



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

VYUŽITÍ MAGNETICKÝCH ČÁSTIC PŘI IZOLACI DNA Z VYBRANÝCH ZELENINOVÝCH VÝROBKŮ

THE APPLICATION OF MAGNETIC PARTICLES FOR DNA ISOLATION FROM SELECTED VEGETABLE PRODUCTS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Michala Akwari

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Aleš Kovařík, CSc.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1032/2016
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Michala Akwari**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **RNDr. Aleš Kovařík, CSc.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Využití magnetických částic při izolaci DNA z vybraných zeleninových výrobků

Zadání diplomové práce:

1. Vyhledání a kritické zpracování dostupné literatury k dané problematice.
2. Izolace DNA z vybraných druhů zeleninových výrobků (kečup).
3. Ověření kvality izolované DNA.
4. Zpracování získaných experimentálních výsledků.
5. Vyhodnocení experimentů formou diskuse.

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2017

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

Bc. Michala Akwari
student(ka)

RNDr. Aleš Kovařík, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Mikrometóda izolácie DNA s využitím magnetických nosičov je značným zjednodušením a urýchlením procesu izolácie DNA. Cieľom diplomovej práce bolo izolovať DNA mikrometódou z potravín rastlinného (paradajkového) pôvodu pomocou magnetických nosičov a porovnať rozdiely v kvalite izolovanej DNA v závislosti od typu prípravy homogenátu, typu magnetických nosičov, ale aj od typu rastlinného výrobku, použitého pre izoláciu. Výsledky boli ďalej vyhodnotené s ohľadom na množstvo, čistotu a amplifikovateľnosť izolovanej DNA v PCR. Najoptimálnejším bol postup izolácie DNA s použitím magnetických častíc P(HEMA-co-GMA) alebo HPS B-M-NH₂. DNA z testovaných rastlinných potravinových výrobkov bola izolovaná v dostatočnom množstve a kvalite pre použitie v konvenčnej PCR. Neboli zistené rozdiely v amplifikovateľnosti DNA skladovanej pri -20 °C po dobu viac ako pol roka.

ABSTRACT

Micromethod of DNA isolation using magnetic particles is one of the modern technological methods used in DNA isolation, and makes the process simpler, more effective and faster. The main aim of this study was to isolate the DNA from various plant (tomato) food products, using different types of magnetic particles. The results were compared and the quantity, purity and the possibility of amplification of the isolated DNA among samples were found to be different. The DNA isolation method using magnetic particles P(HEMA-co-GMA) or HPS B-M-NH₂ was shown to be the most effective in achieving the above mentioned parameters. DNAs from the analysed samples of plant food products were isolated in sufficient quantity and quality to be used in the conventional PCR. Differences in the possibility of the amplification of the isolated DNA stored at -20 °C during more than a half year were not found.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Mikrometóda, izolácia DNA, potraviny rastlinného pôvodu, magnetické nosiče, polymerázová reťazová reakcia (PCR), uchovávanie DNA

KEYWORDS

Micromethod, DNA isolation, plant food products, magnetic particles, polymerase chain reaction (PCR), DNA storage

AKWARI, M. *Využití magnetických částic při izolaci DNA z vybraných zeleninových výrobků*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 70 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Aleš Kovařík, CSc

PREHLÁSENIE

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

.....
podpis študenta

Rada by som poďakovala svojmu školiteľovi, pánovi RNDr. Alešovi Kovaříkovi, CSc. za vedenie práce a za poskytnutie rastlinného materiálu. Úprimná vďaka patrí taktiež pani doc. RNDr. Alene Španovej, CSc. za jej nesmiernu ochotu a trpezlivosť, za cenné rady a za pomoc pri riešení odborných problémov pri spracovávaní diplomovej práce.

OBSAH

1 ÚVOD:	7
2 TEORETICKÁ ČASŤ	8
2.1 Izolácia DNA z rastlinného materiálu	8
2.1.1 Fenolová extrakcia	9
2.1.2 Metóda CTAB	9
2.1.3 Mikrometóda izolácie DNA	10
2.2 Magnetické častice	10
2.2.1 Vlastnosti	11
2.2.2 Štruktúra magnetických nosičov	12
2.2.2.1 Magnetické jadro	12
2.2.2.2 Vrstva polymérnej matrice	13
2.2.2.3 Funkcionalizácia	13
2.3 PCR	14
2.3.1 Priebeh reakcie	14
2.3.2 Zloženie PCR zmesi	15
2.3.3 Inhibítory PCR	17
2.4 Paradajkové potravinárske výrobky	18
2.4.1 Paradajky	18
2.4.2 Paradajkový pretlak	19
2.4.3 Kečup	20
2.5 Vplyv technologických procesov na kvalitu DNA	20
3 CIEĽ PRÁCE:	21
4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	22
4.1 Materiál	22
4.1.1 Použitý rastlinný materiál	22
4.1.2 Magnetické nosiče	23
4.1.3 Chemikálie	23
4.1.4 Roztoky pre izoláciu a purifikáciu DNA	24
4.1.5 Roztoky pre agarózovú gélovú elektroforézu	25
4.1.6 Komponenty pre PCR	25
4.1.7 Pomôcky	25
4.2 Metódy	26
4.2.1 Príprava homogenátov buniek	26
4.2.2 Izolácia DNA na magnetických nosičoch	27
4.2.3 Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty izolovanej DNA	28
4.2.4 Overenie kvality izolovanej DNA amplifikáciou pomocou PCR	28
4.2.5 Detekcia špecifických produktov PCR agarózovou gélovou elektroforézou	29
4.2.6 Zrážanie DNA	30

4.2.6.1	Zakoncentrovanie pomocou etanolu	30
4.2.6.2	Zakoncentrovanie pomocou izopropanolu.....	30
4.3	Výsledky	31
4.3.1	Testovanie rôznych postupov pre prípravu homogenátu z paradajkových výrobkov	31
4.3.1.1	Čistota a koncentrácia izolovanej DNA.....	31
4.3.1.2	Amplifikovateľnosť izolovanej DNA	33
4.3.2	Vplyv spracovania výrobku na kvalitu a množstvo izolovanej DNA	34
4.3.2.1	Vplyv spracovania výrobku na čistotu a množstvo izolovanej DNA	35
4.3.2.2	Vplyv spracovania na amplifikovateľnosť izolovanej DNA pomocou PCR.....	36
4.3.3	Vplyv použitia PCR enhanceru na amplifikovateľnosť izolovanej DNA	38
4.3.4	Vplyv prezrážania vyizolovanej DNA na jej kvalitu.....	39
4.3.4.1	Zakoncentrovanie pomocou etanolu	39
4.3.4.2	Zakoncentrovanie vyizolovanej DNA pomocou izopropanolu	42
4.3.5	Vplyv skladovania na amplifikovateľnosť DNA.....	44
4.3.5.1	Koncentrácia a čistota čerstvo izolovanej DNA	44
4.3.5.2	Amplifikácia čerstvo izolovanej DNA a po jej skladovaní	45
4.3.6	Amplifikácia špecifického produktu PCR z kontrolnej DNA <i>Brasica oleracea</i>	48
4.3.7	Porovnanie vplyvu rôznych magnetických častíc na kvalitu a množstvo izolovanej DNA	50
4.3.7.1	Koncentrácia a čistota DNA izolovanej rôznymi časticami	50
4.3.7.2	Amplifikovateľnosť DNA izolovanej rôznymi časticami.....	54
4.4	Diskusia	56
4.4.1	Testovanie rôznych postupov pre prípravu homogenátu z paradajkových výrobkov	56
4.4.2	Vplyv spracovania výrobku na kvalitu a množstvo izolovanej DNA	57
4.4.3	Vplyv použitia PCR enhanceru na amplifikovateľnosť izolovanej DNA	57
4.4.4	Vplyv prezrážania vyizolovanej DNA na jej kvalitu.....	57
4.4.5	Vplyv skladovania na amplifikovateľnosť DNA.....	58
4.4.6	Amplifikácia špecifického produktu PCR z kontrolnej DNA <i>Brasica oleracea</i> o rôznych koncentráciách.	59
4.4.7	Porovnanie vplyvu rôznych magnetických častíc na kvalitu a množstvo izolovanej DNA	59
5	ZÁVER	61
6	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	62
7	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A ZNAČIEK	70

1 ÚVOD:

Izolácia DNA je obvykle prvým a základným krokom mnohých molekulárno-biologických metód. Jej čistota má však často výrazný dopad na efektivitu celého procesu, preto je potrebné počas samotnej izolácie postupovať dôsledne, aby sa predišlo prípadnému znečisteniu. Izolácia DNA pomocou magnetických mikročastíc je modernou technológiou, ktorá umožňuje do značnej miery celý proces zefektívniť a urýchliť.

PCR (Polymerase Chain Reaction) je metóda zmnoženia určitého úseku DNA na princípe replikácie. Pre jej relatívnu rýchlosť a jednoduchosť sa dnes využíva v mnohých analýzach v molekulárnej biológii, ale aj v rôznych iných oblastiach výskumu, či testoch. Kladie však dôraz na čistotu DNA templátu, ktorý nesmie obsahovať inhibítory PCR. Preto je dôležitá optimalizácia metód izolácie a purifikácie DNA z matric z rôznych typov biologického materiálu, vrátane potravín.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Izolácia DNA z rastlinného materiálu

Izolácia DNA je proces extrakcie deoxyribonukleovej kyseliny z rôznych zdrojov, akými môžu byť napríklad rastlinný, či živočíšny materiál alebo mikroorganizmy. DNA je okrem bunkových jadier extrahovaná aj z iných organel, ako sú chloroplasty, mitochondrie, či v prípade bakteriálnych buniek plazmidy. Voľba vhodnej metódy závisí na konkrétnej vzorke a odvíja sa okrem iného napríklad od jej pôvodu (typu biologického materiálu), či veľkosti. Ďalšími dôležitými kritériami pri výbere vhodnej metódy sú časová a finančná náročnosť a celková efektívnosť danej metódy s ohľadom na kvalitu extrahovanej DNA pre konkrétny typ použitia. [1]

Z rastlinných pletív býva izolácia DNA obvykle vo všeobecnosti veľmi náročná, nakoľko jednotlivé druhy rastlín vykazujú vzájomne značné odlišnosti. Izolačné metódy bývajú preto často prispôbené konkrétnemu rastlinnému druhu, dokonca i špecifickému rastlinnému pletivu. Rôzne typy rastlín, ale aj rôzne typy buniek vrámci jednej rastliny môžu produkovať celú radu odlišných metabolitov, či štruktúrnych molekúl, ktoré potenciálne komplikujú priebeh extrakcie DNA. Predovšetkým ide o látky, akými sú polysacharidy, polyfenoly a proteíny, ktoré často majú vplyv na samotný proces extrakcie, alebo sa stávajú kontaminantami izolovanej DNA. Tieto faktory majú vo výsledku vplyv na kvalitu izolovanej DNA a na jej ďalšie použitie, nakoľko môžu interferovať s mnohými molekulárno-biologickými analýzami. [2] [3] [4] [5]

