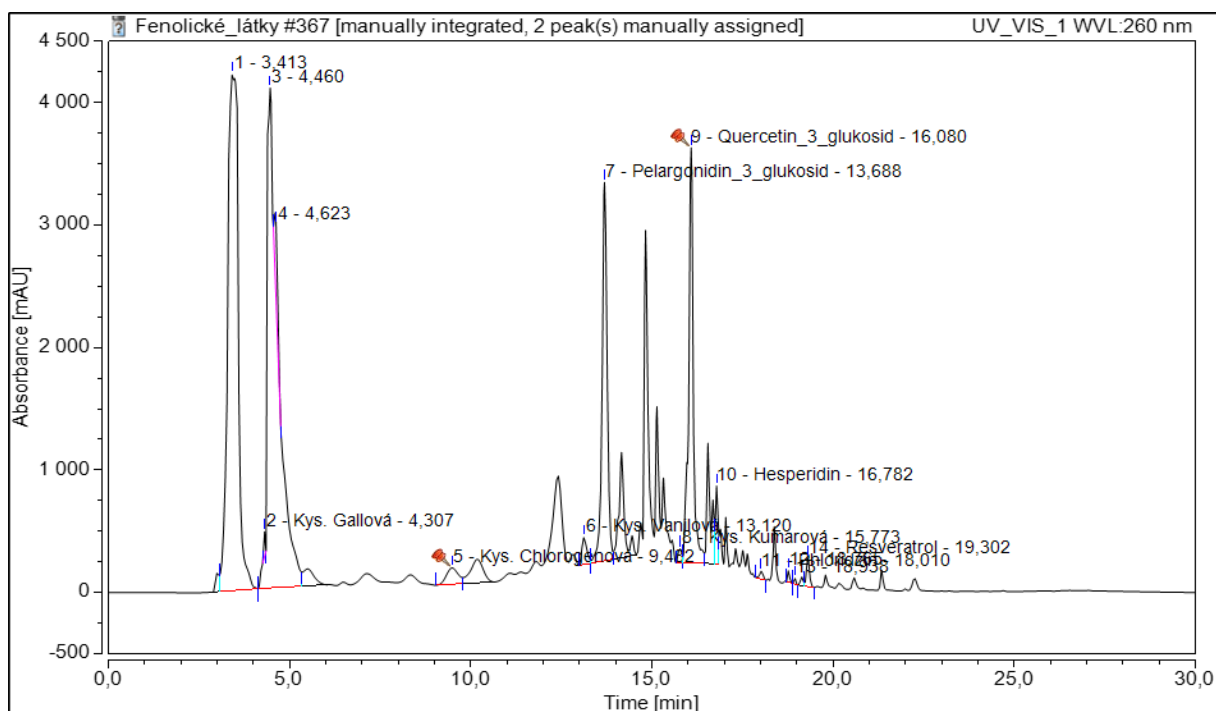
Obrázek 28 Chromatogram, Vzorek 2 (modelová směs, 50 % jahoda, 50 % malina)



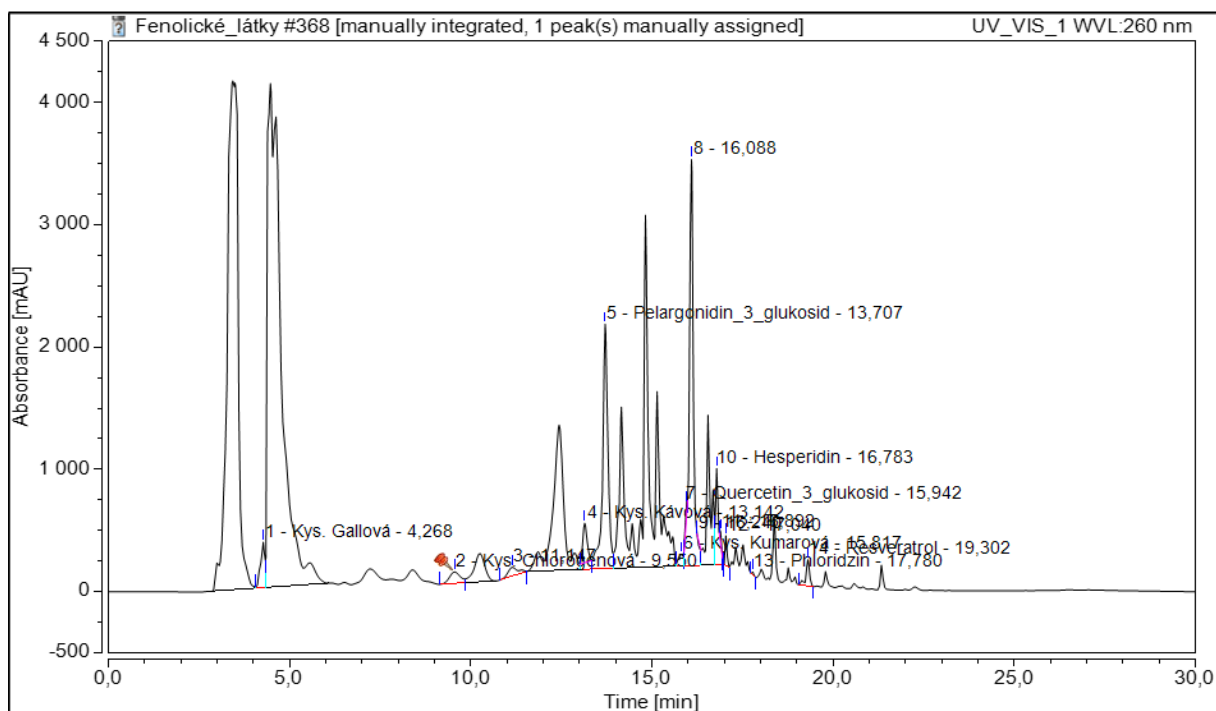
Obrázek 29 Chromatogram, Vzorek 3 (modelová směs, 40 % jahoda, 60 % malina)



