



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

**IDENTIFIKACE ROSTLINNÉ DNA V KOMPLEXNÍ
MATRICI POMOCÍ MOLEKULÁRNÍCH TECHNIK**

IDENTIFICATION OF DNA FROM PLANT FOODS USING MOLECULAR TECHNIQUES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

František Papala

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Andrea Němcová, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1578/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **František Papala**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Andrea Němcová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Identifikace rostlinné DNA v komplexní matici pomocí molekulárních technik

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) rešerše – molekulární techniky identifikace DNA
- 2) metody izolace a charakterizace rostlinné DNA
- 3) identifikace rostlinné DNA v komplexní modelové matici pomocí PCR
- 4) vyhodnocení výsledků

Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2020:

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

František Papala
student(ka)

Ing. Andrea Němcová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cílem bakalářské práce je identifikace rostlinné DNA v komplexní matici pomocí molekulárních technik. Práce nejprve vychází z rešerše literárních zdrojů zaměřených na molekulární techniky identifikace DNA a pak se teoreticky zabývá metodami izolace a charakterizace rostlinné DNA. Konkrétně se bude pracovat s DNA borůvky. V experimentální části byla měřena čtveřice komerčních produktů, ze kterých byla izolována DNA a následně byla podrobena PCR a HRM analýze.

ABSTRACT

The aim of this bachelor thesis is the identification of plant DNA in a complex matrix using molecular techniques. The work first focuses on a search of literature sources concerned with molecular techniques of DNA identification. Next, it deals theoretically with methods of isolation and characterization of plant DNA. Specifically, we shall work with blueberry DNA. In the experimental part, DNA from four commercial products was isolated and subsequently subjected to PCR and HRM analysis.

KLÍČOVÁ SLOVA

Izolace rostlinné DNA, borůvka, real-time PCR, HRM analýza

KEY WORDS

Isolation of Plant DNA, Blueberry, Real-time PCR, HRM Analysis

PAPALA, František. *Identifikace rostlinné DNA v komplexní matici pomocí molekulárních technik*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123934>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Andrea Němcová.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji Ing. Andree Němcové, Ph.D. a Ing. Lence Fialové za podmětne připomínky a za vedení při experimentální části mé bakalářské práce.

1	Úvod	7
2	Teoretická část	8
2.1	Brusnice borůvka.....	8
2.2	Brusnice chocholičnatá.....	8
2.3	Rostlinná buňka.....	9
2.3.1	Cytologie.....	9
2.4	Izolace a purifikace DNA	11
2.5	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA.....	12
2.6	Metody identifikace rostlinné DNA.....	13
2.6.1	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	13
2.6.2	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (real-time PCR).....	14
2.6.3	Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM)	15
2.7	Další metody identifikace PCR produktů	15
2.7.1	Elektroforéza.....	15
2.8	Současný stav řešené problematiky.....	16
3	Experimentální část.....	17
3.1	Materiál.....	17
3.1.1	Použité vzorky mléčných výrobků s ovocnou složkou	17
3.1.2	Použité vzorky dětských příkrmů.....	17
3.2	Přístroje a pomůcky	18
3.3	Chemikálie	19
3.4	Komponenty pro PCR	19
3.5	Pracovní postupy	19
3.5.1	Izolace DNA	19
3.5.2	Stanovení koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky	20
3.5.3	PCR	20
3.5.4	Gelová elektroforéza PCR produktů	23
3.5.5	HRM analýza	23
4	Výsledky	24
4.1	Stanovení koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky.....	24
4.2	Dokázání přítomnosti borůvčí DNA pomocí metody real-time PCR a gelové elektroforézy.....	25
4.3	Dokázání výskytu DNA borůvek pomocí metody real-time PCR a gelové elektroforézy.....	27

4.4	Dokázání výskytu DNA borůvek izolovaných z komerčních produktů pomocí metody real-time PCR a následná HRM analýza pro detailnější výsledky	34
5	Diskuze	35
5.1	Stanovení koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky.....	35
5.2	Real-time pcr izolované DNA z borůvky kanadské.....	36
5.3	Real-time pcr izolované DNA z borůvky evropské	37
5.4	Real-time pcr izolované DNA z komerčních produktů	37
5.5	HRM analýza:	37
6	Závěr:.....	38
7	Literatura:.....	39
8	Seznam použitých zkratk	41

1 ÚVOD

Celá řada potravinářských výrobků obsahuje ovocnou složku. V reklamních sděleních pak výrobci argumentují prospěšností těchto složek, jejich účinky na lidské zdraví. Pro běžného spotřebitele je téměř nemožné odhalit, zda výrobek obsahuje to, co je na etiketě výrobku deklarováno. Právě možnosti zjištění složek potravinářských výrobků vedlo autora této bakalářské práce k spolupodílení se na projektu k analýze obsahu a stanovení autenticity potravin.

Cílem práce je identifikace rostlinné DNA v komplexní matici pomocí molekulárních technik. V práci bude nejprve provedena rešerše literárních zdrojů zaměřených na molekulární techniky identifikace DNA. Poté se práce bude teoreticky zabývat metodami izolace a charakterizace rostlinné DNA, ze kterých vyjde konkrétní postup pro izolaci a identifikaci. V laboratoři se bude identifikovat DNA pomocí metody PCR. Následně se vyhodnotí výsledky pomocí identifikačních technik. Ovocná složka bude zkoumána v reálných výrobcích, které jsou běžně dostupné v obchodní síti.

Rostlinou, ze které bude izolována DNA, byla určena borůvka. Rozlišujeme dva hlavní typy borůvek, a to borůvka brusnice, taktéž zvaná evropská a borůvka chocholičnatá neboli kanadská. Rozdíl mezi brusnicí borůvkou a chocholičnatou je nejen v původu a místech výskytu, ale také v obsahu anthokyaninů. Brusnice borůvka má anthokyaniny ve slupce, i v dužině, tedy v celém plodu. Brusnice chocholičnatá je má pouze ve slupce, dužina je už neobsahuje.

Jsou tyto borůvky od sebe na základě molekulárních technik odlišitelné? I na to se bude snažit najít odpověď tato bakalářská práce.

2 TEORETICKÁ ČÁST

V teoretické části práce bude definována borůvka jako objekt výzkumu. Dále bude definována rostlinná buňka a základní metody izolace a detekce rostlinné DNA.

2.1 Brusnice borůvka

Brusnice borůvka (*Vaccinium myrtillus*), taktéž zvaná evropská, je opadavý, přizemní rozložitý keřík, který je nepravidelně a řídkce uspořádan. Dorůstá většinou patnáct až šedesát centimetrů, výjimečně více. Listy jsou vejčité eliptické, okrouhle vejčité nebo kopinatě vejčité, s krátkými řapíky zelené barvy, na podzim se obarvují do červena. V úžlabí listů vykvétají květy. Koruna je kulovitě baňkovitá, barva je bílá přes nazelenalou až do červena, s krátkými a nazpět ohnutými cípy. Kveté od dubna do června. Plody jsou černomodré, výjimečně bělavé, většinou kulovitěho tvaru. Roste od Evropy až po severní Asii. Brusnice borůvka tvoří rozlehlé porosty v určitých typech oblastí, jako jsou acidofilní jehličnaté a listnaté lesy, paseky, vřesoviště, pastviny a na půdách kyselých a živinami chudých, humózních. U nás je rozšířena po celém území, na horách se vyskytuje běžně, ale v teplých oblastech už méně. Je popsáno velké množství odchylek hodnocených jako formy nebo variety, a to především v oblasti výšky, tvarů a velikostí listů a plodu. Plody, zvané borůvky, se používají jak v kuchyni, tak v lidovém léčitelství. [1], [2]

V borůvkách lze nalézt velké množství polyfenolických sloučenin, flavonoidy, anthokyaniny, fenolické kyseliny, taniny a ellagitaniny. To všechno jsou látky, které mohou rušit PCR a chceme je odstranit při čištění a izolaci DNA. [4]

2.2 Brusnice chocholičnatá

Brusnice chocholičnatá neboli kanadská borůvka (*Vaccinium corymbosum*) je opadavý keř se vzpřímeným růstem. Většinou dorůstá výšky 60-150 centimetrů, ale jsou i případy kdy borůvkový keř dorostl 2,5 metru. Listy jsou krátce řapíkaté, vejčité nebo eliptické, na podzim zbarvené do oranžova až do šarlatové barvy. Květy bývají bílé, občas načervenalé. Koruna je baňkovitá až vejcovitá. Kalich nabývá modré barvy. Kveté v květnu. Plody jsou modré až fialové, většinou kulovitěho tvaru, a nabývají větších rozměrů než plody brusnice borůvky. Výskytem brusnice chocholičnaté jsou louky, rašeliniště, či vlhké lesy. Má ráda kyselé půdy. Jak už název napovídá, pochází z Kanady a je to nejpěstovanější borůvka v Americe. [3]

Rozdíl mezi brusnicí borůvkou a chocholičnatou je nejen v původu a místech, kde se pěstují, ale také ohledně anthokyaninů. Brusnice borůvka má anthokyaniny ve slupce, i v dužině, tedy v celém plodu. Brusnice chocholičnatá je má pouze ve slupce, dužina je už neobsahuje. [5]

2.3 Rostlinná buňka

Rostlinná buňka je podtyp eukaryotické buňky. Rostlinná buňka je tvořena protoplastem a buněčnou stěnou, jenž je na povrchu. Protoplast je vymezený cytoplazmatickou membránou a obsahuje jádro, buněčné organely, membrány, vakuoly a inkluze. Tyto celky jsou roztroušené v cytosolu a popsány níže [15], [23].

2.3.1 Cytologie

2.3.1.1 Vakuola

Vakuoly vznikají splýváním lyzozomů. Nejrozměrnější membránové organely, které někdy představují většinu buněčného obsahu. Vakuoly drží zásoby aminokyselin, polyfosfátů a draselných iontů a někdy jsou to místa rozkladu některých enzymů a buněčných struktur [15], [23].

2.3.1.2 Cytoplazmatická membrána

Cytoplazmatická membrána je složená převážně z lipidů a proteinů. Slouží jako bariéra, která brání úniku obsahu buňky do okolního prostředí. Zároveň zajišťuje průchod živin do buňky a vylučování odpadních látek z buňky do okolí. Proto je cytoplazmatická membrána prolnuta vysoce selektivními pumpami a kanálky, tvořenými molekulami proteinů. Ostatní proteiny v membráně působí jako čidla, díky nimž může buňka odpovídat na změny v okolním prostředí. Má pozoruhodné mechanické vlastnosti, může se deformovat, aniž by se trhala. Při proděravění se nezhroutí dovnitř ani nezůstane potrhána, ale rychle se zacelí [15], [23].

2.3.1.3 Endoplazmatické retikulum

Endoplazmatické retikulum je soubor cisteren a váčků, které jsou uloženy často okolo jádra ve vnitřní cytoplazmě. Retikulum syntetizuje proteiny a lipidy pro další membránové organely. Endoplazmatické retikulum je dvojího typu [15], [23]:

- drsné, na jehož povrchu přisedají ribozomy, na jejich površích probíhá syntéza membránových proteinů, uvnitř probíhá syntéza většiny buněčných lipidů
- hladké, na které se ribozomy nevážou. Uvnitř probíhají různé přeměny a biosyntézy.

2.3.1.4 Golgiho aparát

Golgiho aparát navazuje funkčně a často i prostorově na endoplazmatické retikulum. Je to soubor cisteren, ve kterých probíhá úprava, třídění a balení proteinů a lipidů pro sekrece nebo k předání jiné organelle [15], [23].

2.3.1.5 Jádro

Každá buňka, jež se může dělit, obsahuje jádro. Jádro je skoro nezbytné pro dlouhodobé přežívání buněk. Má tři hlavní úlohy, regulaci diferenciaci a maturace buňky, potom replikaci a přenos genetické informace do nové buňky a poslední úlohou je syntéza informační RNA, transferové RNA a ribosomální RNA a jejich transport do cytoplasmy [15], [23].