Polysacharidy, polyfenoly, či proteíny môžu byť v procese izolácie DNA efektívne odstránené použitím vhodných činidiel. Polyfenoly sú napríklad eliminovateľné použitím PVP (polyvinylpyrrolidónu) či β -merkaptotanolu. [6] Mrazenie vzoriek počas procesu homogenizácie taktiež napomáha znížiť vplyv polyfenolov na extrakciu DNA. [7] Proteíny sú zase najčastejšie odstraňované použitím enzýmov proteináz (proteínáza K), čo spôsobuje ich degradáciu. [8] V prípade polysacharidov sa používa napríklad manitol, glukóza, sacharóza, prípadne vyššie koncentrácie NaCl. Tieto látky sa pridávajú k extrakčnému pufru, čím znižujú množstvo koextrahovaných polysacharidov. [7]

Samotný postup izolácie DNA začína obvykle homogenizáciou rastlinného materiálu. V mnohých prípadoch sa využívajú veľmi nízke teploty pod bodom mrazu (tekutý dusík) a následne mechanická homogenizácia (mletie, trenie a pod.). Udržovanie teploty pod bodom mrazu počas celého priebehu homogenizácie má význam pre inaktiváciu nukleáz, čím sa zabráni prípadnej degradácii DNA. K mechanicky rozrušenému materiálu sa pridávajú detergenty pre dezintegráciu bunkových membrán a následné uvoľnenie DNA do extrakčnej zmesi. Extrakčná zmes obsahuje taktiež chelatačné činidlá (napríklad EDTA), ktoré vychytávajú kationy, fungujúce ako kofaktory väčšiny endonukleáz. Rastlinná RNA je v procese rozrušenia buniek obvykle z veľkej časti rozložená pôsobením prítomných ribonukleáz. V prípade potreby DNA o vysokej čistote môžu byť zbytky RNA odstránené spolu s ostatnými potenciálnymi kontaminantami, použitím príslušných chemických látok a činidiel. [9]

Pre dosiahnutie vyššej koncentrácie a čistoty izolovanej DNA a tiež pre lepšie uchovávanie sa DNA obvykle vyzráža pomocou alkoholu. Vyzrážaný sediment sa od zbytkov rozpúšťadiel vysuší a DNA sa rozpustí v TE pufru. [10]

V súčasnej dobe máme k dispozícii širokú škálu extrakčných metód využívaných pre izoláciu DNA, vrátane rôznych komerčných kitov (komerčné kity umožňujú lepšiu reprodukovateľnosť a jednoduchosť analýzy, na úkor nákladov). [11] Medzi najpoužívanejšie metódy patrí extrakcia pomocou organických rozpúšťadiel (ako sú napríklad fenol a chloroform), vysolovanie, či adsorpcia na pevnú fázu, kde sa ako nosiče mimo iného používajú aj magnetické mikro- alebo nanočastice. [10]

2.1.1 Fenolová extrakcia

Metóda využíva chemické a fyzikálne vlastnosti fenolu k narušeniu komplexu DNA-proteíny a odstránenie proteínov z vodnej fázy ich prestupom do fázy fenolovej. Tento jav je možný na základe nepolárneho charakteru fenolu ako rozpúšťadla, čo umožňuje denaturáciu proteínov a ich precipitáciu na rozhraní fáz. Ďalším dôležitým faktorom je hustota fenolu ($1,07 \text{ g.cm}^{-3}$), ktorá je oproti vode o niečo vyššia, čo spôsobuje oddelenie oboch fáz, pričom fenolová fáza klesá kvôli vyššej hustote na dno skúmavky. [12]

Pre jednoduchší priebeh tohto procesu sa používa prídavok chloroformu do fenolovej fázy. Chloroform je, rovnako ako fenol, látka nepolárna, je preto s fenolom veľmi dobre miešateľná, kým s vodou sa nemieša. Zmes fenol-chloroform nadobúda ešte vyššiu hustotu, a to vďaka prídavku chloroformu, ktorého hustota je v porovnaní s fenolom (aj s vodou) značne vyššia ($1,47 \text{ g.cm}^{-3}$). Zvýšenie rozdielu hustoty medzi polárnou (vodnou) a nepolárnou (fenolovou) fázou spôsobí dôkladnejšie oddelenie oboch fází a odobratá vodná fáza obsahujúca DNA nebude natoľko znečistená. [12] [13]

Významným parametrom je regulácia pH počas procesu izolácie. V závislosti od hodnoty pH sa mení obsah látok v jednotlivých fázach. V prípade, že pH fenolu sa nachádza v slabo zásaditej oblasti (okolo hodnoty 7,8), extrahuje sa DNA spoločne s RNA do vodnej fázy. Ak je však pH fenolu v kyslej oblasti (obvykle 4,8-5,2), stáva sa DNA súčasťou proteínovej medzivrstvy. Vo vodnej fáze sa nachádza iba RNA, v organickej fáze zase lipidy. Proteíny sú vyzrážané na rozhraní organickej a vodnej fázy v oboch uvedených prípadoch. [12] [13]

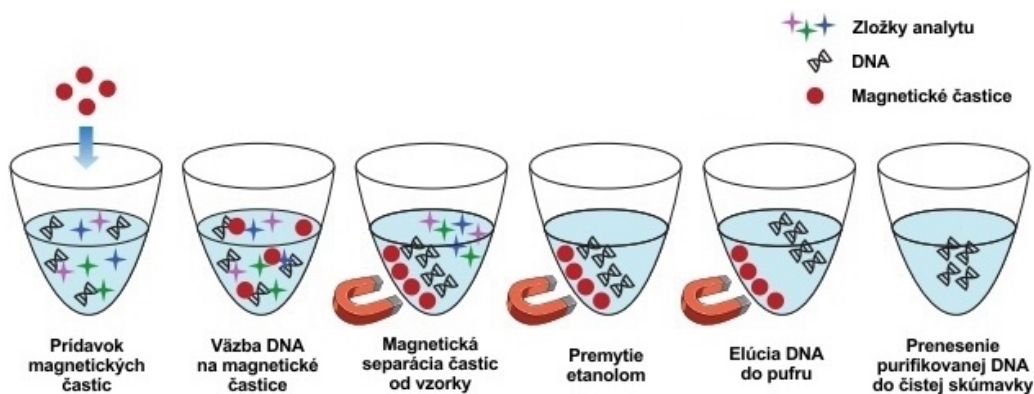
2.1.2 Metóda CTAB

Metóda CTAB je v súčasnej dobe najpoužívanejšou metódou pre izoláciu a purifikáciu DNA z rastlinných pletív. Umožňuje dosiahnutie pomerne vysokých výtťažkov a získaná DNA má vysokú čistotu. Rastlinné vzorky sú bohaté na obsah polysacharidov a polyfenolov, ktoré sú touto metódou efektívne eliminované. [14]

CTAB je kationový detergent, ktorý je schopný oddeliť DNA od polysacharidov na princípe ich rozdielnej rozpustnosti v závislosti od koncentrácie chloridu sodného. Pri vyšších koncentráciách NaCl sú polysacharidy v CTAB nerozpustné a precipitujú, kým pri nižších koncentráciách sa nerozpustnou stáva DNA. Extrakčné činidlo spravidla obsahuje CTAB, EDTA, Tris-HCl (pH 8,0), NaCl a pomocné látky pre odstránenie polyfenolov, alebo v prípade potreby aj iných potenciálnych kontaminantov. [3] Pre tento účel sa často využíva β -merkaptopetanol alebo plyvinylpyrrolidón, ktorý polyfenoly z roztoku vychytáva a bráni tak ich väzbe na DNA a následnej kontaminácii izolátu. [6] [10]

2.1.3 Mikrometóda izolácie DNA

Mikrometóda izolácie DNA je metódou adsorpcie na pevnú fázu, kde a ako nosiče využívajú magnetické mikro- a nanočastice. V prirodzenej forme výskytu DNA nie je schopná adsorpcie na magnetické nosiče, preto sa do separačnej zmesi pridávajú rôzne látky, ktoré väzbu umožňujú. Prítomnosť PEG a NaCl v separačnej zmesi spôsobuje zmenu iónovej sily roztoku, v dôsledku čoho dochádza k zmene rozpustnosti DNA. S tým súvisí aj zmena jej konformácie zo závitnice na guľovito-špirálovitú štruktúru, ktorá sa na nosiče viaže prostredníctvom vodíkových väzieb. Magnetické častice, spolu s naviazanou DNA sú následne odseparované z izolačnej zmesi pomocou pôsobenia vonkajšieho magnetického poľa na magnetické jadro častíc (Obrázok 1). Potenciálne kontaminanty zostávajú v zbytkovom roztoku, čím je zabezpečená efektivita a jednoduchosť metódy. Magnetické častice sú ďalej eluované (obvykle v TE pufrí), čím dochádza k zmene prostredia, DNA sa stáva opäť rozpustnou, jej konformácia sa mení naspäť na závitnicu a uvoľňuje sa do elučného činidla. [10] [15] O podrobnej štruktúre, vlastnostiach a mechanizmoch účinku magnetických častíc pojednáva kapitola 2.2.



Obrázok 1: Schematické znázornenie procesu izolácie DNA magnetickými časticami (upravené podľa [16]).

2.2 Magnetické častice

Tradičné metódy izolácie DNA (ako napríklad fenolová extrakcia) sú síce vysoko účinné, ale pomerne pracné, časovo náročné a zahŕňajú použitie rôznych toxických látok. Preto sa neustále vyvíjajú nové metódy, ktorými by sa tieto negatívne aspekty eliminovali. Jedným z riešení je extrakcia látok imobilizáciou na pevnú fázu (selektívna alebo neselektívna). [17] Táto metóda je v porovnaní s tradičnými metódami jednoduchšia, menej časovo náročná a pomerne finančne dostupná. [18] [19] [20] Jedným z príkladov imobilizácie látok na pevnú fázu je tiež využitie magnetických nosičov. Veľkou výhodou je mimo iného aj možnosť extrakcie látok zo zložitých biologických systémov a komplexných vzoriek a matríc. [17] Okrem izolácie DNA, či iných dôležitých látok, nachádzajú magnetické nosiče pomerne široké uplatnenie v mnohých oblastiach priemyslu, biotechnológií, biochémie, či medicíny, [18] [19] [20] kde sa uplatňujú napríklad ako nosiče biologicky aktívnych látok (hormóny, enzýmy, protilátky, liečivá a pod.), pri značení buniek alebo pri zobrazovaní pomocou magnetickej rezonancie. [21]

2.2.1 Vlastnosti

Základnými vlastnosťami popisujúcimi magnetické nosiče sú veľkosť, tvar, morfológia, disperzita častíc, [22] zloženie a funkcionalizácia. Tieto vlastnosti majú výrazný vplyv na separačné schopnosti nosičov a teda aj na ich využitie. [17] [22] [23]