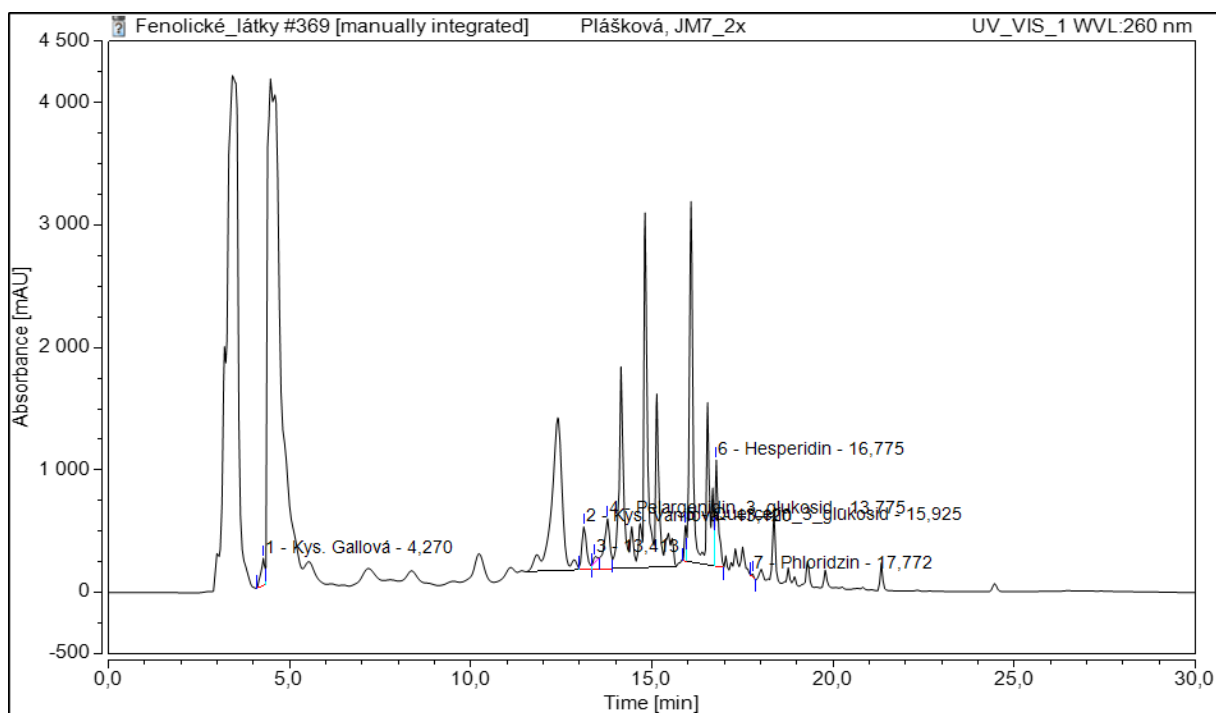
Obrázek 30 Chromatogram, Vzorek 4 (modelová směs, 30 % jahoda, 70 % malina)



Obrázek 31 Chromatogram, Vzorek 5 (modelová směs, 20 % jahoda, 80 % malina)