- **Deoxyribonukleová kyselina**

Je obecně označována jako DNA (z anglického Deoxyribonucleic Acid). Je to molekula, nese genetické pokyny pro vývoj, fungování, růst a reprodukci všech známých organismů a mnoha virů. Nukleové kyseliny (DNA a RNA) jsou jedny ze čtyř nezbytných makromolekul pro všechny formy života [23].

Díky fosforečnanovým skupinám je DNA nabitá záporně, a proto má polární charakter. Je tedy rozpustná ve vodě, a naopak v ethanolu se sráží. DNA je většinou složena ze dvou vzájemně komplementárních řetězců, které se v prostoru točí kolem sebe a tvoří dvojistou šroubovici, takzvaný double helix, který se může denaturovat, rozplést pomocí zvýšené teploty, zásaditého prostředí nebo nízké iontové síly. DNA má absorpční maximum v UV oblasti při vlnové délce 260 n. m.

2.3.1.6 Mitochondrie

Mitochondrie jsou semiautonomními organelami, přítomné téměř ve všech eukaryotických buňkách. Mají vlastní kružnicovou DNA, vlastní ribozomy a vyznačují se vlastní proteosyntézou, která se podobá proteosyntéze probíhající v bakteriálních buňkách.

Mají hladkou vnější membránu, která je dobře propustná pro polární látky. Vnitřní membrána vytváří mnoho vychlípenin, zvaných kristy a je velmi hojně osazena enzymovými komplexy

dýchacího řetězce, ATPázy i membránovými přenašeči. Uvnitř je mitochondriální matrix obsahující enzymy aerobních metabolických drah [15], [23].

2.3.1.7 Cytoplazma

Cytoplazma je roztok, který v buňce vyplňuje prostor mezi organelami. Je to místo, kde dochází ke spoustě chemických reakcí, které jsou stavebním kamenem buňky. Dochází zde k jednomu z klíčových dějů v buňce – syntéze proteinů. Tento proces probíhá v ribozomech [15], [23].

2.3.1.8 Buněčná stěna

Buněčná stěna je pevná struktura složená z různých polysacharidů v závislosti na organismu. Buněčná stěna rostlin je tvořena celulózovými vlákny a amorfními hmotami, pektiny a hemicelulózou. Ve zdřevnatělých částech je buněčná stěna prostoupena ligninem. Buněčná stěna rostlin zastává několik hlavních funkcí. První z funkcí je sklad makromolekulárních látek. Druhá funkce je tvorba ochranného obalu, který chrání rostlinu před prostředím a patogeny v něm. Poté je kostrou buňky, bránící její expanzi. Expanze může nastat kvůli osmóze a v poslední řadě zastává mechanickou strukturu v rámci celé rostliny [15], [23].

2.3.1.9 Chloroplasty

Vnější membrána chloroplastů je podobně propustná jako vnější membrána mitochondrií. Přílehlá vnitřní membrána už má propustnost specifickou. Vnitřní membrána obklopuje základní hmotu chloroplastů – stroma obsahující enzymy, které katalyzují reakce temnotní fáze fotosyntézy. Ve stromatu jsou uzavřeny tylakoidy, ploché membránové váčky, v jejichž membránách jsou vestavěny molekuly zodpovědné za zachycení a využití světelné energie [15], [23].

2.4 Izolace a purifikace DNA

Prvním krokem molekulárních metod založených na analýze DNA je izolace a purifikace DNA z buněk a jejich následné oddělení od ostatních buněčných složek. Kvalita extraktovaného materiálu ovlivňuje úspěšnost následujících postupů. Úkolem je dostat DNA v nativním stavu, v odpovídající čistotě a množství. Nejčastěji jsou využívány tři principy izolace DNA.

1. Extrakce na pevné fázi využívá toho, že se DNA váže na oxid křemičitý. Přítomné chaotropní soli v roztoku DNA a oxidu křemičitého narušují vodíkové vazby mezi vlákny DNA, a tím ulehčují vazbu DNA na oxid

křemičitý. Zbytek roztoku je vymyt pomocí ethanolu, včetně chaotropních solí a dalších nečistot. DNA bývá následně eluována z oxidu křemičitého vodným roztokem s nízkým obsahem soli [17], [16].

2. Izolace DNA pomocí ultracentrifugace probíhá nejčastěji v roztoku chloridu cesného, protože jeho hustota je blízká hustotě DNA. Při vysokých otáčkách a vysokém přetížení dochází k vytvoření koncentračního gradientu, kdy nižší koncentrace je blíž k ose. DNA je poté rozdělena podle různých parametrů. Těžší složky budou klesat blíž ke dnu zkumavky a lehčí naopak budou stoupat nahoru [10].
3. Extrakce směsi fenol-chloroform je využívána pro odstranění proteinů pomocí směsi fenolu a chloroformu, které se nemísí s vodou, a tím pádem tvoří s vodným prostředím dvě fáze. Po promíchání směsi dochází k denuraci bílkovin a jejich vysrážení. Použitím fenolu v zásaditém pufru nukleové kyseliny zůstávají ve vodní fázi. Následně se DNA vysoluje za přítomnosti vysoké koncentraci vhodné soli. Poté se DNA z roztoku sráží pomocí málo polární látky jako je ethanol nebo isopropanol. Vysrážená DNA se promývá 70% ethanolem. Alkohol rozpustí zbytky bílkovin a solí. Po jeho odpaření se DNA opět rozpustí ve vodném roztoku, který většinou obsahuje EDTA, inhibitor nukleáz a pufr Tris-HCL.

Různé metody se využívají pro různé následné analýzy. Konkrétně metoda PCR nevyžaduje velká množství DNA ani vysokou integritu jejích molekul. Potřebuje být zbavena možných inhibitorů. Metody mají společné některé kroky. Prvním je homogenizace použitého materiálu, který by měl být čerstvý, zmražený nebo lyofylizovaný, aby DNA nedegradovala pomocí enzymů v buněčném extraktu. Následně je prováděna lyze buněk, pomocí detergentů, chelatačních činidel či enzymů. Poté se DNA přečišťuje od RNA a proteinů, které mohou DNA degradovat nebo se na ní vázat a od polysacharidů a fenolických látek, které ruší UV-VIS stanovení koncentrace a inhibují PCR. Nakonec se DNA očišťuje od zbylých složek jako jsou detergenty, soli, složky lyzačního roztoku, popřípadě jiných nečistot [9].

2.5 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Spektrofotometrie je důležitá analytická metoda, která se používá u biochemických experimentů zahrnujících práci s DNA, RNA, proteiny a dalšími látkami. Vzorky těchto složek nebývají ve velkém množství, a proto jsou vhodné pro tuto nedestruktivní techniku.

Spektrofotometrie funguje na principu, kdy měří vlastnosti vzorku pomocí jeho pohlcování světla v různých vlnových délkách. Spektrofotometr porovnává absorbanci slepého vzorku se vzorkem obsahujícího barevnou sloučeninu, která vzniká obarvením nebo reakcí vzorku. Pomocí standardizační křivky je schopna určit množství látky ve vzorku [12].

Hodnoty poměru neznečištěné DNA se pohybují okolo 1,8-2. Hodnoty pod toto rozmezí značí nízkou koncentraci, znečištění proteiny nebo organickými látkami jako je například fenol, hodnoty nad toto rozmezí značí znečištění RNA [13].

2.6 Metody identifikace rostlinné DNA

2.6.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR je metoda používána k replikaci nukleových kyselin. Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5' → 3' prostřednictvím DNA-polymerázy. Úsek nukleotidové posloupnosti je určen připojením dvou primerů, které se připojují na opačné řetězce DNA tak, že jejich 5'-konce směřují od sebe. S DNA-polymerázou a nukleotidy se poté syntetizují nové vlákna na obou matricových řetězcích. K syntéze se využívá termostabilní polymerázy odolávající teplotám, při kterých DNA denaturuje. Při PCR se opakují tři kroky [8]:

1. Denaturace dvouřetězcových molekul DNA
2. Připojení primerů k odděleným řetězcům
3. Syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA-polymerázy

Postupným opakováním těchto kroků se exponenciálně (2^n , n = počet cyklů) vytváří až miliardy kopií vybraného cílového úseku molekuly. Díky správnému návrhů primerů docílíme přesné a úspěšné PCR při amplifikaci. Výsledným produktem PCR jsou amplikony – úseky DNA definované délkou, jenž se prokazují elektroforézou v agarosovém nebo polyakrylamidovém gelu. Reakční směs pro PCR obsahuje nezbytné komponenty, kterými jsou:

1. Termostabilní polymeráza (taq polymeráza), což je enzym katalyzující polymerizační reakci.
2. Hořčnaté kationty, působící jako kofaktor enzymu DNA polymerázy, a ještě ovlivňuje schopnost tání DNA.

3. Deoxyribonukleotidy jako stavební jednotky pro prodlužování řetězce pomocí polymerázy.
4. Primery, které při správném výběru zajišťují selektivitu reakce.
5. Sondy, fluorescenčně značené primery nebo interkalační barviva, které jsou nezbytné u real-time PCR, aby bylo možné sledovat průběh reakce v reálném čase.

2.6.2 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (real-time PCR)

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce je metodou založenou na principu konvenční polymerázové řetězové reakce, ale dokáže na rozdíl od ní kvantifikovat množný úsek DNA v reálném čase. Každá z metod kvantitativní polymerázové reakce vyžaduje nějakou složku navíc. Existují tři obecné metody detekce založené na [8]:

1. Fluorescenčně značených primerech
2. Interkalačním barvivu vázajícím se na DNA
3. Fluorescenčně značených sondách vázajících se na střední část amplifikovaného produktu

Specifické molekuly fluofořů se používají pro značení primerů a sond, které po absorpci světla určité vlnové délky emitují světlo jiné vlnové délky. Absorbovaná délka je vždy nižší než vlnová délka emitovaná.

K detekci produktů real-time PCR se může použít řada technologií:

1. Pro kvantifikaci amplikonů se běžně používají fluorescenční kyaninová barviva SYBR GREEN
2. Dvojice fluorescenčně značených sond využívající přenos energie fluorescenční rezonancí (FRET)
3. LUX, technologie využívající dva primery, z nichž pouze jeden je fluorescenčně značen.

2.6.3 Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM)

HRM je metoda často používána k rozlišení specifických produktů PCR reakce od nespecifických, popřípadě specifických od jiných specifických. Může být použita jako alternativa ke gelové elektroforéze. Provádí se na dvouřetězcových úsecích DNA. Se zvyšující se teplotou dochází k disociaci DNA.

Teplota tání (T_m) je hodnota, při které je rozděleno 50% DNA na jednotlivá vlákna. Teplota tání především závisí na délce vlákna a na počtu guaninu a cytosinu přítomného ve vláknech, protože báze cytosin a guanin jsou vázány třemi vodíkovými můstky na rozdíl od adeninu a thyminu, které jsou vázány pouze dvěma vodíkovými můstky.

Předpokladem pro vysokorozlišovací analýzu je použití plně saturačního interkalačního barviva. Barviva, které plně obsazuje všechna místa na vznikajících dvojvláknech. Při analýze je snímán pokles fluorescence při tepelné disociaci dvouřetězcové DNA, kdy je barvivo uvolňováno. Teplota tání bývá získávána z inflexního bodu křivky tání [7].

2.7 Další metody identifikace PCR produktů

2.7.1 Elektroforéza

Elektroforéza je nejpoužívanější separační technika při izolaci a analýze nukleových kyselin a bílkovin. Pohyb nabitých molekul v elektrickém poli je principem elektroforetické separace. Hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou záporně nabitě fosfátové skupiny, proto se pohybují v elektrickém poli k opačně nabitě elektrodě – anodě [8].