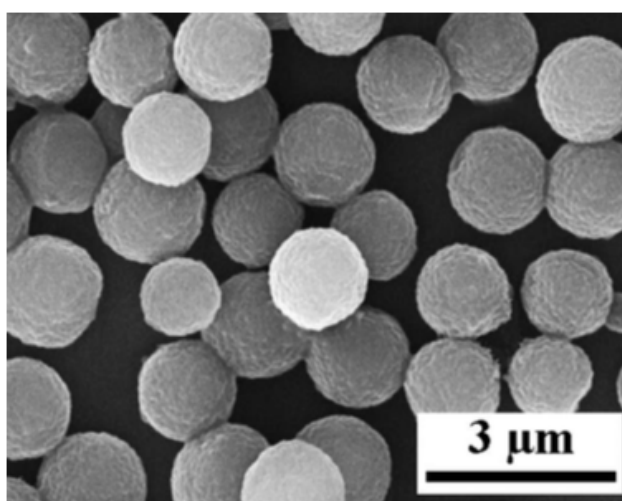
Veľkosť magnetických nosičov sa pohybuje v rozmedzí 10-20 nm (nanočastice), alebo 0,1 – 100 μm (mikročastice). Čím je častica väčšia, tým je menší jej špecifický povrch, vzhľadom k celkovému objemu. Pre analýzu sú teda výhodnejšie malé častice, z veľkým špecifickým povrchom, umožňujúcim naviazanie požadovaných funkčných skupín. Príliš malé častice ale môžu mať nízku magnetickú citlivosť, preto je potrebné vybrať veľkosť nosičov tak, aby častice mali čo najväčší povrch, nie však na úkor ich magnetických vlastností. [22]

Z hľadiska disperzity (rozloženia veľkosti častíc) delíme častice na monodisperzné a polydisperzné. Monodisperzné častice majú všetky rovnakú veľkosť. V roztoku nedochádza k tvorbe zhlukov (alebo len minimálne) a zachovávajú si jednotné fyzikálne, chemické a biologické vlastnosti, sú preto pre väčšinu analýz vhodnejšie. Veľkosť polydisperzných častíc je rôznorodá, ale nevykazuje príliš veľké odchýlky medzi jednotlivými časticami. [22]

Magnetické nosiče môžu tiež nadobúdať rozličné tvary (gulička, tyčinka, vlákno, nepravidelný tvar, ...). Najvýhodnejším je tvar guľičky, ktorý je najstabilnejší (častice nepravidelného tvaru sú náchylnejšie k mechanickému poškodeniu) a zároveň má najlepšie hydrodynamické vlastnosti, čoho sa využíva napríklad pri prestupe častíc roztokom pôsobením magnetického poľa. [22]

Zloženie magnetického jadra častíc má významný vplyv na magnetické vlastnosti nosiča, ale podmieňuje tiež jeho stabilitu a biokompatibilitu. Pre zlepšenie vlastností sa používajú rôzne povrchové úpravy magnetického jadra, ktorých charakter môže ovplyvňovať funkcionalizáciu a tiež interakciu častíc s okolitým prostredím. [24]

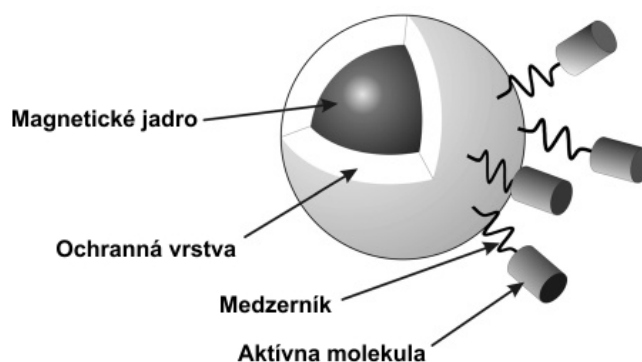
O vplyve zloženia na vlastnosti a použitie magnetických častíc bližšie pojednáva kapitola 2.2.2 Štruktúra magnetických nosičov. Neporézne magnetické častice P(HEMA-co-GMA) gučkovitého tvaru zobrazuje Obrázok 2.



Obrázok 2: Magnetické častice P(HEMA-co-GMA) – skenovacia elektrónová mikroskopia (SEM) (prevzaté z [25]).

2.2.2 Štruktúra magnetických nosičov

Magnetické častice majú štruktúru kompozitných materiálov. Hlavnú zložku tvorí fero- alebo ferimagnetická látka, ktorá zabezpečuje ich magnetické vlastnosti. Magnetické jadro je na povrchu enkapsulované tenkou vrstvou diamagnetického materiálu, ktorý chráni magnetickú zložku pred kontaktom s chemickými látkami v prostredí a taktiež umožňuje väzbu funkčných skupín, zodpovedajúcich za špecificitu nosičov. [22] [26] [25] [27] Schematická štruktúra magnetických častíc je uvedená na Obrázku 3.



Obrázok 3: Schéma štruktúry magnetickej častice (upravené podľa [28]).

2.2.2.1 Magnetické jadro

Magnetické jadro je dôležitou súčasťou nano- a mikročastíc, ktorá umožňuje ich jednoduchú separáciu z roztokov. [29] Je tvorené superparamagnetickými materiálmi, ktoré majú magnetické vlastnosti iba v prítomnosti vonkajšieho magnetického poľa. Táto vlastnosť má nesmierny význam, aby po odstránení magnetického poľa častice nevykazovali zbytkový magnetizmus, ktorý by mohol spôsobovať ich vzájomnú agregáciu. [26] [30]

Výhodou magnetických jadier je malá veľkosť (čím menšia veľkosť, tým väčší povrch). S klesajúcou veľkosťou však dochádza zároveň k poklesu citlivosti na pôsobenie vonkajšieho magnetického poľa, čo je pre správnu funkciu nosičov nežiadúce. Magnetické jadro by taktiež malo disponovať dobrou chemickou stabilitou pri rôznych redoxných podmienkach a pri rôznych hodnotách pH. Malo by byť biokompatibilné (vhodné pre prácu s biologickým materiálom), cenovo dostupné a ľahko vyrobiteľné. [22]

Na základe týchto parametrov sú najvhodnejšími materiálmi pre prípravu magnetických jadier oxidy železa a ferrity. Oxidy železa sú širokou skupinou látok, označujúcich sa všeobecným chemickým vzorcom $Fe_xO_yH_z$, pričom vo väčšine prípadov $z = 0$. Všeobecný vzorec pre ferrity je $MO \cdot Fe_2O_3$, kde M je kovom skupiny prechodných prvkov, ako sú Fe, Mn, Co, Zn, Cu a Ni. Najčastejšími zástupcami týchto materiálov sú magnetit Fe_3O_4 ($FeO \cdot Fe_2O_3$) a maghemit $\gamma\text{-}Fe_2O_3$, s magnetizáciou približne o dva rády vyššou v porovnaní s ostatnými oxidmi. [22] [30] [31] [32] V prípade magnetitu je to spôsobené prítomnosťou kationov Fe^{2+} a Fe^{3+} v kryštalickej mriežke, v praxi sa však využíva hlavne ako prekurzor k príprave maghemitu, nakoľko je pomerne citlivý k oxidácii, a teda nie je veľmi stabilný. Naproti tomu maghemit vo svojej kryštalickej mriežke obsahuje iba ióny Fe^{3+} , pričom svojimi vlastnosťami je magnetitu podobný. [22] Vďaka svojej vyššej stabilite je maghemit pre využitie v biologických aplikáciách vhodnejší. [21]

Výborné magnetické vlastnosti vykazujú taktiež rôzne zlúčeniny kobaltu, niklu a chrómu, ich použitie je ale v praxi do značnej miery obmedzené kvôli ich vysokej toxicite a taktiež náchylnosti voči oxidácii. [28] [33]

2.2.2.2 Vrstva polymérnej matrice

Jednou z výhod magnetických mikro- a nanočastíc je ich malá veľkosť, ktorá poskytuje veľký povrch vzhľadom k ich celkovému objemu. Táto vlastnosť umožňuje na jednu stranu naviazanie väčšieho počtu aktívnych skupín, na stranu druhú ale spôsobuje ich vysokú reaktivitu. Vhodná povrchová úprava magnetického jadra vo významnej miere bráni vzniku nešpecifických interakcií so zložkami prostredia, jadro stabilizuje, zabezpečuje jeho biokompatibilitu, uľahčuje funkcionizáciu nosičov, a tým napomáha špecifickým väzbám biologicky významných látok. Okrem toho tiež bráni vzájomnej agregácii častíc, ktorá by mohla mať za následok stratu paramagnetických vlastností. [28] [33] [34]

Pre povrchovú úpravu magnetických nosičov sa najčastejšie využívajú polymérne matrice prírodného aj syntetického pôvodu. V niektorých prípadoch možno tiež využiť určité organické, či anorganické zlúčeniny, akými sú napríklad rôzne kovy (napr. zlato), uhlík, alebo oxidy (oxid kremičitý, oxid hlinitý, ...). Typ použitej matrice taktiež ovplyvňuje spôsoby využitia daného nosiča. [21] [34] [35]

Z prírodných polymérov sa najčastejšie využívajú zlúčeniny ako dextrans, hyaluronany, pektíny, chytozán, alginát, škrob, celulóza alebo agaróza. [36] [37] [38] Hlavnou výhodou týchto látok je ich biokompatibilita a biodegradovateľnosť na netoxické produkty, čo umožňuje ich použitie napríklad v biomedicínskych aplikáciách. [28] Na druhú stranu ale bývajú obvykle porézne, čiastočne rozpustné a často neselektívne na svojom povrchu adsorbujú proteíny.

Z hľadiska fyzikálnych a chemických vlastností bývajú preto efektívnejšie syntetické polyméry, napríklad polystyrén (PS), polyetylén glykol (PEG), polymetylmakrylát (PMMA), polyvinylalkohol (PVA), alebo poly(mliečna) kyselina (PLA). Tieto však nemusia byť vždy vhodné pre biologické aplikácie. [28] [34] [39]

2.2.2.3 Funkcionizácia

Funkcionizáciou magnetických nosičov sa rozumie naviazanie určitých funkčných skupín na ich povrchovú polymérnu vrstvu. Typ naviazaných funkčných skupín vo výraznej miere ovplyvňuje ich fyzikálne a chemické vlastnosti a predurčuje tak spôsob ich použitia. Na základe typu naviazaných funkčných skupín možno nosiče rozdeliť do troch základných kategórií, a to:

- hydrofóbne nosiče – obsahujú hydrofóbne funkčné skupiny (mastné kyseliny, alkylfenoly a pod.), teda sú vhodné pre použitie v organických roztokoch
- hydrofilné nosiče – vďaka naviazaným polárnym, hydrofilným funkčným skupinám (napríklad amónne soli, polyoly alebo lyzín) sú kompatibilné s vodnými roztokmi
- amfipatické nosiče – obsahujú funkčné skupiny polárne aj nepolárne, nedochádza teda k ich agregácii ani vo vode, ani v nepolárnych organických rozpúšťadlách a možno ich použiť v oboch prípadoch.