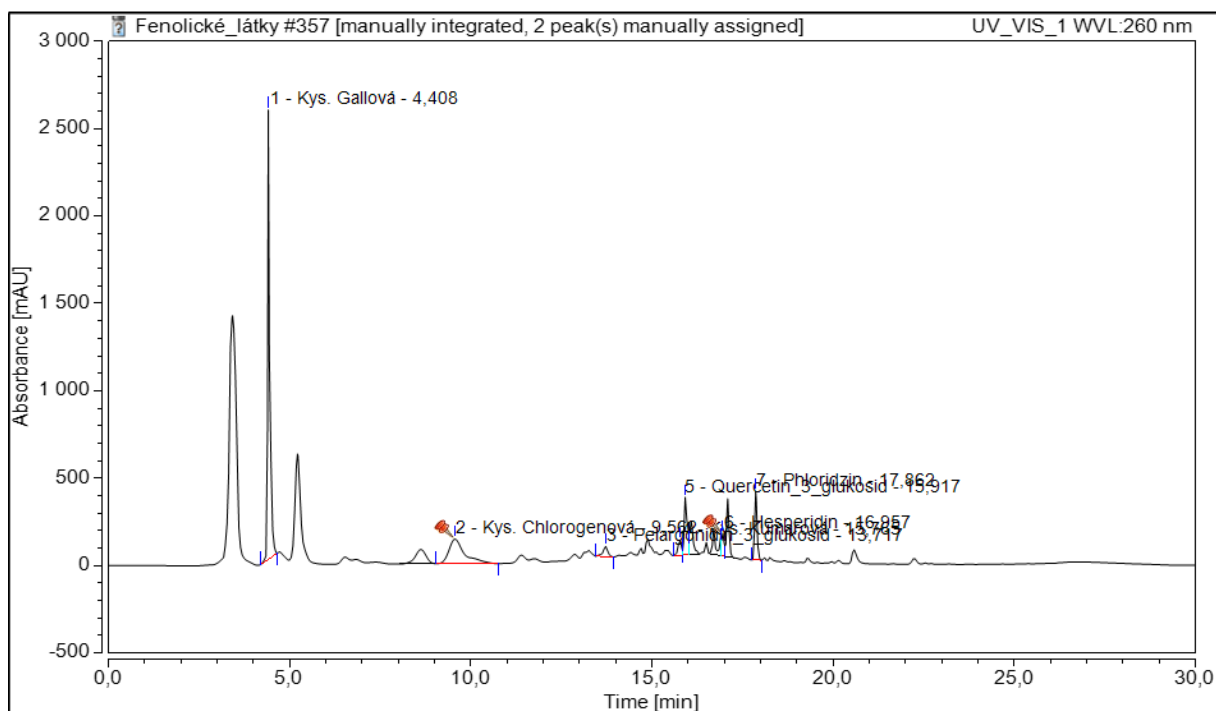


Obrázek 32 Chromatogram, Vzorek 6 (modelová směs, 10 % jahoda, 90 % malina)