Gelová elektroforéza bývá velmi často používána pro separaci nukleových kyselin. Z praktických důvodů se elektroforéza provádí ve vhodném nosiči, tím bývá obvykle gel. Používají se převážně dva druhy gelů tvořené polyakrylamidem nebo agarózou, které vytvářejí složitou síťovou strukturu polymerních molekul s póry. Díky koncentraci polymeru a složení roztoku můžeme ovlivnit velikost pórů. Polyakrylamidové gely se používají pro separaci menších molekul 10 až 1000 bp, zatímco agarozové gely se využívají pro separaci nukleových kyselin o velikost od 100 bp až do 50 kb. Podle polohy gelu v elektroforetické aparatuře rozlišujeme horizontální a vertikální gelovou elektroforézu.

Elektroforetická rychlost je rychlost pohybu izolované DNA v gelu a je nepřímo závislá na logaritmu jejich velikostí. Nukleové kyseliny mají záporný náboj rozložený tak, že na jednotku délky je ta velikost náboje stejná, proto při zjišťování pohyblivosti DNA není třeba brát v potaz velikost náboje. Díky tomu můžeme porovnávat pohyblivost molekul o známé velikosti – standarty – s molekulami DNA o neznámé velikost a z toho určit jejich velikost.

Po skončení elektroforézy je třeba identifikovat polohy separovaných molekul, které nejsou viditelné pouhým okem. Proto se zviditelňují vhodným barvivem. Jako barvivo býval často používán ethidiumbromid, jehož komplex s DNA po osvětlení UV světlem červeně fluoreskuje. Jako proužky bude na gelu vidět DNA o stejné velikosti. Velikost zbarvení je přímo závislá na koncentraci DNA. V dnešní době se spíš používají méně nebezpečná barviva, jako jsou fluorescenční kyaninové barvivo například SYBRGREEN nebo se mohou značit molekuly DNA radioaktivně.

2.8 Současný stav řešené problematiky

Molekulární metody založené na identifikaci DNA hrají stále větší roli při kontrole bezpečnosti potravin a detekci falšování potravin. Autentičnost potravin je v současné době předmětem obav potravinových orgánů, protože nesprávné označování potravin může představovat obchodní podvod. Důsledek zavádějícího označování může být mnohem důležitější, pokud jde o přítomnost potenciálně alergenních potravin. K ověření komerčních výrobků, zda splňují právní předpisy, jsou potřebné specifické a citlivé analytické metody. Bylo navrženo několik metod založených na PCR pro identifikaci druhů v potravinách vzhledem k jejich vysoké specifičnosti a citlivosti, stejně jako krátké době zpracování a nízkých nákladů. Navíc nedávné práce ukazují, že i HRM analýza je zajímavým přístupem. Zahrnuje amplifikaci sledovaného cíle v přítomnosti saturačního barviva PCR a následné roztavení amplikonů postupným zvyšováním teploty. Protože profil tání závisí na obsahu GC, délce, posloupnosti a řetězcové komplementaritě produktu, je analýza HRM velmi vhodná pro detekci variant s jednou bází a malých inzercí nebo delecí. Identifikace druhů se obvykle provádí metodami založenými na proteinech nebo DNA. Kvůli nestabilitě proteinů, proteinové metody, např. vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC), elektroforéza a imunoanalytické techniky jsou použitelné pouze pro syrové nebo mírně zpracované potraviny. Naproti tomu vyšší stabilita nukleových kyselin umožňuje aplikovat metody založené na DNA na syrové i vysoce zpracovaných potravin. [18], [7]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Použité vzorky mléčných výrobků s ovocnou složkou

3.1.1.1 Smetanový jogurt borůvkový (Pilos) – zkratka jog2

Výrobce: Mlékárna Stříbro, s. r. o

Revoluční 845

349 01 Stříbro

Datum spotřeby: 04/2020

Složení: Smetana, 30% borůvková složka (60% borůvková dřevina, cukr, pitná voda, zahušňovadla: karubin, pektiny; aroma, barvicí koncentrát z černé mrkve), sušené mléko, jogurtová kultura.

3.1.1.2 AGRO-LA Jihočeský jogurt s příchutí – zkratka jog1

Výrobce: AGRO-LA spol. s. r. o.

Jiráskovo předměstí 630/III

377 01 Jindřichův hradec

Datum spotřeby: 04/2020

Složení: nehomogenizované plnotučné mléko, ovocná složka 13,5% (cukr, borůvky 30%, přírodní aroma, koncentrát z mrkve a ibišku), sušené mléko, mléčné kultury

3.1.2 Použité vzorky dětských příkrmů

3.1.2.1 Kojenecká výživa ovocná přesnídávka s borůvkami (Hamánek) – zkratka přes1

Výrobce: Nutricia, a.s.

Na Hřebenech II 1718/10

14000 Praha 4

Datum spotřeby: 04/2020

Složení: Jablečná dřeň (45% hm.), voda, borůvková dřeň (15% hm.), cukr, fruktózový sirup (fruktóza, dextróza, maltóza), zahušřovadlo: kukuřičný modifikovaný škrob, regulátor kyselosti: kyselina citrónová, antioxidant: kyselina askorbová

3.1.2.2 Sterilovaný ovocný příkrm pro děti (Hami) – zkratka přes2

Výrobce: Nutricia, a.s.

Na Hřebenech II 1718/10

14000 Praha 4

Datum spotřeby: 04/2020

Složení: Jablečné pyré 64%, borůvkové pyré 20%, hruškové pyré 14%, rýžová mouka, kyselina askorbová (vitamín C)

3.2 Přístroje a pomůcky

- Laboratorní váhy
- Buničitá vata
- Lednice a mrazák k uchování vzorků DNA
- Mikropipety
- Mikrovlnná trouba ETA
- Laboratorní sklo
- Centrifuga
- Minicentrifuga
- Mikrozkuřavky Eppendorf
- Nanodrop
- Parafilm
- RotorGene 6000

- LightCycler® Nano
- Zařízení pro elektroforézu
- MiniInkubator
- Transiluminátor

3.3 Chemikálie

- Agaróza pro elektroforézu DNA
- Nanášecí pufr Yellow load
- Ethanol bezvodý
- Komerční kit pro izolaci DNA
- Destilovaná voda
- Fluoresceční barvivo Gel red
- 0,5x TBE pufr
- Délkový standard

3.4 Komponenty pro PCR

- PCR voda
- Syto-mastermix (směs nukleotidů, PCR pufr s Mg⁺ ionty, Taq DNA polymeráza)
- Primery nespecifické – ITS2
- Primery specifické pro evropskou borůvku
- Primery specifické pro kanadskou borůvku

3.5 Pracovní postupy

3.5.1 Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena pomocí komerčního setu podle jeho návodu.

Do 1,5 ml eppendorfky bylo odváženo 0,2 g skleněných homogenizujících kuliček, 0,05 g vzorku plodu borůvky a odměřeno 450 μ l lyzačního pufru P1. Poté byl vzorek homogenizován pomocí skleněných kuliček a kopisku.

Následně bylo přidáno 50 μ l pufru P2, roztok se zvortexoval a za občasného míchání nechal inkubovat 10 minut při teplotě 70 °C. Poté se roztok centrifugoval při 10 000 rcf, při laboratorní teplotě 3 minuty.

Supernatant se převedl do čisté 1,5ml eppendorfky. K supernatantu bylo přidáno 175 μ l pufru P3, opět byl roztok vortexován a následně inkubován při teplotě -4 °C okolo 4 minut. Roztok byl centrifugován, při stejných podmínkách jako předtím.

Do nové 2ml eppendorfky bylo převedeno až 500 μ l supernatantu a bylo k němu přidáno 500 μ l pufru P4, směs byla zvortexována a lehce zcentrifugována, aby roztok nezůstal na stěnách.

K roztoku bylo k němu přidáno 500 μ l pufru P5, směs byla zvortexována a lehce zcentrifugována, aby roztok nezůstal na stěnách.

Následně se 750 μ l supernatantu převedlo do spin filtru. Eppendorfka se spin filtrem se nechala centrifugovat při 10 000 rcf a laboratorní teplotě 1 minutu. Poté byla odstředěná kapalina vylita a proces s dalšími 750 μ l supernatantu se opakoval.

Spin filtr se přenesel do nové 2 ml eppendorfky. Bylo přidáno 500 μ l pufru P6 a centrifugováno za předchozích podmínek. Poté, co byla kapalina odstraněna byl spinfiltr vrácen do eppendorfky.

Bylo přidáno 500 μ l pufru P7 a proces se opakoval, jako u pufru P6.

Následně bylo přidáno 250 μ l pufru P8. Proces se opakoval jako u pufru P7 a P6. Poté byl spin filtr přenesen do nové eppendorfky a podmínky centrifugace byly zvýšeny na 12 000 rcf, po dobu 2 minut.

Takto získaný roztok DNA byl v eppendorfce s víčkem uchováván při teplotě -20 °C.

3.5.2 Stanovení koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky

Koncentrace a čistota byla měřena na přístroji Nanodrop pomocí absorbance DNA oproti čistému pufru č.8 z izolačního kitu. Absorbance byla měřena při vlnovém spektru od 220nm do 320 nm.

Z absorbance při vlnové délce 260 nm byla zjištěna koncentrace DNA. Z poměru absorbance při vlnových délkách 260 a 280 nm ($A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$) byla stanovena čistota DNA. Hodnota poměru by měla být okolo 1,8 až 2,0. [11]

3.5.3 PCR

PCR složky byly rozmrazeny, vortexovány a lehce zcentrifugovány. Následně byla připravena směs o objemu 24 μ l., viz *Tabulka č. 1. Směs pro PCR*. Poté byl přidán 1 μ l DNA na celkový objem 25 μ l směsi. Stejným způsobem byla připravena negativní i pozitivní kontrola. U negativní kontroly byla místo DNA použita PCR voda. Pro DNA u pozitivní kontroly u

nespecifických primerů byla použita DNA maliny, již dříve potvrzená. Poté při použití specifických primerů a DNA izolované z komerčních produktů byla použita DNA z již dříve izolovaných a potvrzených borůvek.

Tabulka 1 Směs pro PCR

Složka	Objem [μl]
PCR voda	9,5
Syto-mastermix	12,5
Primer R	1,0
Primer F	1,0
Součet	24,0

3.5.3.1 PCR primery

K přípravě PCR směsi byly využity tyto primery, nespecifické ITS2 [20], [24], poté specifické pro kanadskou borůvku BHLH 001, 003, 015 [21], VcCXIP4 a VcGADPH [22]. Pro evropskou borůvku to byly tyto: Sc Vmy, Vc Ful [19], Vc GADPH, Vm Dreb1 a Vm Dreb12. Jejich sekvence kromě primerů Vm Dreb1 a Vm Dreb12 nalezneme v tabulce č. 2, 3 a 4.

Primery Vm Dreb1 a Vm Dreb12 byly nově navrženy paní Ing. Lenkou Fialovou. Velikost PCR produktů byla zjištěna pomocí softwaru Primer-BLAST.