Použitie konkrétnej funkčnej skupiny tiež určuje konkrétne využitie daných magnetických nosičov (izolácia DNA, RNA, proteínov, enzýmov a i.). V tejto diplomovej práci boli použité dva druhy funkčných skupín: $-\text{COOH}$ a $-\text{NH}_2$. [40]

Karboxylové funkčné skupiny ($-\text{COOH}$) spadajú do kategórie polárnych funkčných skupín, čo predurčuje ich použitie v polárnych roztokoch. Izolácia DNA pomocou týchto nosičov prebieha formou nešpecifickej adsorpcie medzi dusíkatými bázami DNA a povrchovými $-\text{COOH}$ skupinami na magnetických nosičoch. [25] Podrobný mechanizmus tejto reakcie je veľmi komplexný a doposiaľ nebol úplne objasnený. Proces izolácie sa uskutočňuje v prostredí polyetylénglykolu a chloridu sodného a adsorbovaná DNA je obvykle eluovaná do vody, prípadne do iného roztoku s nízkou iónovou silou (TE pufor). [41] [42] Množstvo DNA adsorbovanej na nosič závisí na koncentrácii zložiek separačnej zmesi. [43] Stúpajúca koncentrácia PEG a NaCl spôsobuje pokles aktivity vody, čo má za následok kondenzáciu dvojzávitnice DNA. [15]

Nosiče funkcionalizované aminoskupinou $-\text{NH}_2$ sa, podobne ako $-\text{COOH}$, zaraďujú medzi hydrofilné, budú preto taktiež optimálne fungovať pri použití v polárnych roztokoch. Skupina $-\text{NH}_2$ je vo vhodnom prostredí protonizovaná na $-\text{NH}^+$, čo umožňuje vznik elektrostatických interakcií so záporne nabitými fosfátovými skupinami molekúl DNA. [44] [45] Adsorpcia DNA na povrch nosičov prebieha obvykle najefektívnejšie v prostredí o vysokej iónovej sile a DNA sa následne eluuje v prostredí s 0,7 M NaCl. Najčastejšie nosiče funkcionalizované aminoskupinami sú nosiče s polymérou matricou, ktorá obsahuje voľné karboxylové alebo hydroxylové skupiny, prípadne s matricou polystyrénovou. [17] [44] [46] [47]

2.3 PCR

Polymerázová reťazová reakcia je v súčasnej dobe jednou z najrozšírenejších metód využívaných v molekulárno-biologických analýzach. Nachádza uplatnenie napríklad v analýze potravín, mapovaní a charakterizácií génov, prenatálnej diagnostike, kriminalistike, paleontológii a v mnohých ďalších odvetviach. [48]

Jej podstatou je amplifikácia úseku DNA (amplikónu), ktorý je vymedzený naviazaním špecifických primerov. Ako templát pre amplifikáciu môže slúžiť jednovláknová DNA (ssDNA) aj dvojitá DNA (dsDNA), dokonca vo výnimočnom prípade aj RNA (RT-PCR). Medzi hlavné výhody polymerázovej reťazovej reakcie patrí jej citlivosť, ktorá umožňuje amplifikáciu aj z veľmi malého množstva templátu. [49]

2.3.1 Priebeh reakcie

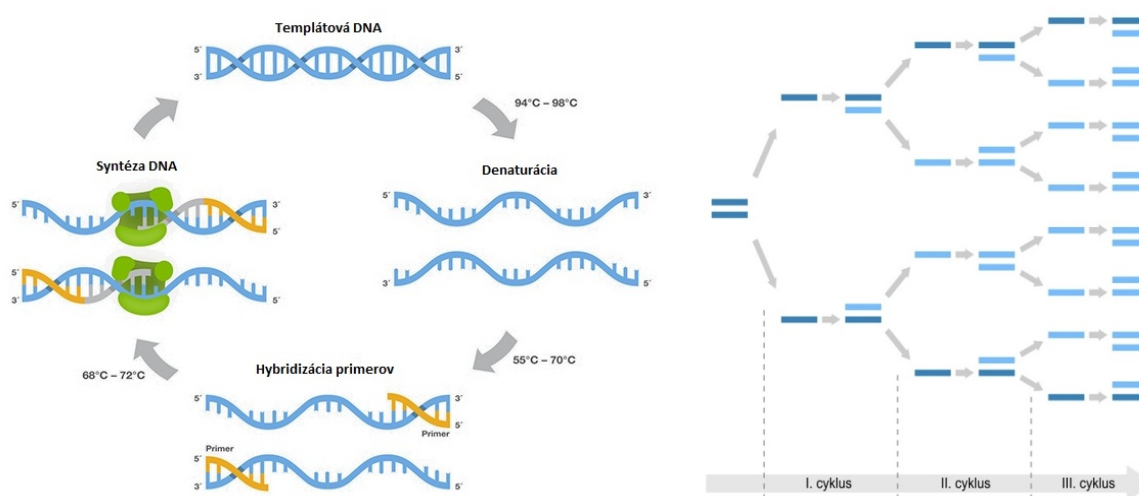
Polymerázová reťazová reakcia spočíva v cyklickom opakovaní troch základných krokov:

- **Denaturácia DNA** prebieha zahriatím reakčnej zmesi nad teplotu topenia templátovej DNA. Táto teplota býva obvykle medzi 92-96 °C a závisí od konkrétnej molekuly. Zahriatie býva pred prvým krokom často predĺžené, aby sa dosiahla úplná denaturácia celého vlákna, nakoľko pôvodná templátová DNA je mnohonásobne dlhšia ako cieľový amplikón. [33]
- **Hybridizácia primerov (annealing)** sa dosiahne ochladením reakčnej zmesi na teplotu okolo 50-60 °C, v závislosti na dĺžke a nukleotidovom zložení použitých primerov. Pri

tejto teplote dochádza k väzbe primerov na špecifické sekvencie templátových vláken DNA.

- **Syntéza DNA** vyžaduje opäť zahriatie, a to na optimálnu teplotu zvolenej polymerázy (v prípade *Taq* polymerázy je to 72 °C). Pri tejto teplote polymeráza vykazuje najvyššiu enzymatickú aktivitu a prebieha syntéza nových reťazcov DNA v smere 5' → 3' na základe komplementarity báz podľa templátových vláken DNA s nasadnutými primermi.

Tieto kroky sa mnohonásobne cyklicky opakujú, v dôsledku čoho dochádza k exponenciálnemu nárastu počtu kópii amplifikovaného úseku DNA (Obrázok 4). Počet cyklov sa obvykle pohybuje medzi 20-40 a závisí od počiatočnej koncentrácie templátovej DNA (pri malých množstvách je potrebný väčší počet cyklov). [50] [51]



Obrázok 4: Princíp polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) (upravené podľa [52] a [53]).

2.3.2 Zloženie PCR zmesi

PCR zmes sa obvykle pripravuje do objemu 25 µl. V niektorých prípadoch je možné pripraviť iný objem, tento faktor je ale potrebné zohľadniť pri nastaveniach parametrov metódy. PCR zmes je tvorená vždy rovnakými komponentami. V závislosti od konkrétneho typu analýzy sa zloženie môžu použiť rôzne varianty niektorých z týchto komponentov, prípadne je možné upraviť ich použité množstvo.

- **PCR voda** sa používa na doplnenie pripravenej PCR zmesi na požadovaný objem. Pre tento účel je vhodná napríklad voda s odporom 18 mΩ. [54]
- **PCR reakčný pufor** vytvára optimálne prostredie pre pôsobenie DNA polymerázy, nezbytné pre správny priebeh reakcie. Presné zloženie puforu závisí na konkrétnej DNA polymeráze, spolu s ktorou je dodávaný. Štandardný reakčný pufor obsahuje 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 - 8,8), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, prípadne ďalšie zložky (acetamid, albumín, želatína, ...) [55]
- **Mg²⁺ (horečnaté katióny)** sú kofaktorom nezbytným pre správnu funkciu DNA polymerázy. Spravidla sú do PCR zmesi pridávané vo forme MgCl₂, ktorý býva väčšinou súčasťou reakčného puforu. V prípade potreby optimalizácie množstva horečnatých katiónov v PCR zmesi pre danú kombináciu DNA templátu a použitých

primerov sa môže pridávať aj samostatne, pričom sa používa reakčný pufoer bez obsahu $MgCl_2$. Nedostatok horečnatých kationov spôsobuje inhibíciu DNA polymerázy, čo znemožňuje syntézu amplikónov, naopak ich nadbytok znižuje špecificitu PCR.

- **Primery** sú krátke oligodeoxyribonukleotidy o veľkosti 15 - 25 nukleotidov, ktoré určujú špecificitu polymerázovej reťazovej reakcie. Poradie ich nukleotidov je komplementárne s koncovou sekvenciou amplifikovaného úseku templátovej DNA. PCR zmes pre amplifikáciu dvojvláknovej DNA (dsDNA) obsahuje 2 typy primerov: F (forward) a R (reverse), pričom každý z nich sa viaže na jeden z komplementárnych reťazcov templátovej molekuly. [56] Primery obsahujú vyvážený obsah G/C a A/T nukleotidov (50-60 %), od čoho sa odvíja ich teplota topenia (T_m), ktorá sa obvykle pohybuje v rozmedzí 55 - 65 °C. Teplota topenia zvolených primerov predurčuje reakčnú teplotu 2. fázy PCR cyklu. Zvolené primery nesmú byť vzájomne komplementárne, čo by viedlo k vzniku dimérov a sekundárnych štruktúr, akými sú napríklad vlásenky. Optimálnou koncentráciou primerov v PCR zmesi je 0,1 - 0,6 μM , pri výraznom nadbytku dochádza k vzniku nešpecifických produktov. [48] [57]
- **dNTP** (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) – stavebné zložky novosyntetizovaného reťazca DNA. Sú monomérnymi jednotkami deoxyribonukleovej kyseliny a v procese syntézy DNA sú polymerizované za vzniku nového reťazca. Optimálna koncentrácia je 200 μM , v prípade príliš vysokého obsahu majú na DNA polymerázu inhibičný účinok, pretože z roztoku vyvážajú horečnaté kationy.
- **DNA polymeráza** je enzým katalyzujúci syntézu nového vlákna DNA podľa templátovej DNA s naviazanými primermi. Syntéza nového reťazca prebieha v smere od 5' → 3' koncu. DNA polymeráza pre použitie v PCR musí byť termostabilná, aby nebola deaktivovaná opakovaným zahrievaním PCR zmesi na vysoké teploty. V súčasnosti je známych viacero rôznych termostabilných DNA polymeráz s odlišnými vlastnosťami. Voľba vhodnej polymerázy sa odvíja od zámeru analýzy. Najbežnejšie používanou PCR polymerázou je *Taq* polymeráza, izolovaná z mikroorganizmu *Thermus aquaticus*, ktorá vydrží opakované zahrievanie až na 94 °C. Teplotným optimom jej aktivity je 75 °C. [50] [55] Ďalšími používanými termostabilnými polymerázami využívanými v PCR sú *Pwo* (z *Pyrococcus woesei*) a *Pfu* (z *Pyrococcus furiosus*) DNA polymerázy, ktoré majú vďaka exonukleázovej aktivite tiež schopnosť opraviť chybné inkorporované nukleotidy. Vďaka tomu je pri syntéze zvoleného amplikónu dosiahnutá mnohonásobne väčšia presnosť. Na rozdiel od *Taq* polymerázy ale nie sú schopné syntetizovať dlhšie úseky DNA. [48] *Tth* DNA polymeráza (z *Thermus thermophilus*) má v prítomnosti iónov Mn^{2+} aktivitu reverznej transkripcie, vďaka čomu je možné ju použiť v RT-PCR. [56] [58] Zaujímavou je tiež polymeráza *Tli* z *Thermococcus litoralis*, ktorá je pomerne odolná voči inhibítorom a vyšším koncentráciám solí. [59]
- **DNA matrica** (templátová DNA) je DNA obsahujúca cieľové miesta pre špecifickú väzbu primerov, na základe ktorej prebieha komplementárne syntéza cieľového amplikónu. Obvykle ide o analyzovanú vzorku izolovanej DNA. Správny priebeh PCR je možné overiť pomocou pozitívnej a negatívnej kontroly. V prípade negatívnej

kontroly je prídavok DNA matrice nahradený rovnakým objemom PCR vody, kým pri pozitívnej kontrole sa ako templát používa známa referenčná DNA s istotou amplifikácie cieľového špecifického produktu. [57] [54]

V prípade konvenčnej PCR je amplifikácia špecifického produktu obvykle detegovaná pomocou agarózovej gélovej elektroforézy, ktorou sa okrem iného dá zistiť aj približná veľkosť amplikónu.