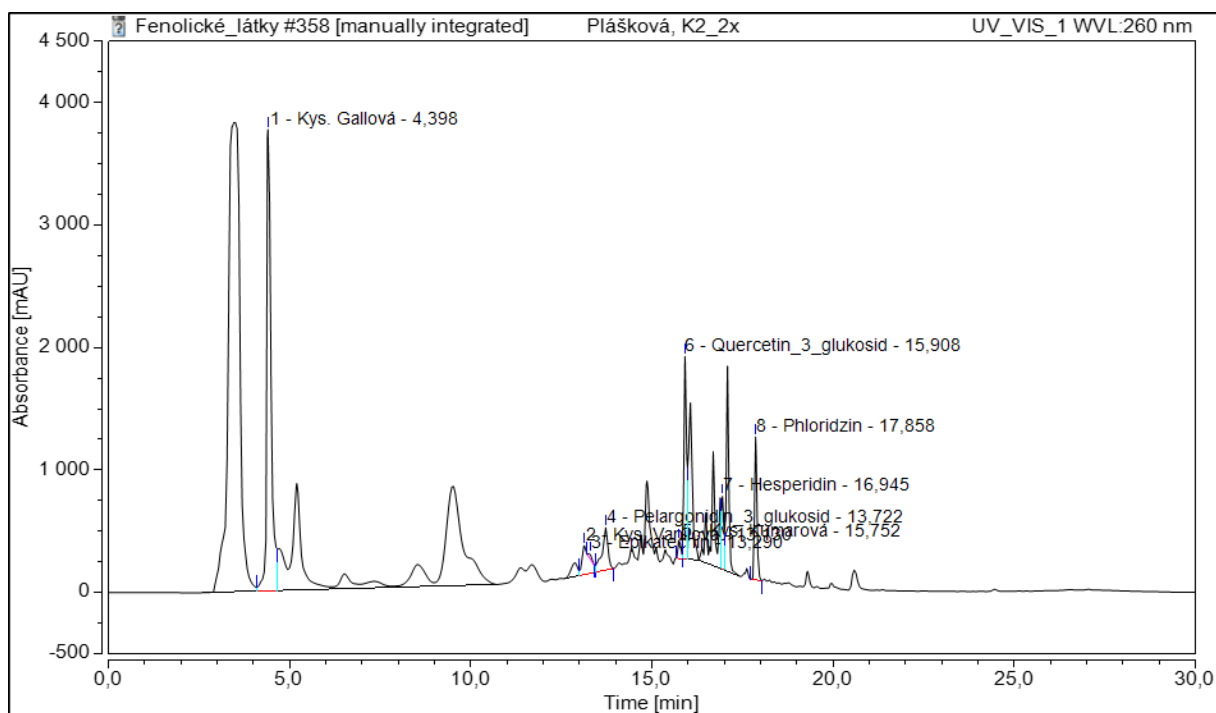


Obrázek 33 Chromatogram, Vzorek 7 (modelová směs, 100 % malina)

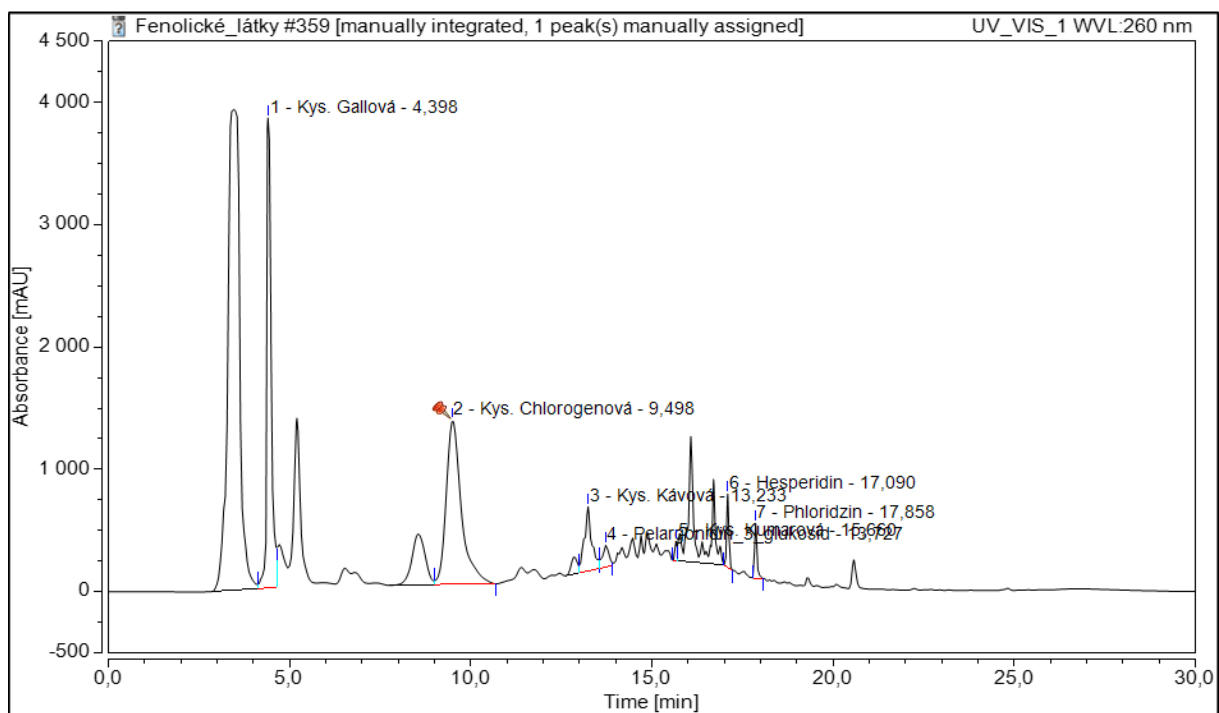




Obrázek 34 Chromatogram, Vzorek 8 (komerční směs, Hello)



Obrázek 35 Chromatogram, Vzorek 9 (komerční směs, Sunárek)



Obrázek 36 Chromatogram, Vzorek 10 (komerční směs, Hipp)