Tabulka 2 Nespecifické primery ITS2

Primery	Sekvence primerů	Velikost PCR produktů
ITS2-F	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	26 bp
ITS2-R	TGTGTTCTTCATCGATG	

Tabulka 3 Specifické primery pro kanadskou borůvku

Primery	Sekvence primerů	Velikost PCR produktů
VcBHLH001-F	AACCAATCCCTGAAGAACAGAAT	232 bp
VcBHLH001-R	TTCCATAAACTTGATTAGAGCC	
VcBHLH003-F	AAATGGATTTGCTGTTATGGGTG	226 bp
VcBHLH003-R	GGAATCATTAGGGAAACTGGGTA	
VcBHLH015-F	GAGCTTATGGAAAAGTCAA	133 bp
VcBHLH015-R	TGAAC TTTGGTGAATTCCTCAC	
VcGAPDH-F	CATCCACTCTATCACCGCAACAC	138 bp
VcGAPDH-R	GCAGGCAACACCTTACCAACAG	
VcCXIP4-F	ATGCCGGCCACAGCAGGTAG	966 bp
VcCXIP4-R	GTAATCTTCTTCACGATGACGGTGC	

Tabulka 4 Specifické primery pro evropskou borůvku

Primery	Sekvence primerů	Velikost PCR
VcGAPDH-F	CATCCACTCTATCACCGCAACAC	138 bp
VcGAPDH-R	GCAGGCAACACCTTACCAACAG	
VcCXIP4-F	ATGCCGGCCACAGCAGGTAG	966 bp
VcCXIP4-R	GTAATCTTCTTCACGATGACGGTGC	
VcFULF	AGTTCATCCACCTTGGTCTTAC	395 bp
VcFULR	GTCCACTTCGCGTACAATCT	

3.5.3.2 Teplotní profil PCR

Teplotní programy byly použity v závislosti na použitých primerech. Pro ITS2 program nalezneme v tabulce č.5 *Teplotní profil pro primery ITS2*. Pro kanadské primery byly použity dva programy, a to pro primery BHLH 001,003 a 015 nalezneme v tabulce č.6 *Teplotní profil pro primery BHLH 001,003 a 015* a pro VcCXIP4 a VcGADPH nalezneme v tabulce č.7 – *Teplotní profil pro primery VcCXIP4 a VcGADPH*. Pro evropské primery Vc Ful, Vm Dreb12, Vc GADPH, Vm Dreb1 a Sc Vmy byl použit jeden program a ten je zapsán v tabulce č. 8. - *Teplotní profil pro primery VcFul, Vm DREB12, Vm DREB1, Sc Vmy a Vc GADPH*.

Tabulka 5: Teplotní profil pro primery ITS2

Krok	Teplota (°C)	Čas (min)	
Prodloužená	95	5	35x cyklů
Denaturace	95	0,5	
Hybridizace	56-61	0,5	
Polymerace	72	0,5	
Dosyntetizování	72	5	

Tabulka 6 Teplotní profil pro primery BHLH 001,003 a 015

Krok	Teplota (°C)	Čas (min)	
Prodloužená	95	5	40x cyklů
Denaturace	95	0,5	
Hybridizace	55	0,5	
Polymerace	72	0,5	
Dosyntetizování	72	5	

Tabulka 7 Teplotní profil pro primery VcCXIP4 a VcGADPH

Krok	Teplota (°C)	Čas (min)	
Prodloužená	94	3	35x cyklů
Denaturace	94	1	
Hybridizace	55	1	
Polymerace	72	2	
Dosyntetizování	72	10	

Tabulka 8 Teplotní profil pro primery VcFul, Vm DREB12, Vm DREB1, Sc Vmy a Vc GADPH

Krok	Teplota (°C)	Čas (min)	
Prodloužená	94	5	35x cyklů
Denaturace	94	0,67	
Hybridizace	62	0,67	
Polymerace	72	0,67	
Dosyntetizování	72	5	

3.5.3.3 Použité PCR primery

Pro potvrzení DNA z borůvky byly nejprve využity nespecifické primery ITS2. Poté byla rozlišována borůvka kanadská a evropská a v závislosti na tom byly použity další primery. Pro kanadskou to byly primery BHLH 001,003,015, Vc GADPH a VcCXIP4. Pro evropskou to byly Vc Ful, Vm Dreb12, Vc GADPH, Vm Dreb1 a Sc Vmy.

3.5.4 Gelová elektroforéza PCR produktů

Byl připraven 1,2 % agarózový gel. Jako fluorescenční barvivo byla použita barva gel red v poměru 1:10000.

Rozmražené vzorky byly smíchány s nanášecím pufrem v poměru 1:6, pufr k DNA. Do malé vaničky se aplikovalo 15 µl vzorku s pufrem a do velké 10 µl. Délkového standardu bylo vždy použito 5 µl.

Bylo použito napětí 80 V po dobu 120 minut.

Následně byl gel umístěn na transiluminátor a vyfocen v UV světle.

3.5.5 HRM analýza

K HRM analýze byl použit přístroj LightCycler® Nano. Byly analyzovány produkty realtime PCR DNA izolované z komerčních produktů programem MyGo Pro. Krok analýzy činil 0,01 °C a velikost redukce šumu byla 0,3.

4 VÝSLEDKY

4.1 Stanovení koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky

Absorbance všech vzorků DNA izolovaných z komerčních produktů i z borůvek byla stanovena spektrofotometricky pomocí přístroje Nanodrop v rozsahu vlnových délek 220nm až 320nm. Výsledky jsou zapsány v tabulkách č. 9-14.

Tabulka 9 DNA borůvky evropské stanovená spektrofotometricky

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3
Koncentrace [ng·μl⁻¹]	3,4	2	2,9
A_{260nm}	0,068	0,04	0,059
A_{280nm}	0,04	0,03	0,029
A_{260nm}/A_{280nm}	1,68	1,35	2,04
A_{260nm}/A_{230nm}	0,34	0,28	0,39

Tabulka 10: DNA borůvky kanadské stanovená spektrofotometricky

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3
Koncentrace [ng·μl⁻¹]	2,3	2,3	0,5
A_{260nm}	0,046	0,047	0,011
A_{280nm}	0,018	0,025	-0,005
A_{260nm}/A_{280nm}	2,48	1,87	-2,27
A_{260nm}/A_{230nm}	0,5	0,71	1,03

Tabulka 11: DNA borůvky z jogurtu 1 stanovená spektrofotometricky

Jog1	Vzorek 1
Koncentrace [ng·μl⁻¹]	0,7
A_{260nm}	0,015
A_{280nm}	-0,001
A_{260nm}/A_{280nm}	-16,75
A_{260nm}/A_{230nm}	0,55

Tabulka 12: DNA borůvky z jogurtu 2 stanovená spektrofotometricky

Jog2	Vzorek 1
Koncentrace [$\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$]	1,9
A _{260nm}	0,037
A _{280nm}	0,014
A _{260nm} /A _{280nm}	2,69
A _{260nm} /A _{230nm}	0,66

Tabulka 13: DNA borůvky z přesnídávky 1 stanovená spektrofotometricky

Přes1	Vzorek 1
Koncentrace [$\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$]	3,2
A _{260nm}	0,65
A _{280nm}	0,042
A _{260nm} /A _{280nm}	1,55
A _{260nm} /A _{230nm}	0,35

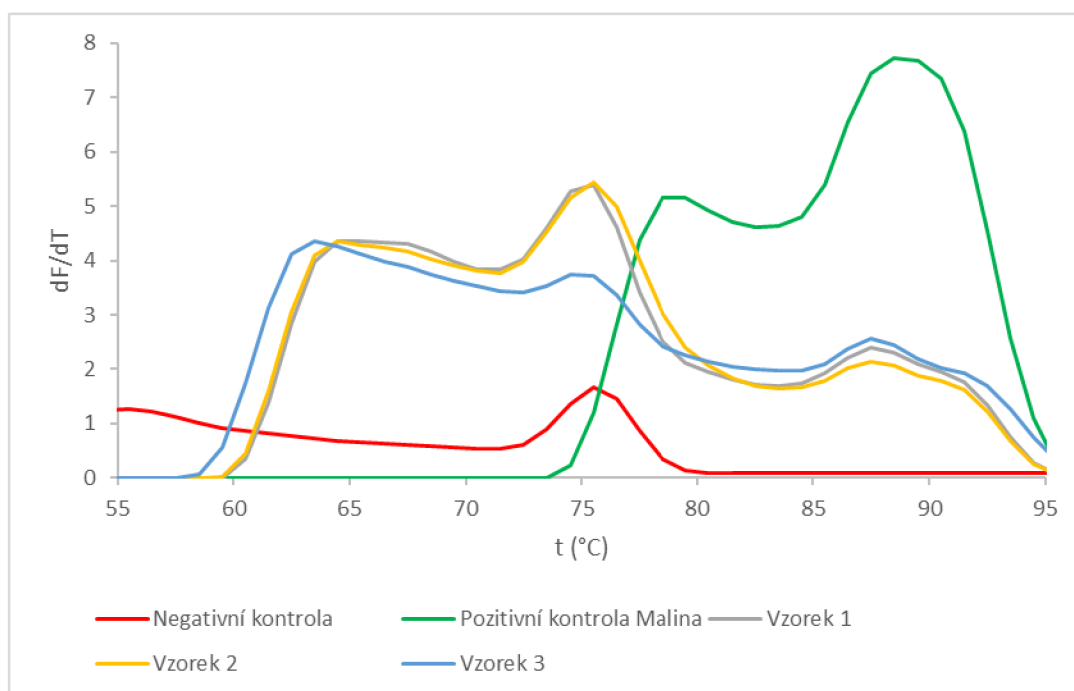
Tabulka 14: DNA borůvky z přesnídávky 2 stanovená spektrofotometricky

Přes2	Vzorek 1
Koncentrace [$\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$]	1,1
A _{260nm}	0,022
A _{280nm}	0,007
A _{260nm} /A _{280nm}	3,05
A _{260nm} /A _{230nm}	0,35

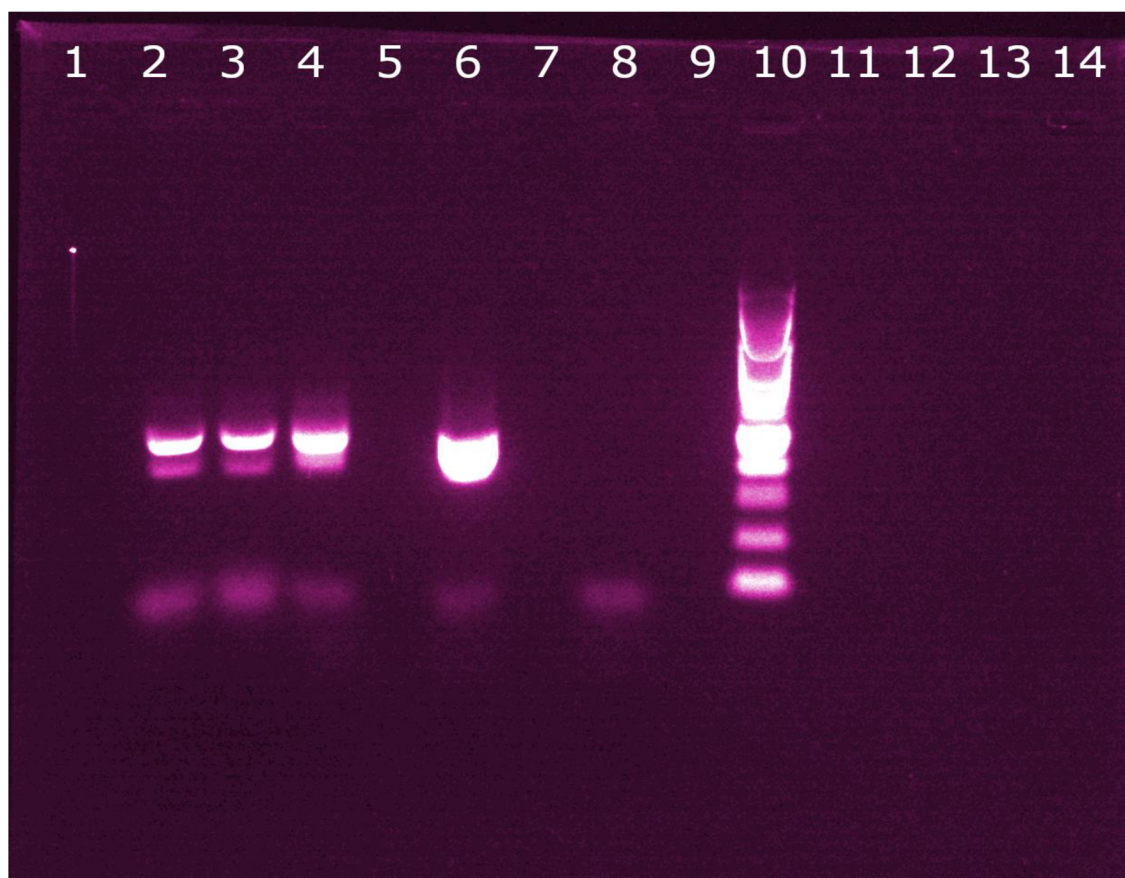
Pomocí spektrofotometrie byla dokázána přítomnost DNA.