2.3.3 Inhibítory PCR

Ako inhibítory PCR sa označujú všetky látky, ktoré negatívne ovplyvňujú priebeh PCR, teda ju spomaľujú, prípadne úplne znemožňujú. Výsledkom pôsobenia inhibítorov je znížená citlivosť PCR, alebo falošne negatívne výsledky. Takýto účinok môžu mať zlúčeniny rôzneho charakteru, akými často bývajú mnohé organické, ale aj anorganické zlúčeniny. [60] [61]

Napriek tomu, že výsledný efekt pôsobenia inhibítorov PCR je známy, jeho mechanizmy nie sú zatiaľ pri všetkých zlúčeninách úplne objasnené. Inhibítory môžu účinkovať v ktoromkoľvek kroku PCR a zabrániť tak správne a úplnému priebehu reakcie. [62] [63] Najčastejšími mechanizmami sú:

- Interakcia inhibítora s molekulou DNA
- Interakcia inhibítora s DNA polymerázou

Interakcia inhibítora s DNA môže prebiehať rôznymi spôsobmi. V prípade enzymatických inhibítorov často dochádza k degradácii templátovej DNA (nukleázy), iné typy enzýmov zase spôsobujú modifikáciu tejto molekuly. V dôsledku týchto zmien nie je možný správny priebeh PCR. Niektoré inhibítory sú zase schopné väzby na molekulu templátovej DNA. Dôsledkom býva často znemožnenie väzby primerov na špecifické miesto templátu, čo znamená nemožnosť iniciácie syntézy nového vlákna. [64] [65]

Ďalšou skupinou sú inhibítory zamerané na aktivitu DNA polymerázy. Tú môžu ovplyvňovať priamo alebo nepriamo. Príkladom priameho účinku sú napríklad proteázy, prípadne detergenty, ktoré môžu DNA polymerázu degradovať. [63] [66] Látky ako vápnik, kolagén, či taníny inhibujú činnosť DNA polymerázy, a to väčšinou väzbou do jej aktívneho miesta. Vápenaté kationy napríklad formou kompetitívnej inhibície nahrádzajú horečnaté ióny, čím znemožňujú správnu funkciu DNA polymerázy. [67] Polysacharidy svojou štruktúrou zase pripomínajú DNA čo má opäť za následok narušenie procesu syntézy. [68] Nepriamym účinkom inhibítorov na DNA polymerázu je napríklad vychytávanie horečnatých kationov, ktoré sú dôležitým kofaktorom tohto enzýmu. Takýto účinok majú napríklad chelatačné činidlá, ako EDTA, z rastlinného pôvodu sú to napríklad taníny. [60] [67]

Vzorka analyzovanej DNA môže byť inhibítormi PCR kontaminovaná rôznymi spôsobmi. Obvykle sú inhibítory do vzorky

- vnesené v priebehu manipulácie (nevhodný odber, transport, spracovanie, ...)
- pochádzajú priamo z materiálu, z ktorého bola DNA izolovaná

Úplná purifikácia DNA od niektorých kontaminantov býva veľmi náročná, nakoľko majú tieto látky tendenciu viazať sa napríklad na laboratórne pomôcky (predovšetkým plastové), v niektorých prípadoch dokonca na samotnú DNA, s ktorou sú koextrahované. [60] [69]

Pri práci s rastlinnou DNA sú bežnými inhibítormi rozličné primárne aj sekundárne metabolity rastlín, prípadne ich štruktúrne molekuly. Patria sem hlavne polysacharidy (napr.

pektín, inulín a xylán), niektoré polyfenoly, proteíny (vrátane rozličných enzýmov), tuky, minerálne látky a mnohé ďalšie. [60] [69]

Inhibítory môžu byť do vzorky v priebehu manipulácie vnesené buď neopatrnosťou (napríklad prášok z rukavíc), alebo sú do vzorky zámerne pridávané za určitým účelom (ako súčasť rôznych činidiel). Takýmito látkami sú napríklad alkoholy (etanol, izopropanol, ...), používané pre zakonzentrovanie vzorky DNA, organické rozpúšťadlá (napr. fenol), detergenty (napr. SDS) a anorganické soli (KCl, NaCl, ...), ktoré sa uplatňujú v procese extrakcie DNA, či spomínané chelatačné činidlo EDTA, ktoré je napríklad súčasťou TE pufrov pre uchovávanie izolovanej DNA. [70] [71] [72]

Bolo tiež potvrdené že zníženie citlivosti PCR môže nastať aj v dôsledku kontaktu zložiek PCR zmesi s plastovými materiálmi vystavenými UV žiareniu (napríklad skúmavky a iné laboratórne pomôcky). [73] [74] [75] [76] Citlivosť PCR závisela tiež na dávke UV žiarenia. [77]

2.4 Paradajkové potravinárske výrobky

2.4.1 Paradajky

Chemické zloženie paradajok má výrazný vplyv nie len na ich výživovú hodnotu a sensorické vlastnosti, ale aj na produkty z nich vyrobené a parametre ich analýzy. Paradajky sú šťavnaté, dužinaté plody, ktorých obsah vody sa obvykle pohybuje v rozmedzí 90 – 95 %, kým obsah sušiny je väčšinou 4 – 9 %. [78]

Z obsahu sušiny, tvoria najvýznamnejšiu časť jednoduché cukry a organické kyseliny, ktoré majú významný vplyv na sensorické vlastnosti. [79] Zastúpenie majú tiež farbivá (karotenoidy), vitamíny a minerálne látky. [78]

Sacharidy tvoria približne 1 – 6 % obsahových látok v sušine. Prevládajú predovšetkým jednoduché cukry, akými sú glukóza (až 60 % z celkového obsahu cukrov) a fruktóza, v malom množstve sa vyskytuje aj sacharóza. [79] Polysacharidy majú výrazne menšie zastúpenie, pričom hlavným zástupcom sú pektíny, ktoré sa dozrievaním plodov postupne štiepia na galakturonáty. [80] V nezrelých plodoch sa vyskytuje aj určité množstvo celulózy, ktoré sa v priebehu dozrievania taktiež znižuje. Škrob je prítomný len v stopových množstvách. [78] [79]

Kyseliny – O prítomnosti kyselín vypovedá hodnota pH plodu paradajky, ktorá sa pohybuje medzi 3,7 – 4,5. [81] Celkový obsah kyselín býva 0,3 – 0,5 %. Najzastúpenejšími sú kyselina jablčná a citrónová, v menších množstvách aj kyselina vínna. V nezrelých plodoch sú prítomné voľné kyseliny, pričom v plodoch zrelých sa nachádzajú vo forme kyslých solí. V nadmerne prezretých plodoch sa v zvýšenom množstve vyskytujú ešte kyselina jantárová, šťaveľová, mliečna a octová. [81] [82]

Dusíkaté látky majú pomerne malé zastúpenie a tvoria ich predovšetkým enzýmy, akými sú napríklad pektáza, depolymeráza alebo invertáza. V nezrelých plodoch sú dusíkaté látky prítomné predovšetkým vo forme proteínov, ktoré sú počas dozrievania postupne odbúravané a v zrelých plodoch sa vyskytujú prevažne voľné aminokyseliny. [81]

Rastlinné farbivá prítomné v plodoch paradajky sú karotenoidovej povahy, prevažne so štruktúrou tetra-terpénov. Jedná sa o žlté, žltozelené, oranžové a červené rastlinné pigmenty. Hlavným pigmentom zrelých paradajkových plodov je lykopén (červené sfarbenie), ktorý

tvorí až 95 % všetkých karotenoidov, s obsahom až 20 – 750 mg/kg. [81] [83] Ide o izomér *beta*-karoténu, ktorý ale nemá jonónový kruh, teda sa nemôže uplatniť ako provitamín A. [84] Patrí však medzi významné antioxidanty, čím pomáha v prevencii voči rôznym ochoreniam. [79] [85] V malom množstve (2,8 – 5,8 mg/kg) je prítomný aj β -karotén, prípadne ďalšie karotenoidy, ako napríklad fytofluén a fytoén. [83]

Vitamíny – V najvyšších koncentráciách sa v plodoch paradajky vyskytuje vitamín C (kyselina askorbová), a to až 80 – 380 mg/kg jedlého podielu. Jeho obsah je v povrchovej vrstve 3x vyšší oproti vnútornej dutine a šťave. Zastúpenie majú aj vitamín E (3,6 – 4,9 mg/kg), pyridoxín (1,3 – 1,6 mg/kg), [79] a vitamíny zo skupiny B, a to hlavne tiamín (16-120 mg/100g) a riboflavín (20-50 mg/100g) a v malom množstve aj niacín (< 1mg/100g). [86] [87]

Minerálne látky – Z minerálnych látok prevládajú zlúčeniny draslíka, sodíka a horčíka. Vápnik je v minerálnych látkach zastúpený len veľmi málo. Plody paradajok majú tiež pomerne vysoký obsah železa, kobaltu a zinku a z mikroelementov sú to napríklad vanád, jód, mangán, meď, molybdén, chróm a ďalšie. [82] [85]

2.4.2 Paradajkový pretlak

Paradajkový pretlak je významnou potravinou a zároveň surovinou, ktorá je základom pre prípravu mnohých ďalších potravín, či pokrmov. Jeho výroba je v súčasnosti mierne na ústupe, nakoľko sa populárnejším stáva z neho vyrábaný kečup.