4.2 Dokázání přítomnosti borůvčí DNA pomocí metody real-time PCR a gelové elektroforézy

Přítomnost izolované borůvčí DNA z borůvky kanadské byla zjištěna pomocí real-time PCR pomocí rostlinných univerzálních primerů ITS2. Následně byla provedena kontrola pomocí gelové elektroforézy.



Obrázek 1 Graf teplot tání real-time PCR s primery ITS2



Obrázek 2 Gelová elektroforéza realtime PCR s primery ITS2 s DNA kanadské borůvky

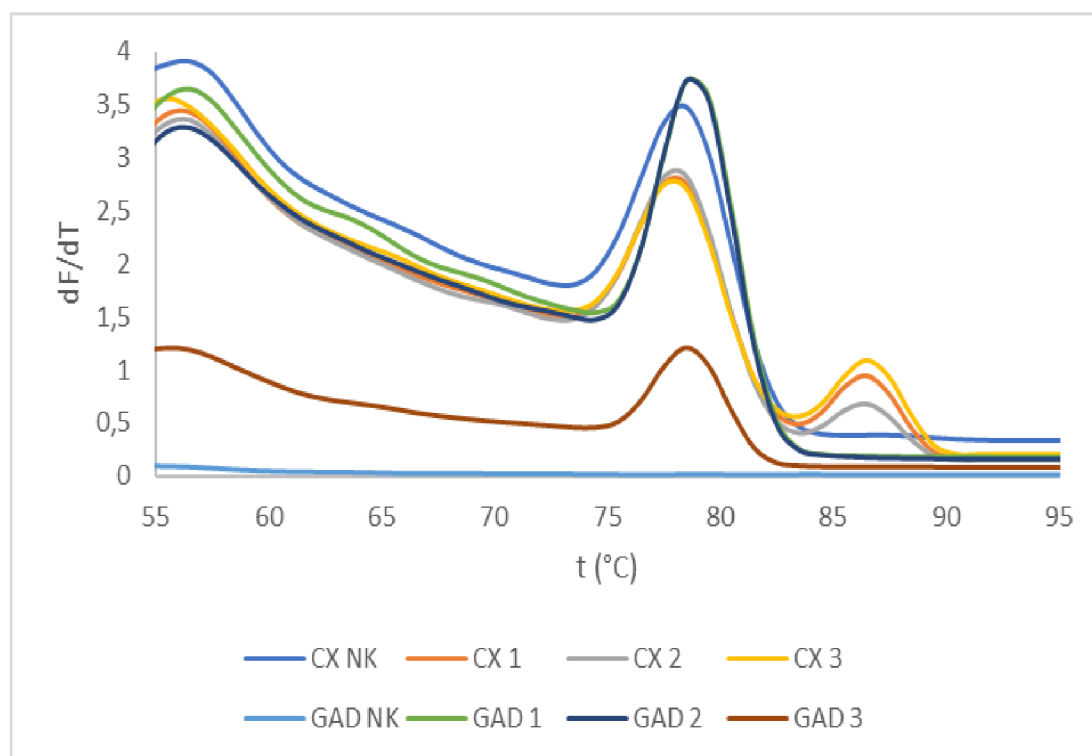
Tabulka 15 Osnova vzorků DNA kanadské borůvky v agarozovém gelu na obrázku č. 2

Pozice 2	Vzorek č.1
Pozice 3	Vzorek č.2
Pozice 4	Vzorek č.3
Pozice 6	Pozitivní kontrola
Pozice 8	Negativní kontrola
Pozice 10	DNA standart

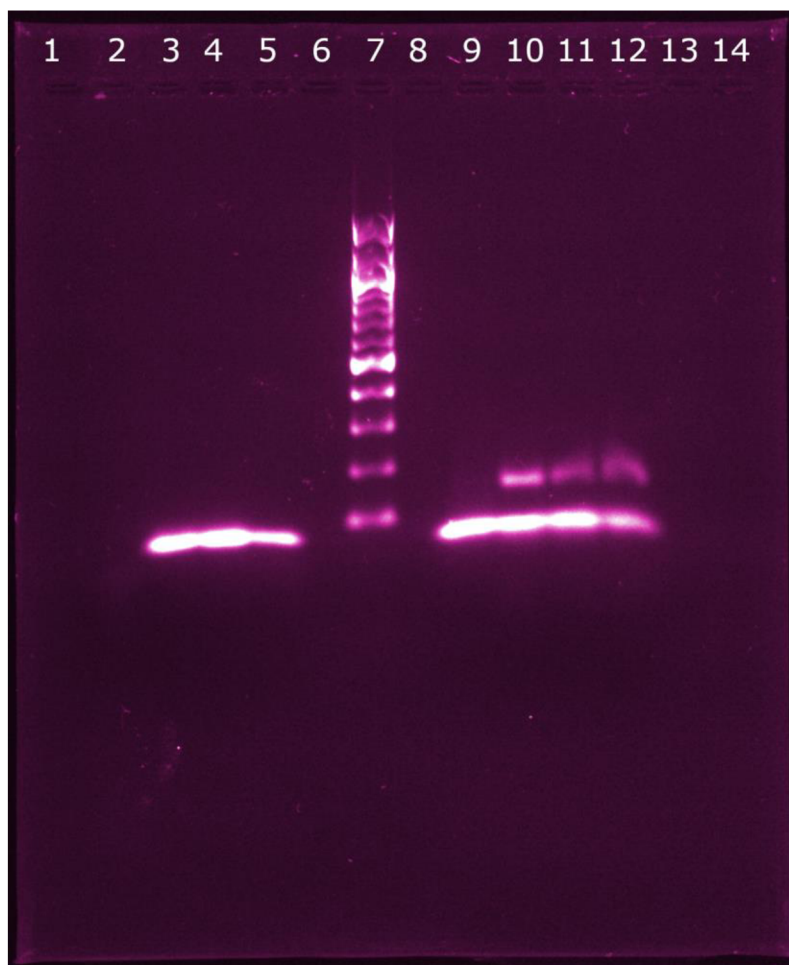
Pomocí gelové elektroforézy a real-time PCR byla dokázána přítomnost rostlinné DNA.

4.3 Dokázání výskytu DNA borůvek pomocí metody real-time PCR a gelové elektroforézy

Kontrolní borůvčí DNA izolována z borůvek byla zjištěna pomocí real-time PCR pomocí specifických primerů, konkrétně primery pro evropskou a kanadskou borůvku (viz Kapitola 4.5 Pracovní postupy). Následně byla provedena kontrola pomocí gelové elektroforézy.



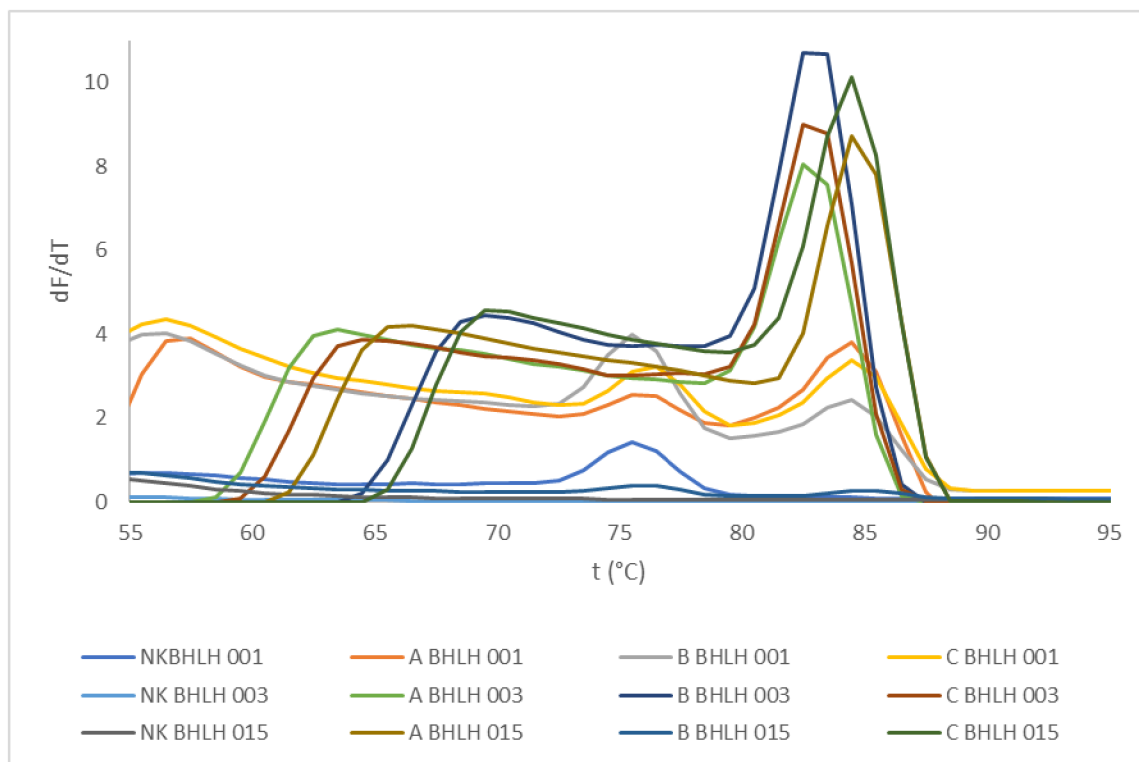
Obrázek 3 Graf teplot tání real-time PCR s primery specifickými pro kanadskou borůvku s DNA kanadské borůvky



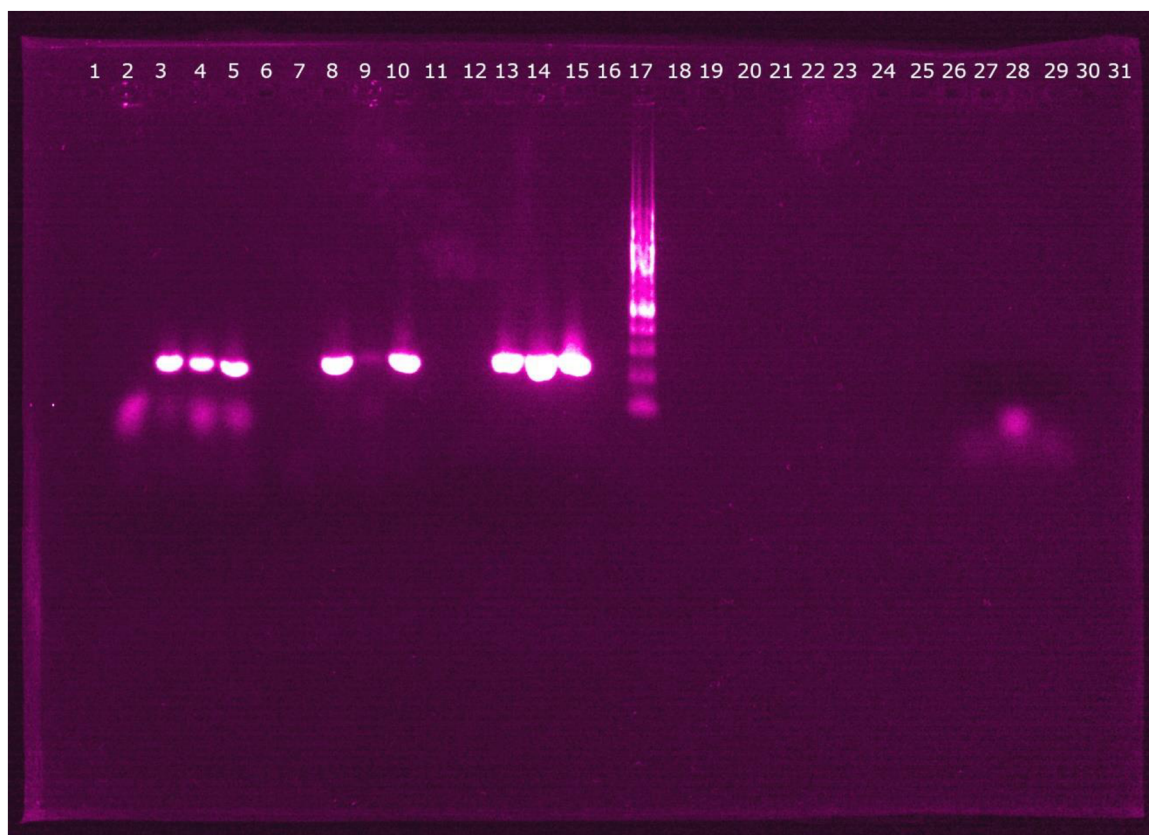
Obrázek 4 Gelová elektroforéza realtime PCR s primery specifickými pro kanadskou borůvku s DNA kanadské borůvky