Prvým základným krokom pri výrobe paradajkového pretlaku je drvenie a súčasné zahrievanie suroviny – paradajok. V niektorých prípadoch prebieha zahrievanie až po rozdrvení. Kvôli zabráneniu extrakcie tukov do hotového produktu sa doporučuje pred samotným zahrievaním odstrániť paradajkové semená. Tento proces prebieha pasírovaním. [88]

Proces výroby samotného pretlaku môže prebiehať dvomi spôsobmi:

- **„Hot break“** je na našom území používaný v prevažnej väčšine výrob. Ide o zahriatie medziproduktu na vysokú teplotu, až do 105 °C. Pri tejto teplote dochádza k inaktivácii enzýmov, v paradajkových produktoch predovšetkým pektinesteráz. Nedochádza tak k rozkladu pektínov, ktoré sa podieľajú na správnej konzistencii výsledného produktu.
- **„Cold break“** je z nutričného hľadiska šetrnejším postupom, používaným predovšetkým v zahraničí. Výsledný produkt má výborné organoleptické vlastnosti (chuť, farbu, arómu) a je vhodný pre priamu konzumáciu. Paradajková drť je zahriata na 65 – 70 °C, čo je teplota, pri ktorej nedochádza k úplnej inaktivácii enzýmov. Pektíny prítomné v paradajkách sú teda čiastočne rozložené, čo má za následok redšiu konzistenciu takto vyrobeného pretlaku. [89] [90]

Tepelne upravená surovina sa ďalej pretláča cez pasírku, ktorú predstavuje obvykle systém niekoľkých sít usporiadaných za sebou s postupne sa zmenšujúcim priemerom otvorov. Pasírovanie zabezpečuje jemnú a pomerne homogénnu textúru výsledného produktu. [88]

Ďalším krokom je zahusťovanie pretlaku, ktoré prebieha na odparkách, až na výsledný podiel sušiny 29 %. Takto pripravený produkt sa zahreje na 85 °C, uzavrie sa do príslušných obalov a nasleduje proces sterilácie pri 95 °C po dobu 10 min. [81]

2.4.3 Kečup

Kečup je potravinová výroba z paradajkového pretlaku jeho zakonzentrováním (2 – 4 krát) a dochutením ďalšími prísadami, akými sú napríklad soľ, ocot, sladidlá alebo extrakty z korení. Požadované množstvá jednotlivých surovín sa stáleho premiešavania zahrievajú na teplotu aspoň 80 °C, až kým sa nedosiahne požadovaný obsah sušiny. Dodržanie požadovanej teploty je nevyhnutné kvôli zachovaniu kvality potravinovej a ako prevencia voči novej kontaminácii mikroorganizmami. [81]

V ďalšom kroku sa upravuje stabilita výrobku prídavkom stabilizátorov, ako napríklad niektoré modifikované škroby, pektíny a pod. Stabilizátory zabráňujú oddeleniu pevného podielu od kvapalného a taktiež upravujú konzistenciu. Posledným krokom je konzervácia, ktorá v prípade kečupu môže byť chemická alebo tepelná, zahriatím výrobku na požadovanú sterilizačnú teplotu po určitú dobu a následné schladenie na teplotu skladovania. [80]

2.5 Vplyv technologických procesov na kvalitu DNA

Základné potravinárske procesy prebiehajúce pri spracovaní potravín rastlinného pôvodu môžu výrazným spôsobom ovplyvniť kvalitu DNA, prípadne proces jej izolácie. To má následne dopad na jej kvantitatívne stanovenie, ale aj na mnoho ďalších analytických metód, ktorých citlivosť môže byť v dôsledku zmeny kvality DNA znížená. Medzi takéto procesy patrí napríklad mechanické spracovanie, zahrievanie na vysoké teploty, zmeny pH, enzymatická aktivita, či fermentácie. Vplyvom týchto faktorov najčastejšie dochádza k zmenám štruktúry DNA, akými sú hydrolýza, oxidácia alebo deaminácia. [91] [92]

Pôsobením vysokej teploty dochádza predovšetkým k denaturácii DNA, čoho sa využíva napríklad pri polymerázovej reťazovej reakcii. Dôležitým faktorom je ale tiež čas, teda záleží na akú dlhú dobu je potravinová (teda aj DNA) týmto vysokým teplotám vystavená. Bolo dokázané, že dlhodobší zohrev môže spôsobovať fragmentáciu DNA, pričom platí, že čím je doba zohrevu dlhšia, tým budú fragmenty menšie. [93] Miera fragmentácie sa tiež odvíja od konkrétneho rastlinného druhu. Degradácia molekúl DNA má významný dopad na ďalšiu analýzu, akou je napríklad PCR, ktorej citlivosť sa obvykle s mierou degradácie DNA znižuje. [91]

Podobný účinok má aj zmena pH, avšak funguje na inom mechanizme. Príliš kyslé pH spôsobuje depurináciu DNA, ktorá je v dôsledku toho štiepená na menšie fragmenty. Naproti tomu v slabozásaditom prostredí (pH 8,5 – 9,5) dochádza len k rozvoľneniu dvojzávitnice DNA, pričom jednovláknová DNA je stále vhodným templátom pre PCR. [94]

Vplyvom technologického spracovania taktiež dochádza k významným zmenám v zložení danej potravinovej. Okrem rôznych druhov aditív, či iných látok, ktoré sa do potravín zámerne pridávajú, tiež dochádza k chemickým premenám látok v potravinovej prítomných. Zmeny v chemickom zložení majú nezanedbateľný vplyv na fyzikálne a chemické vlastnosti potravinovej, čo môže mať dopad aj na kvalitu DNA. [81]

3 CIEĽ PRÁCE:

Cieľom diplomovej práce bolo testovať mikrometódu izolácie DNA z vybraných potravín rastlinného pôvodu (čerstvé paradajky a tepelne upravené paradajkové výrobky) pomocou troch rôznych typov magnetických nosičov a porovnať rozdiely v kvalite izolovanej DNA. Sledovanými parametrami kvality izolovanej DNA bola jej čistota (sledovaná spektrofotometricky) a amplifikovateľnosť, ktorá bola stanovená pomocou metód PCR s dvomi sadami primerov.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Materiál

4.1.1 Použitý rastlinný materiál

- Čerstvý rastlinný materiál: rajčiak jedlý (*Solanum lycopersicum*) [zelené listy, zrelé červené plody a nezrelé plody]



Obrázok 5: Čerstvý rastlinný materiál použitý pre analýzu – rajčiak jedlý (zľava zelené listy, nezrelé plody a zrelé červené plody).

- Paradajkový pretlak: OTMA Tomato purée [Zloženie: paradajky, soľ, regulátor kyslosti: kyselina citrónová] z obchodnej siete
- Kečup: OTMA jemný [Zloženie: voda, zahustený paradajkový pretlak, cukor, ocot, zahusťovadlá: modifikované škroby, soľ, koreniaca prísada (výťažky z korení)] z obchodnej siete
- Kečup domáci: babičkin recept [Zloženie (recept): paradajky (cca 60%), jablká, kávia, fenerónky, zeler, cvikla, cibuľ, soľ, klinčeky, čierne korenie, nové korenie, bylinky, cukor, ocot, škorica, muškátový oriešok, zázvor, paprika sladká mletá]



Obrázok 6: Tepelne spracované paradajkové potravinárske výrobky použité pre analýzu.

- Zemiakové lupienky: Strážnické brambůrky (Petr Hobža) – Jemně solené [Zloženie: zemiaky (62 %); repkový olej (36 %); jedlá soľ (2 %)]



Obrázok 7: Zemiakové lupienky použité pre analýzu.

- *Brassica oleracea* (kapusta obyčajná) – DNA izolovaná a purifikovaná štandardnou CTAB metódou na Biofyzikálnom ústave Akadémie vied Českej republiky. Táto DNA bola poskytnutá od RNDr. A. Kovaříka, CSc. a bola používaná ako pozitívna kontrola.

4.1.2 Magnetické nosiče

Pre izoláciu rastlnej DNA z vyššie uvedených rastlinných potravinárskych produktov boli použité tri typy magnetických častíc o koncentrácii 2 mg/ml:

- P(HEMA-*co*-GMA) – poly(2-hydroxyetylmetakrylát-co-glycidylmetakrylát)
 Funkcionalizácia: -COOH (0,76 mM/g); priemer: 2,3 μm
 Obsah Fe: 10,02 % PDI: 1,81
- HPS B-M-NH₂ – poly(styrén-co-divinylbenzén) – hypersieťované mikročastice
 Funkcionalizácia: -NH₂; priemer: 3,6 μm
- MPG – magnetické porézne sklo
 Funkcionalizácia: -OH; priemer: 5 nm

Častice P(HEMA-*co*-GMA) a HPS B-M-NH₂ boli pripravené na Ústave makromolekulárnej chémie AV ČR, Praha a dodané Ing. D. Horákom CSc. Častice MPG boli získané z komerčných zdrojov.

4.1.3 Chemikálie

- Acetát sodný (CH₃COONa) (Lachema, Brno, ČR)
- Agaróza pre elektroforézu (SERVA, Heidelberg, SRN)
- Cetyl triethylamonium bromid (CTAB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Destilovaná (sterilná) voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- DNA štandard molekulových hmotností, 100 bp (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- Etanol (Lachema, Brno, ČR)
- Etídiumbromid (EtBr) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Etyléndiaminotetraoctová kyselina (EDTA) (SERVA, Heidelberg, SRN)

- GoldviewTM farbivo (SBS Genetech, Co., Ltd, Peking, ČLR)
- Hydroxid sodný (NaOH) (Lachema, Brno, ČR)
- Chlorid sodný (NaCl) (Lachema, Brno, ČR)
- Izopropanol (PENTA, Praha, ČR)
- Kyselina boritá (H₃BO₃) (PENTA, Praha, ČR)
- Kyselina chlór vodíková (PENTA, Praha, ČR)
- Nanášací pufo 10x Blue Load (Top-Bio, Vestec, ČR)
- Nanášací pufo 6x Yellow Load (Top-Bio, Vestec, ČR)
- Polyetylén glykol 6000 (PEG 6000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Tris-hydroxymetyl-aminometán (Tris-báza) (Amresco, Solon, Ohio, USA)
- Tris-hydroxymetyl-aminometán hydrochlorid (Tris-HCl) (Amresco, Solon, Ohio, USA)
- β-merkaptóetanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

4.1.4 Roztoky pre izoláciu a purifikáciu DNA

- *Lyzační pufo CTAB*
Návažok 1 g cetyl triethylamonium bromidu bol rozpustený v 10 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 8,0), 16 ml 5 M NaCl, 2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 42 ml destilovanej vody.
- *1 M Tris-HCl, pH 8,0*
Návažok 121,1 g Tris-bázy bol rozpustený v 800 ml destilovanej vody. pH roztoku bolo upravené na hodnotu 8,0, pomocou koncentrovanej kyseliny chlór vodíkovej. Roztok bol doplnený destilovanou vodou na 1 l a následne sterilizovaný 20 min. pri 121 °C.
0,5 M roztok sme dosiahli riedením sterilnou destilovanou vodou v pomere 1:1
- *0,5 M EDTA (kyselina etyléndiamintetraoctová), pH 8,0*
Návažok 186,1 g EDTA bol rozpustený v 800 ml destilovanej vody, pričom bol zahrievaný na 65 °C. pH roztoku bolo upravené na hodnotu 8,0 prídavkom hydroxidu sodného za stáleho miešania. Roztok bol doplnený destilovanou vodou do 1 l a následne sterilizovaný 20 min. pri 121 °C.
- *TE (Tris-EDTA) pufo*
1 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0) sa zmiešalo s 0,2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a doplnilo sterilnou destilovanou vodou do objemu 100 ml.
- *3 M acetát sodný*
Návažok 264 g bezvodého acetátu sodného bol rozpustený v 400 ml destilovanej vody.
- *5 M NaCl (chlorid sodný)*
Návažok 87,66 g NaCl bola rozpustený v 300 ml destilovanej vody a následne sterilizovaný 20 min. pri 121 °C.

- *70 % etanol*
Bol pripravený riedením zásobného roztoku etanolu (96 %) o objeme 70 ml, ku ktorému bolo pridaných 26 ml destilovanej vody.
- *40 % PEG (polyetylénglykol) 6000*
Návažok 40 g PEG 6000 bol rozpustený v 60 ml destilovanej vody. Objem bol doplnený do 100 ml destilovanou vodou a sterilizovaný 20 min. pri 121 °C.