Tabulka 16 Osnova vzorků v agarozovém gelu na obrázku 4

Pozice 2	Negativní kontrola VcGADPH
Pozice 3	VcGADPH A
Pozice 4	VcGADPH B
Pozice 5	VcGADPH C
Pozice 7	Délkový standart
Pozice 9	Negativní kontrola VcCXIP4
Pozice 10	VcCXIP4 A
Pozice 11	VcCXIP4 B
Pozice 12	VcCXIP4 C



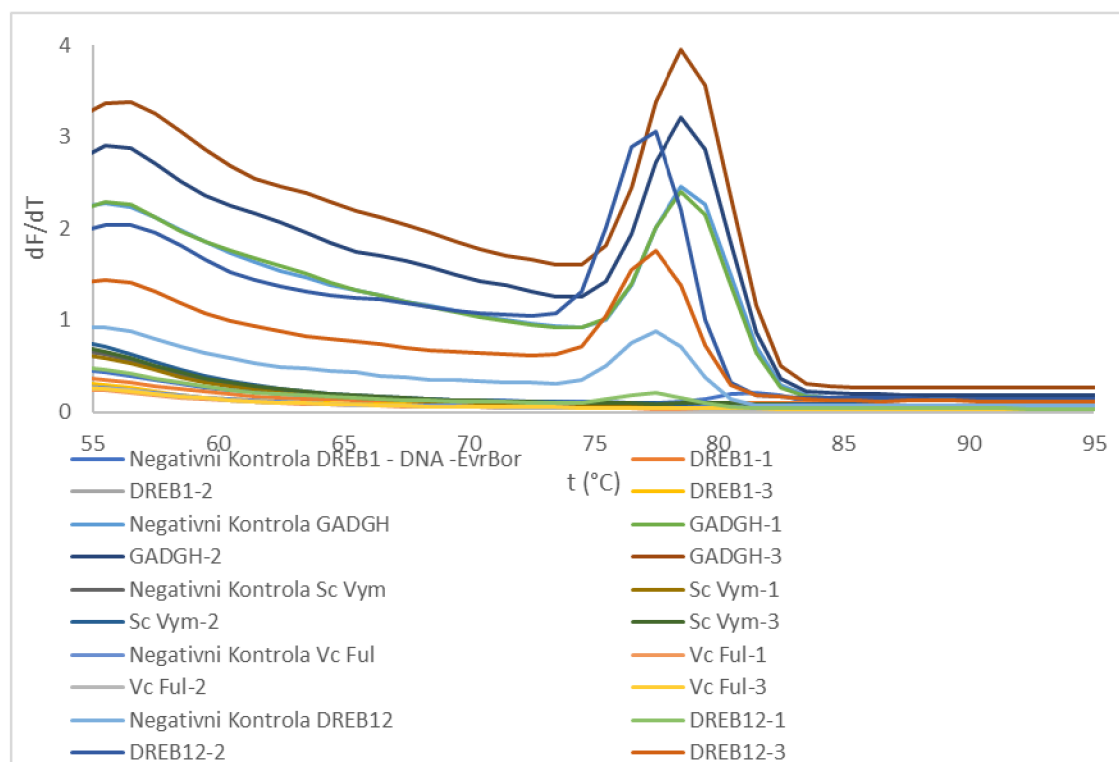
Obrázek 5: Graf teplot tání real-time PCR s primery specifickými pro kanadskou borůvku s DNA kanadské borůvky



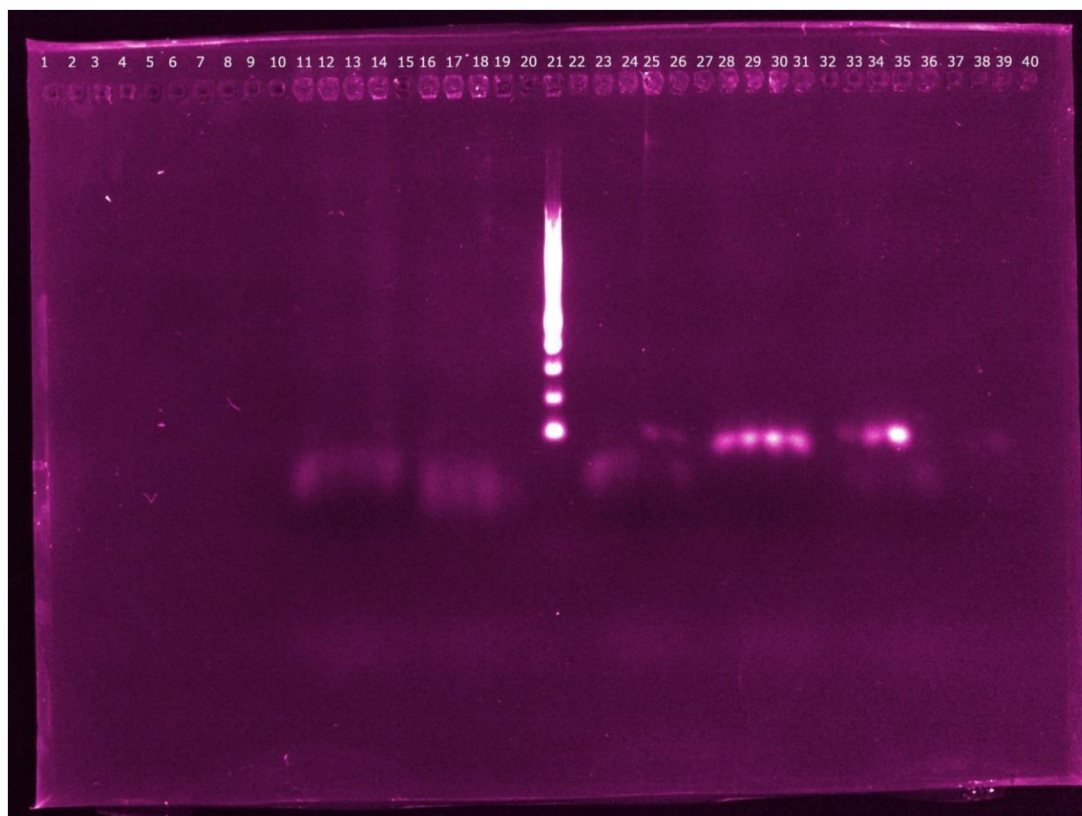
Obrázek 6 Gelová elektroforéza realtime PCR s primery specifickými pro kanadskou borůvku s DNA kanadské borůvky

Tabulka 17 Osnova vzorků v agarozovém gelu na obrázku 6

Pozice 2	Negativní kontrola BHLH 001
Pozice 3	BHLH 001 A
Pozice 4	BHLH 001 B
Pozice 5	BHLH 001 C
Pozice 7	Negativní kontrola BHLH 0015
Pozice 8	BHLH 0015 A
Pozice 9	BHLH 0015 B
Pozice 10	BHLH 0015 C
Pozice 12	Negativní kontrola BHLH 003
Pozice 13	BHLH 003 A
Pozice 14	BHLH 003 B
Pozice 15	BHLH 003 C
Pozice 17	DNA standart



Obrázek 7 Graf teplot tání real-time PCR s primery specifickými pro evropskou borůvku s DNA evropské borůvky

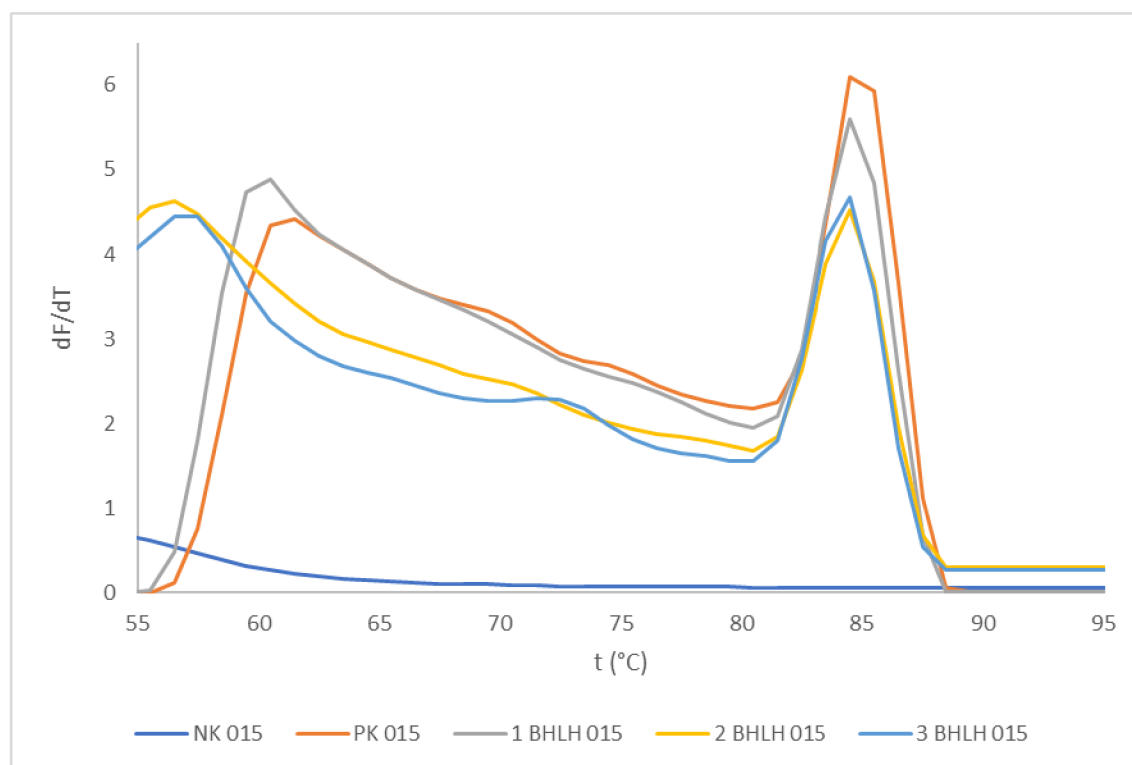


Obrázek 8 Gelová elektroforéza realtime PCR s primery specifickými pro evropskou borůvku s DNA evropské borůvky