4.1.5 Roztoky pre agarózovú gélovú elektroforézu

- *TBE (Tris-borát-EDTA) pufoer (5x koncentrovaný)*
Návažok 54 g Tris-bázy a 27,5 g kyseliny boritej bolo rozpustených v 600 ml destilovanej vody. Následne bolo pridaných 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a doplnené destilovanou vodou na objem 1 l. Pre potreby elektroforézy bol používaný 0,5x koncentrovaný TBE pufoer, ktorý sme získali riedením 10x. 100 ml 5x koncentrovaného TBE pufru bolo doplnených do 1 litru destilovanou vodou.
- *Agarózový gél*
Agarózový gél (1,2 %): 1,2 g agarózy bolo za zvýšenej teploty až na bod varu (v mikrovlnnej trúbe) rozpustených v 100 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru
Agarózový gél (1,5 %): 1,5 g agarózy bolo za zvýšenej teploty až na bod varu (v mikrovlnnej trúbe) rozpustených v 100 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru
- *EtBr (etidium bromid) 0,5 µg.ml⁻¹*
100 µl zásobného roztoku etidium bromidu za zriedilo v 500 ml destilovanej vody.

4.1.6 Komponenty pre PCR

- PCR voda
- 10x kompletný reakčný pufoer
- Primery pre amplifikáciu 700 bp: F 18 S (10 pmol/µl), R 5,8 S (10 pmol/µl)
- Primery pre amplifikáciu 220 bp: F 26 S (10 pmol/µl), R 26 S (10 pmol/µl)
- Zmes dNTP (10 M)
- Taq DNA polymeráza (5 U/µl)
- Taq DNA polymeráza 1.1 (1 U/µl)
- PCR enhancer E101: 0,1 M TMA oxalát v PCR vode (Top-Bio, Vestec, ČR)

4.1.7 Pomôcky

- Bežné laboratórne pomôcky (laboratórne sklo, plastové špičky, Eppendorfove skúmavky, kopisty, ...)
- Chladiace a mraziace zariadenie
- Digitálny fotoaparát Panasonic Lumix DMC-LZ6
- Digitálny mobilný fotoaparát Samsung Galaxy SII

- Kovový blok (platňa)
- Laboratórne váhy OHAUS CS 200 (Ohaus Corporation, Parsippany-Troy Hills, New Jersey, USA)
- Magnetický separátor DynaMag™-2 Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Mikropipety Discovery Comfort (HTL, Varšava, Poľsko)
- Mikrovlnná rúra PROLine SM 117
- Odstredivka MiniSpin Plus (Eppendorf, Hamburg, SRN)
- Odstredivka Spectrafuge™ Mini (Labnet, Edison, New Jersey, USA)
- PCR cyklátor DNA Engine™ Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, California, USA)
- Termostat Mini Incubator I5110A-230V (Labnet, Edison, New Jersey, USA)
- Transiluminátor TVR-312A Spectroline (Spectronics Corporation, Westbury, New York, USA)
- UV-VIS spektrofotometer NanoDrop 2000 Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Vákuový exsikátor
- Vodorovná plocha s vodováhou
- Zariadenie pre elektroforézu Owl™ EasyCast™ Horizontal System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Zdroj elektrického napätia pre elektroforézu ENDURO™ 300 V (Labnet, Edison, New Jersey, USA)

4.2 Metódy

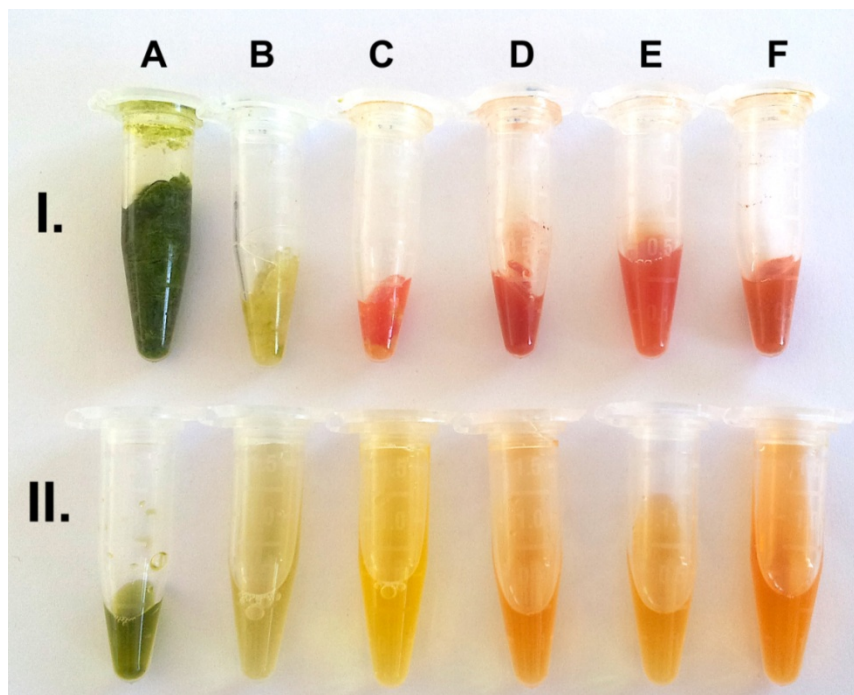
4.2.1 Príprava homogenátov buniek

Ako vzorky rastlinného materiálu pre prípravu homogenátov boli použité zemiakové lupienky (Strážnické brambúrky - jemne solené) a paradajkový pretlak (Otma tomato purée). Neskôr boli tiež použité paradajkové listy, zelené aj zrelé plody paradajky, kečup (OTMA jemný) a domáci kečup podľa babičkinho receptu.

Na uvedených vzorkách sme testovali rôzne varianty postupov pre prípravu homogenátu:

Približne 0,7 g vzorky (vážené na predvážkach) sme preniesli do 1,5 ml Eppendorfovej skúmavky a pridali sme 500 µl lyzačného činidla s CTAB a 1 µl merkaptoetanolu.

Zmes sme mechanicky homogenizovali kopistom za zníženej teploty vo vychladených kovových platniach (v mrazničke). Takto upravené vzorky sme inkubovali v termostate pri teplote 60 °C po dobu 30 minút. Po ukončení inkubácie sme zmes odstredili v odstredivke pri 14500 ot./10 minút. Supernatant sme odpipetovali do čistých Eppendorfových skúmaviek pre ďalší postup izolácie DNA magnetickými časticami (Obrázok 8).



Obrázok 8: Príprava homogenátu v lyzačnom roztoku s CTAB z analyzovaných vzoriek. I. rada: zbytkový sediment po centrifugácii, II. rada: supernatant (homogenát). V jednotlivých vzorkách A) paradajkový list; B) zelený plod paradajky; C) zrelý plod paradajky; D) paradajkový pretlak OTMA; E) kečup OTMA; F) domáci kečup; je viditeľné znečistenie rastlinnými farbivami, prirodzene sa vyskytujúcimi v rastlinnom materiáli.

4.2.2 Izolácia DNA na magnetických nosičoch

Pre izoláciu DNA z homogenátu buniek boli použité magnetické častice P(HEMA-co-GMA) s priemerom 2,3 μm , hypersieťované častice HPS B-M-NH₂ a častice MPG (magnetické porézne sklo), všetky o koncentracii 2 mg/ml. Separačná zmes bola pripravená do čistých Eppendorfových skúmaviek z dôvodu testovania efektivity izolácie viacerými rôznymi spôsobmi. Zloženie jednotlivých separačných zmesí je uvedené v Tabuľke 1.

Tabuľka 1: Zloženie separačnej zmesi pre izoláciu rastlinnej DNA z homogenátu vzorky s použitím 8% a 16% polyetylénglykolu.

Zložka separačnej zmesi	Objem [μl]	
	8% PEG 6000	16% PEG 6000
NaCl (5 M)	400	400
Homogenát vzorky	300	100
PEG 6000 (40 %)	200	400
Magnetické častice (2 mg/ml)	100	100

Takto pripravenú zmes sme poriadne premiešali a inkubovali pri laboratórnej teplote 15 minút. Skúmavky so zmesou boli následne umiestnené do magnetického separátoru. Po 5 minútach sme v prítomnosti magnetického pásu opatrne odpipetovali roztok zo skúmaviek tak, aby sme do pipety nenabrali magnetické častice, ktoré zostali na stene skúmavky.

Skúmavky sme vybrali zo separátoru a častice sme premyli pridaním 500 μl 70 %-ného etanolu a umiestnením skúmaviek späť do magnetického separátoru na 2 min. Po uplynutí tohto času sme etanol znovu opatrne odpipetovali a postup premytia etanolom sme zopakovali ešte raz, ale s prídavkom 100 μl etanolu. Po odpipetovaní všetkého etanolu sme skúmavky nechali dosušiť. DNA viazanú na magnetických časticách sme eluovali do 100 μl TE pufru 1 hodinu pri laboratórnej teplote, prípadne ešte v chladničke do druhého dňa. Pomocou magnetického separátoru boli zo zmesi odseparované magnetické častice (po dobu 2 minút) a eluát sme preniesli do čistej Eppendorfovej skúmavky.

4.2.3 Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty izolovanej DNA

Čistotu a koncentráciu takto izolovanej DNA sme overili na prístroji NanoDrop 2000. Pred samotným stanovením sme vyčistili meraciu časť prístroja, vzorky sme poriadne premiešali a ako slepý pokus sme použili samotný TE pufo. Absorbancia, a následne ďalšie parametre, boli stanovené spektrofotometricky v rozmedzí vlnových dĺžok 230-320 nm.

4.2.4 Overenie kvality izolovanej DNA amplifikáciou pomocou PCR

Jednotlivé vzorky izolovanej DNA a ich riedenia boli amplifikované polymerázovou reťazovou reakciou. Zložky zmesi pre PCR boli namiešané podľa Tabuľky 2, 3, a 4, v závislosti od veľkosti produktu amplifikácie a použitej DNA polymerázy. Ako pozitívna kontrola bola používaná rastlinná DNA izolovaná z *Brassica oleracea* (kapusta obyčajná) o koncentrácii 10 ng/ μl .

Tabuľka 2: Zloženie zmesi pre PCR s Taq DNA polymerázou (5 U/ μl) a s primermi špecifickými pre rastlinnú DNA pre amplifikáciu úseku o veľkosti 700 bp.

	Zložka zmesi pre PCR	Objem [μl]
1	Voda pre PCR	17,1
2	10x kompletný reakčný pufo	2,5
3	Primer F 18 S (10 pmol/ μl)	1,0
4	Primer R 5,8 S (10 pmol/ μl)	1,0
5	Zmes dNTP (10 mM)	1,0
6	Taq DNA polymeráza (5 U/ μl)	0,4
7	DNA matrica	2,0
	Spolu	25,0

Od 12.10.2016 boli používané nové komponenty na PCR, teda aj nové zloženie zmesi pre PCR, a to predovšetkým kvôli zmene Taq DNA polymerázy (5 U/ μl) na Taq DNA polymerázu 1.1. Nové zloženie zmesí pre PCR so špecifickými primermi pre rastlinnú DNA uvádzajú Tabuľky 4 (pre 700 bp amplikón) a 5 (220 bp amplikón).

Tabuľka 3: Zloženie zmesi pre PCR s Taq DNA polymerázou 1.1 a s primermi špecifickými pre rastlinnú DNA pre amplifikáciu úseku o veľkosti 700 bp.