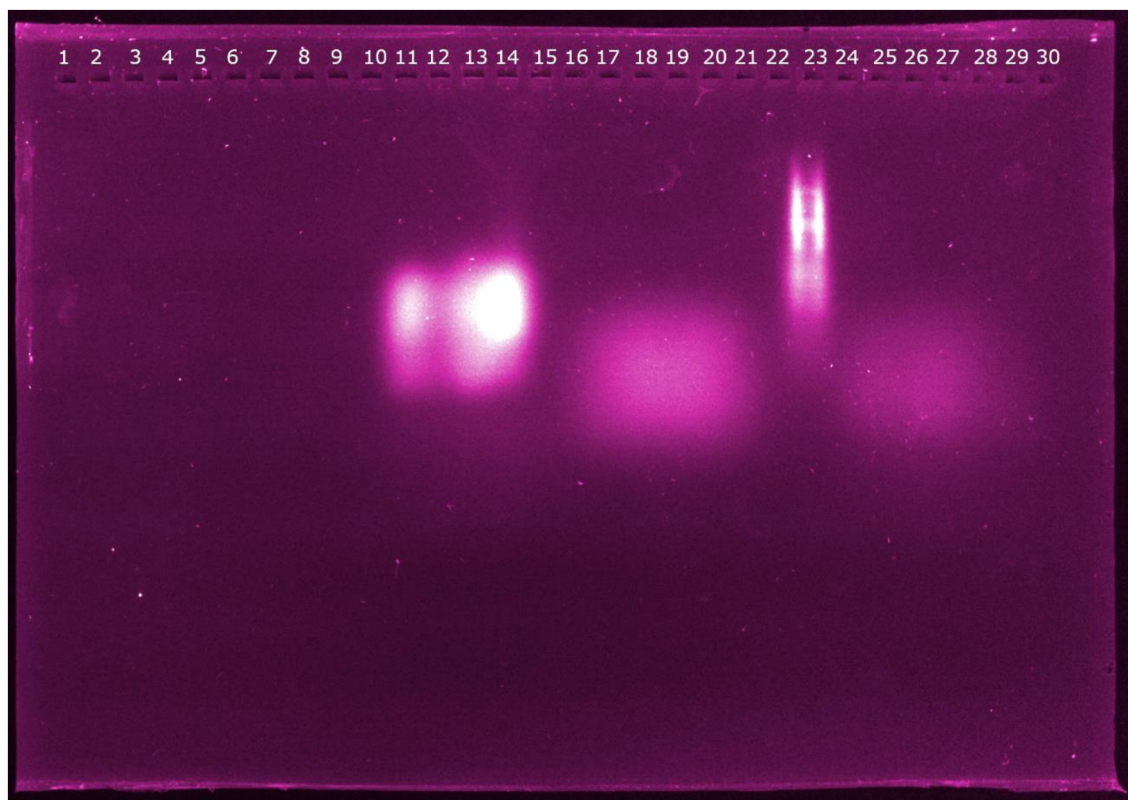
Tabulka 18 Osnova vzorků v agarozovém gelu na obrázku 8

Pozice 14	Negativní kontrola Vcful
Pozice 11	Vcful A
Pozice 12	Vcful B
Pozice 13	Vcful C
Pozice 19	Negativní kontrola ScVmyl
Pozice 16	ScVmyl A
Pozice 17	ScVmyl B
Pozice 18	ScVmyl C
Pozice 21	DNA standart
Pozice 26	Negativní kontrola Dreb1
Pozice 23	Dreb1 A
Pozice 24	Dreb1 B
Pozice 25	Dreb1 C
Pozice 31	Negativní kontrola GADPH
Pozice 28	GADPH A
Pozice 29	GADPH B
Pozice 30	GADPH C
Pozice 36	Negativní kontrola Dreb12
Pozice 33	Dreb12 A

Pozice 34	Dreb12 B
Pozice 35	Dreb12 C



Obrázek 9 Graf teplot tání real-time PCR s primery specifickými pro kanadskou borůvku s DNA evropské borůvky



Obrázek 10 Gelová elektroforéza realtime PCR s primery specifickými pro kanadskou borůvku s DNA evropské borůvky

Tabulka 19 Osnova vzorků v agarozovém gelu na obrázku 10

Pozice 29	Negativní kontrola Dreb12
Pozice 28	Pozitivní kontrola Dreb12
Pozice 25	Dreb12 A
Pozice 26	Dreb12 B
Pozice 27	Dreb12 C
Pozice 23	DNA standart
Pozice 21	Negativní kontrola GADPH
Pozice 20	Pozitivní kontrola GADPH
Pozice 17	GADPH A
Pozice 18	GADPH B
Pozice 19	GADPH C
Pozice 15	Negativní kontrola BHLH 0015
Pozice 14	Pozitivní kontrola BHLH 0015
Pozice 11	BHLH 0015 A
Pozice 12	BHLH 0015 B
Pozice 13	BHLH 0015 C

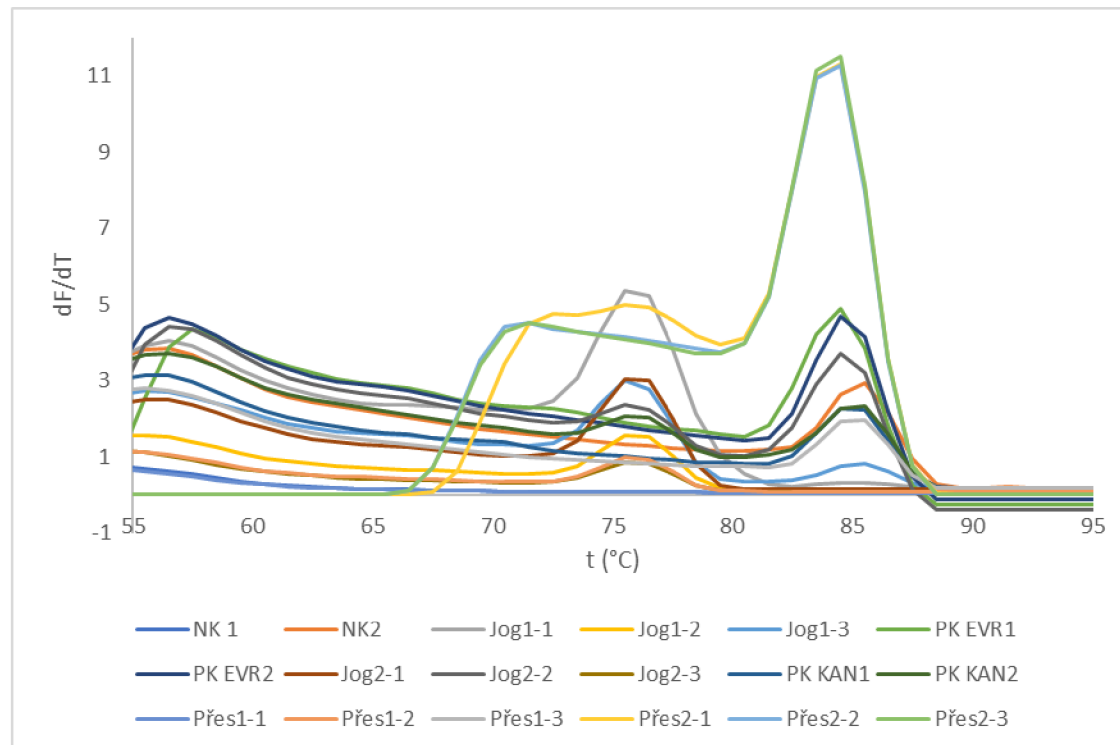
4.4 Dokázání výskytu DNA borůvek izolovaných z komerčních produktů pomocí metody real-time PCR a následná HRM analýza pro detailnější výsledky

Borůvčí DNA izolovaná z komerčních produktů byla zjištěna pomocí real-time PCR pomocí specifických primerů.

Následně byla provedena HRM analýza ke zjištění přesnějších rozdílů teplot tání produktů real-time PCR DNA izolované z evropské a kanadské borůvky a produktů real-time PCR DNA izolované z komerčních produktů.

Tabulka 20 Teploty tání PCR produktů

Vzorek DNA	Teploty tání (°C)
Evropská borůvka 1	83,31
Evropská borůvka 2	83,3
Evropská borůvka 3	83,35
Negativní kontrola	84,22
Kanadská borůvka 1	83,01
Kanadská borůvka 2	83,3
Kanadská borůvka 3	83,32



Obrázek 11 Graf teplot tání real-time PCR s primery BHLH015 s DNA izolovaných z komerčních produktů

Tabulka 21 Teploty tání PCR produktů komerčních výrobků 1

Vzorek DNA	Teploty tání (°C)
Jogurt 1-1	83,42
Jogurt 1-2	83,33
Jogurt 1-3	83,55
Pozitivní kontrola evropská borůvka 1	83,21
Pozitivní kontrola evropská borůvka 2	83,13
Jogurt 2-1	84,37
Jogurt 2-2	83,20
Jogurt 2-3	82,43
Přesnídávka 1-1	83,00
Přesnídávka 1-2	82,48
Přesnídávka 1-3	83,22
Pozitivní kontrola kanadská borůvka 1	83,31
Pozitivní kontrola kanadská borůvka 2	83,48
Přesnídávka 2-1	83,03
Přesnídávka 2-2	83,08
Přesnídávka 2-3	83,05
Negativní kontrola	83,28
Negativní kontrola	83,57

5 DISKUZE

5.1 Stanovení koncentrace a čistoty DNA spektrofotometricky

Absorbance všech vzorků DNA izolovaných z komerčních produktů i z borůvek byla stanovena spektrofotometricky pomocí přístroje Nanodrop v rozsahu vlnových délek 220nm až 320nm. Hodnota poměru absorbancí A_{260nm}/A_{280nm} činila 1,68 pro vzorek 1, 1,35 pro vzorek 2 a 2,04 pro vzorek 3 pro DNA izolovanou z borůvky evropské. Hodnoty poměru neznečištěné DNA se pohybují okolo 1,8-2, hodnoty pod toto rozmezí značí nízkou koncentraci, znečištění proteiny nebo organickými látkami jako je například fenol. Hodnoty nad toto rozmezí značí znečištění RNA. Hodnoty 1,68 a 1,35 značí u vzorku 1 a 2 znečištění, které mohlo být způsobeno proteiny, ale především fenolickými látkami, kterých je v borůvkách obsažené velké množství. Vzorek 3 s hodnotou 2,04 mohl být znečištěn RNA. Rozdílná znečištění mohla být způsobena izolováním DNA z různých částí borůvky. Koncentrace DNA vzorku 1 byla $3,4 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, vzorku 2 byla $2 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, vzorku 3 byla $2,9 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Pro pozdější porovnání s komerčními produkty byl použit vzorek 3.

Hodnota poměru absorbancí A_{260nm}/A_{280nm} činila 2,48 pro vzorek 1, 1,87 pro vzorek 2 a -2,27 pro vzorek 3 pro DNA izolovanou z borůvky evropské. Hodnoty poměru neznečištěné DNA se pohybují okolo 1,8-2, hodnoty pod toto rozmezí značí nízkou koncentraci, znečištění

proteiny nebo organickými látkami jako je například fenol, hodnoty nad toto rozmezí značí znečištění RNA. Hodnota 2,48 u vzorku 1 značí, že vzorek 1 byl znečištěn RNA. Hodnota -2,27 u vzorku 2 indikuje nízkou koncentraci DNA. Hodnota 1,87 náleží do rozmezí ukazující, že DNA nebyla znečištěna proteiny, RNA nebo fenolickými látkami. Rozdílná znečištění mohla být způsobena izolováním DNA z různých částí borůvky. Koncentrace DNA vzorku 1 byla $2,3 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, vzorku 2 byla $2,3 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, vzorku 3 byla $0,5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Pro pozdější porovnání s komerčními produkty byl použit vzorek 2.

Hodnota poměru absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ činila -16,75 pro vzorek Jog1 a 2,69 pro vzorek Jog2 pro DNA izolovanou z komerčních produktů. Hodnoty poměru neznečištěné DNA se pohybují okolo 1,8-2, hodnoty pod toto rozmezí značí nízkou koncentraci, znečištění proteiny nebo organickými látkami jako je například fenol, hodnoty nad toto rozmezí značí znečištění RNA. Hodnota -16,75 u vzorku Jog1 indikuje nízkou koncentraci DNA. To mohlo být způsobeno špatným odebráním vzorku nebo malým množstvím DNA v komerčním produktu. Hodnota 2,69 u vzorku Jog2 značí znečištění RNA. Koncentrace DNA vzorku Jog1 byla $0,7 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a vzorku Jog2 byla $1,9 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

Hodnota poměru absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ činila 1,55 pro vzorek Přes1 a 3,05 pro vzorek Přes2 pro DNA izolovanou z komerčních produktů. Hodnoty poměru neznečištěné DNA se pohybují okolo 1,8-2, hodnoty pod toto rozmezí značí nízkou koncentraci, znečištění proteiny nebo organickými látkami jako je například fenol, hodnoty nad toto rozmezí značí znečištění RNA. Hodnota 1,55 u vzorku Přes1 značí znečištění proteiny. To mohlo být způsobeno špatným odebráním vzorku nebo nedostatečným odstraněním znečištění. Hodnota 3,05 u vzorku Přes2 značí znečištění RNA. Koncentrace DNA vzorku Přes1 byla $3,2 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a vzorku Přes2 byla $1,1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

5.2 Real-time pcr izolované DNA z borůvky kanadské

DNA izolovaná z kanadské borůvky byla amplifikována nespecifickými primery pro rostliny ITS2. Real-time PCR byla měřena spektrofotometricky v závislosti na teplotě tání a poté byl PCR produkt zkontrolován gelovou elektroforézou. Byla použita DNA izolovaná z maliny jako pozitivní kontrola. Negativní kontrola je čistá a zbylé vzorky mají jasný pruh v jedné rovině. Tím bylo prokázáno, že izolovaná DNA je rostlinného původu.

DNA izolovaná z kanadské borůvky byla amplifikována specifickými primery pro kanadskou borůvku BHLH 001, 003, 015, VcGADPH a VcCXIP4. PCR produkt byl zkontrolován gelovou elektroforézou. Negativní kontrola byla u všech vzorků čistá. U vzorku s primery Vc GADPH nebyly na gelu nalezeny žádné PCR produkty v místě očekávání, pouze velké množství dimerů. U vzorku VcCXIP4 byla vidět slabá amplifikace DNA a velké množství dimerů. Vzorky s primery BHLH 001,003,015 se amplifikovaly daleko lépe. Nejlépe z nich vyšly vzorky s primery BHLH 003, které byly dále použity pro identifikace DNA izolované z komerčních produktů.

5.3 Real-time pcr izolované DNA z borůvky evropské

DNA izolovaná z evropské borůvky byla amplifikována specifickými primery pro evropskou borůvku Vc Ful, Vm Dreb12, Vc GADPH, Vm Dreb1 a Sc Vmy. Real-time PCR byla měřena spektrofotometricky v závislosti na teplotě tání a poté byl PCR produkt zkontrolován gelovou elektroforézou. Negativní kontrola byla u všech vzorků čistá. Každý ze vzorků obsahoval více či méně dimerů a žádný vzorků nebyl amplifikován dostatečně, aby jeho primer mohl být použit u komerčních produktů. Proto byly použity kanadské primery a dva původní evropské primery – pro ověření předchozího pokusu – na DNA izolovanou z evropské borůvky.

DNA izolovaná z evropské borůvky byla amplifikována specifickými primery pro kanadskou borůvku BHLH 015 a specifickými primery pro evropskou borůvku Vm Dreb12, Vc GADPH. Real-time PCR byla měřena spektrofotometricky v závislosti na teplotě tání a poté byl PCR produkt zkontrolován gelovou elektroforézou. Negativní kontrola byla u všech vzorků čistá. U vzorků s primery Vm Dreb12 a Vc GADPH nebyly na gelu nalezeny žádné pcr produkty v místě očekávání, pouze velké množství dimerů. Rozmazání vzorků na gelu mohlo být způsobeno špatným nastavením elektroforézy. Vzorek s primery BHLH 015 vyšel nejlépe pro DNA borůvky izolované z borůvky kanadské i evropské.

5.4 Real-time pcr izolované DNA z komerčních produktů

DNA izolovaná z komerčních produktů byla amplifikována specifickými primery pro kanadskou borůvku BHLH 015 a 003. Real-time PCR byla měřena spektrofotometricky v závislosti na teplotě. Jedna negativní kontrola byla čistá, druhá negativní kontrola vykazovala známky kontaminace. Pro zpřesnění výsledků byly vzorky podrobeny HRM analýze.

5.5 HRM analýza:

Nejprve byly HRM analýze podrobeny vzorky DNA izolované z borůvky kanadské a borůvky evropské. Z výsledků vyplývá, že HRM analýza není jednoznačně schopná odlišit jeden druh borůvky od druhého.

Následně byly HRM analýze podrobeny vzorky DNA izolované z komerčních produktů. Vzorky úplně neodpovídají první analýze, neboť obě pozitivní kontroly mají odlišné teploty tání a mohlo by se zdát, že se oba druhy dají od sebe odlišit. Chyba mohla nastat u předcházející real-time PCR, což mohlo být způsobeno nedostatečnou koncentrací DNA, neboť samotné komerční produkty obsahovaly nízký podíl borůvčí složky. Také to mohly zavinit kontaminanty, především bílkoviny, protože vzorky DNA byly izolované z komerčních produktů obsahující mléčnou složku. K ověření a zpřesnění dat by bylo třeba analýzu opakovat.

6 ZÁVĚR:

Jak již bylo zmíněno v úvodní části práce je nesnadné pro řadového spotřebitele zjistit autenticitu ovocné složky v komerčních produktech. Cílem práce bylo identifikovat rostlinou DNA v komplexní matici pomocí molekulárních technik. Z rešerší bylo zjištěno, že v poslední době se klade velký důraz na bezpečnost a detekci falšování potravin. Kdy ke zajištění těchto úkonů se používají citlivé analytické metody, jako je PCR nebo HRM analýza.

V experimentální části byla měřena čtveřice komerčních produktů, ze kterých byla izolována DNA a následně byla podrobena PCR a HRM analýze.

K HRM analýze byl použit přístroj LightCycler® Nano. Byly analyzovány produkty realtime PCR DNA izolované z komerčních produktů programem MyGo Pro. Krok analýzy činil 0,01 °C a velikost redukce šumu byla 0,3.

Z výsledků vyplývá, že HRM analýza není jednoznačně schopná odlišit jeden druh borůvky od druhé. Výsledky druhé analýzy úplně neodpovídají první analýze, neboť obě pozitivní kontroly mají odlišné teploty tání. Mohlo by se dojít k závěru, že se oba druhy borůvek dají od sebe odlišit. Chyba mohla nastat v důsledku předcházející real-time PCR. To mohla zavinit nedostatečná koncentrace DNA v komerčních produktech. Mohly to také způsobit kontaminanty, především bílkoviny, protože vzorky DNA byly izolované z komerčních produktů obsahující mléčnou složku. K ověření a zpřesnění dat by bylo třeba analýzu opakovat.

7 LITERATURA:

- [1] HOSKOVEC, Ladislav: *Vaccinium myrtillus l.* [online]. 2007, poslední revize 2019. [cit. 20.2. 2020]. Botany. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/vaccinium-myrtillus/>
- [2] *Vaccinium myrtillus* brusnice borůvka. [online]. 2006. [cit. 20.2. 2020]. Dendrologie. Dostupné z <http://databaze.dendrologie.cz/index.php?menu=5&id=1971>.
- [3] *Vaccinium corymbosum* brusnice chocholičnatá. [online]. 2006. [cit. 20.2. 2020]. Dendrologie. <http://databaze.dendrologie.cz/index.php?menu=5&id=1968> 20. 2. 2020
- [4] MATUSZKIEWICZ, Władysław. *Průvodce určováním polských rostlinných komunit*. Varšava: Wyd. Naukowe PWN, 2006. ISBN 83-01-14439-4 .
- [5] Kalt W., McDonald J. E., Ricker R. D., Lu X.: *Can. J. Plant Sci.* 79, 617 (1999).
- [6] ROSYPAL, Stanislav. *Nový přehled biologie*. Praha: Scientia, 2003. ISBN 80- 7183-268-5.
- [7] DRUML, Barbara a Margit CICHNA-MARKL. *High resolution melting (HRM) analysis of DNA - Its role and potential in food analysis*. Food Chemistry. Elsevier, 2014, 158, s. 245-254
- [8] ŠMARDA, Jan, 2005. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-3841-1.
- [9] ELKINS, Kelly M, *Forensic DNA biology: a laboratory manual*. Kidlington, Oxford: Academic Press, 2013. ISBN 978-012-3945-853.
- [10] KARLOVSKY, Petr a Arthur W.A.M. DE COCK, 1991. Buoyant density of DNA-Hoechst 33258 (bisbenzimidazole) complexes in CsCl gradients: Hoechst 33258 binds to single AT base pairs. *Analytical Biochemistry*. **194**(1), 192-197. DOI: 10.1016/0003-2697(91)90167-R. ISSN 00032697. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000326979190167R>
- [11] HUBERMAN, J. A. (1995) *Importance of measuring nucleic acid absorbance at 240 nm as well as at 260 and 280 nm*. *BioTechniques* 18, 636.
- [12] ALLEN, DW; COOKSEY, C; TSAI, BK. *Spectrophotometry*. NIST. Retrieved, 2009.
- [13] TRUMBO, Toni A., Emeric SCHULTZ, Michael G. BORLAND a Michael Eugene PUGH, 2013. *Applied spectrophotometry: Analysis of a biochemical mixture*. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 41(4), 242-250. DOI: 10.1002/bmb.20694. ISSN 14708175. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bmb.20694>
- [14] SCHWEDT G (1997). *The essential guide to analytical chemistry*. Translated by Brooks H. Chichester, NY: Wiley. pp. 16–ISBN 9780471974123. OCLC 36543293.
- [15] HALL, J. L., T. J. FLOWERS a R. M. ROBERTS, 1984. *Plant cell structure and metabolism*. 2nd ed. Harlow, Essex: Longman Group, 1984. ISBN 05824408X.

- [16] DNA Purification and Solation Using Magnetic Particles. [online]. United States Patent, 1998 [cit. 23. 4. 2020]. Dostupné z: <https://patentimages.storage.googleapis.com/ef/e8/be/ed969256ede07d/US5705628.pdf>
- [17] BERENSMEIER, Sonja, 2006. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **73**(3), 495-504. DOI: 10.1007/s00253-006-0675-0. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-006-0675-0>
- [18] MAFRA, Isabel, Isabel M. P. L. V. O. FERREIRA a M. Beatriz P. P. OLIVEIRA, 2008. Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology*. **227**(3), 649-665. DOI: 10.1007/s00217-007-0782-x. ISSN 1438-2377. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-007-0782-x>
- [19] WALWORTH, Aaron E., Benli CHAI, Guo-qing SONG a Hong LUO, 2016. Transcript Profile of Flowering Regulatory Genes in VcFT-Overexpressing Blueberry Plants. *PLOS ONE*. **11**(6). DOI: 10.1371/journal.pone.0156993. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0156993>
- [20] 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*. **5**(1). DOI: 10.1371/journal.pone.0008613. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0008613>
- [21] SONG, Yang, Hong-di LIU, Qiang ZHOU, Hong-jun ZHANG, Zhi-dong ZHANG, Ya-dong LI, Hai-bo WANG a Feng-zhi LIU, 2017. High-throughput sequencing of highbush blueberry transcriptome and analysis of basic helix-loop-helix transcription factors. *Journal of Integrative Agriculture*. **16**(3), 591-604. DOI: 10.1016/S2095-3119(16)61461-2. ISSN 20953119. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095311916614612>
- [22] CHEN, Shaopeng, Yushan LIU, Yu DENG, Yue LIU, Mei DONG, Youwen TIAN, Haiyue SUN a Yadong LI, 2019. Cloning and functional analysis of the VcCXIP4 and VcYSL6 genes as Cd-regulating genes in blueberry. *Gene*. **686**, 104-117. DOI: 10.1016/j.gene.2018.10.078. ISSN 03781119. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111918311272>
- [23] HRSTKA, Miroslav. *Obecná biologie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2005. ISBN 80-214-3057-5.
- [24] Primer Sequences, 2002. On-line 25.7.2020. Dostupné z: <https://nature.berkeley.edu/brunslab/tour/primers.html>.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

PCR	Polymerase chain reaction – Polymerázová řetězová reakce
HRM	High resolution melting – Vysokorozlišovací analýza křivek tání
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
RNA	Ribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
bp	párů bází
kb	kilo párů bází
TBE	Tris-borát-EDTA
UV-VIS	Ultrafialovo-viditelné spektrum