	Zložka zmesi pre PCR	Objem [μ l]
1	Voda pre PCR	16,5
2	10x kompletný reakčný pufor	2,5
3	Primer F 18 S (10 pmol/ μ l)	1,0
4	Primer R 5,8 S (10 pmol/ μ l)	1,0
5	Zmes dNTP (10 mM)	1,0
6	Taq DNA polymeráza 1.1 (1 U/ μ l)	1,0
7	DNA matrica	2,0
	Spolu	25,0

Tabuľka 4: Zloženie zmesi pre PCR s Taq DNA polymerázou 1.1 a s primermi špecifickými pre rastlinnú DNA pre amplifikáciu úseku o veľkosti 220 bp.

	Zložka zmesi pre PCR	Objem [μ l]
1	Voda pre PCR	15,5
2	10x kompletný reakčný pufor	2,5
3	Primer F 26 S (10 pmol/ μ l)	1,0
4	Primer R 26 S (10 pmol/ μ l)	1,0
5	Zmes dNTP (10 mM)	1,0
6	Taq DNA polymeráza 1.1 (1 U/ μ l)	2,0
7	DNA matrica	2,0
	Spolu	25,0

Pripravené zmesi pre PCR sme dobre premiešali a umiestnili do cyklátoru, kde PCR prebiehala v 35 cykloch a v troch fázach:

1. Denaturácia (95 °C / 40'')
2. Hybridizácia primerov (57 °C / 40'')
3. Elongácia – syntéza DNA (72 °C / 80'')

Pred prvým cyklom sme predĺžili fázu denaturácie o 300'' (5') pri 95 °C a na záver, po ukončení 35. cyklu sme predĺžili syntézu pri 72 °C o 600'' (10'). Následne boli vzorky ochladené a udržiavané pri teplote 10 °C, v prípade potreby zmrazené a uchované pri teplote približne -20 °C pre ďalšiu analýzu.

4.2.5 Detekcia špecifických produktov PCR agarózovou gélovou elektroforézou

Produkty PCR sme detegovali pomocou elektroforézy na 1,2 %-nom agarózovom géli (pre špecifické PCR produkty o veľkosti 700 bp), prípadne na 1,5 %-nom géli (pre produkty veľké 220 bp). V 100 ml 0,5 %-ného TBE pufri sme zahrievaním (až na bod varu) rozpustili 1,2 g agarózy (v prípade 1,5 %-ného gélu bol návažok agarózy 1,5 g) a po miernom ochladení sme pridali 0,5 μ l farbiva Goldview. Gél sme naliali do pripravenej vaničky s hrebeňom a nechali stuhnúť vo vodorovnej polohe. Množstvo pripraveného gélu záviselo od veľkosti vaničky, pre

väčšie vaničky bolo potrebných 100 ml gélu, pre menšie 70 ml, prípadne 50 ml, čomu sa prispôobil aj návažok agarózy.

Po stuhnutí sme odstránili hrebienok a na gél sme do jednotlivých jamôk nanášali vzorky, ktoré boli predtým zmiešané s 5 µl nanášacieho puftru (v pomere 5:1), pozitívnu a negatívnu kontrolu, pripravené rovnakým spôsobom a štandard molekulových hmotností (5 µl), ktorý už bol s nanášacím pufrom vopred zmiešaný. Objem nanášaných vzoriek závisel od veľkosti komôrok v géli, pričom sme sa snažili naniesť čo najväčšie množstvo tak, aby sa obsah komôrok neprelial. Do menších komôrok (pri väčších géloch s mnohými komôrkami) bolo nanášaných 18 µl, kým do väčších sa zmestilo celých 30 µl. Samotná elektroforéza prebiehala pod napätím 80 V po dobu 2-2,5 hod, v závislosti od veľkosti a hustoty gélu. Po prebehnutí elektroforézy bol gél dofarbený v roztoku etídium bromidu (0,5 µg/ml) a vyhodnotený pod UV svetlom.

4.2.6 Zrážanie DNA

4.2.6.1 Zakoncentrovanie pomocou etanolu

Pre prezrážanie boli spojené po 4 paralelné izoláty z každej zo vzoriek (paradajkový pretlak OTMA, kečup OTMA a domáci kečup). Z každého z takto spojených izolátov bolo odpipetované čo najväčšie množstvo (rovnaké pre všetky vzorky – 300 µl) do čistých Eppendorfových skúmaviek. K izolátu sme pridali 15 µl octanu sodného (v pomere 1:20) a následne po 800 µl vychladeného 96 % etanolu. Zmes sme schladili v mrazničke pri -20 °C po dobu 15 minút a po vychladení sme DNA odstredili pri 14500 ot./15 min. Supernatant sme odliali, sediment nechali odkvapkať od prebytočnej kvapaliny a následne dosušili v exsikátore (približne 10 minút). Sediment sme rozpustili v 30 µl TE puftru, čím by sme mali dosiahnuť 10-násobné zakoncentrovanie izolovanej DNA. Výsledky sme overili meraním koncentrácie DNA. Táto DNA bola tiež použitá do PCR so špecifickými primermi pre amplifikáciu úseku o veľkosti 700 bp.

4.2.6.2 Zakoncentrovanie pomocou izopropanolu

Pomocou izopropanolu sme overovali zakoncentrovanie a následne amplifikovateľnosť DNA izolovanej metódou podľa postupu 3.4. K 150 µl vzorky izolovanej DNA sme pridali 0,6 objemu izopropanolu a zmes sme nechali inkubovať 5 minút v mrazenom kovovom bloku. Po ukončení inkubácie sme odstredili pri 14500 ot./4 minúty a supernatant sme odstránili. Sediment bol premytý 500 µl 96 % etanolu a opäť odstredený za rovnakých podmienok. Premytie sme zopakovali ešte raz, výsledný sediment sme dosušili v exsikátore od prebytočného izopropanolu a eluovali v 50 µl TE puftru. Týmto postupom by malo dôjsť k trojnásobnému zakoncentrovaniu izolovanej DNA. Následne sme overili výsledky zmeraním koncentrácie a PCR so špecifickými primermi pre amplifikáciu úseku o veľkosti 700 bp.

4.3 Výsledky

4.3.1 Testovanie rôznych postupov pre prípravu homogenátu z paradajkových výrobkov

Z dôvodu snahy o zjednodušenie a zrýchlenie mikrometódy pre izoláciu DNA z paradajkových výrobkov (paradajkový pretlak OTMA, domáci kečup a kečup OTMA) sme skúmali rôzne varianty prípravy homogenátu pre následnú izoláciu DNA časticami P(HEMA-co-GMA).

- Časť vzoriek z potravín bola homogenizovaná vo vode. Približne 0,7 g vzorky (vážené na predvážkach) bolo prenesených do 1,5 ml Eppendorfovej skúmavky a rozsuspendovaných v 150 μ l sterilnej destilovanej vody. Na vzorkách riedených z homogenátu vo vode boli testované rôzne koncentrácie PEG 6000 (8 a 16 %) použité pre izoláciu DNA magnetickými nosičmi. Presné zloženie separačných zmesí uvádza Tabuľka 1.
- Druhá časť potravinových vzoriek bola spracovaná štandardným postupom s prídavkom lyzačného činidla s CTAB, popísaným podrobne v bode 4.2.1. Pre túto metódu bola použitá separačná zmes s koncentráciou PEG 6000 16%.

Pre jednotlivé postupy sme vo vzorkách homogenátov paradajkového pretlaku OTMA, domáceho kečupu a kečupu OTMA sledovali zmeny v kvalite izolovanej DNA, konkrétne jej koncentráciu, čistotu a amplifikovateľnosť.

4.3.1.1 Čistota a koncentrácia izolovanej DNA

Výsledky stanovenia koncentrácie a čistoty izolovanej DNA uvádzajú Tabuľky 5, 6 a 7. Absorbčné krivky izolovanej DNA znázorňuje Obrázok 9 (pre izoláciu z homogenátu s vodou) a Obrázok 10 (pre izoláciu z homogenátu s použitím CTAB činidla). Obrázok 11 je porovnaním rozdielov absorbancií DNA izolovanej z homogenátu s pomocou činidla s CTAB a z homogenátu s vodou.

Tabuľka 5: Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a parametrov čistoty DNA izolovanej z paradajkového pretlaku OTMA z homogenátu s činidlom s CTAB s použitím 16% PEG 6000 a z homogenátu s vodou s použitím 8 a 16% PEG 6000 (izolácia 2.11.2016) a po prezrážaní izopropanolom (8.11.2016).

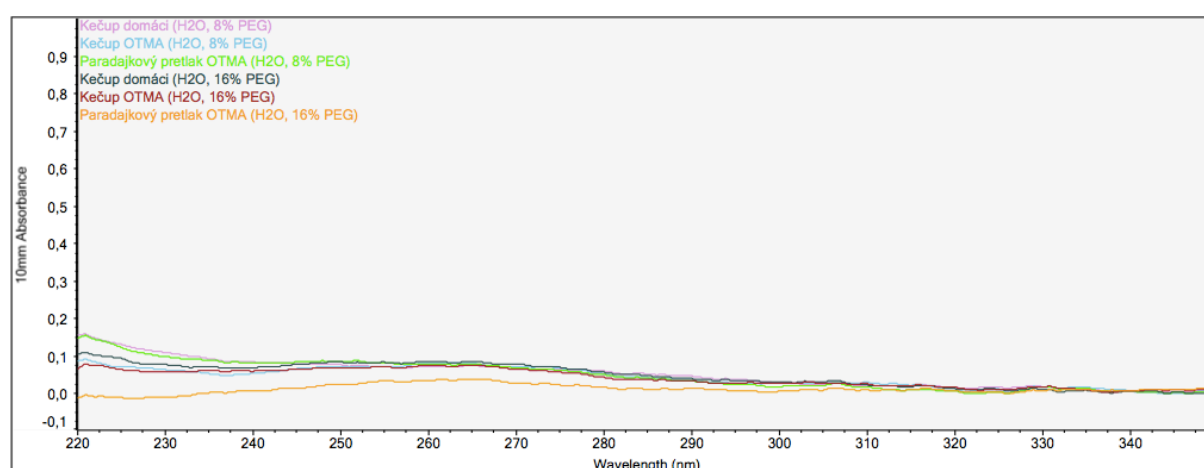
Paradajkový pretlak OTMA	CTAB 16 % PEG 6000	H ₂ O		H ₂ O - po prezrážaní	
		8 % PEG 6000	16 % PEG 6000	8 % PEG 6000	16 % PEG 6000
c DNA [ng/ μ l]	8,3	3,5	1,3	2,4	1,7
A _{260nm}	0,17	0,07	0,03	0,05	0,03
A _{280nm}	0,12	0,04	0,01	0,03	0,01
A _{260nm} /A _{280nm}	1,38	1,60	2,96	1,45	2,29
A _{260nm} /A _{230nm}	1,77	0,76	1,51	1,56	6,04

Tabuľka 6: Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a parametrov čistoty DNA izolovanej z kečupu OTMA z homogenátu s činidlom s CTAB s použitím 16% PEG 6000 a z homogenátu s vodou s použitím 8 a 16% PEG 6000 (izolácia 2.11.2016) a po prezrážaní izopropanolom (8.11.2016).

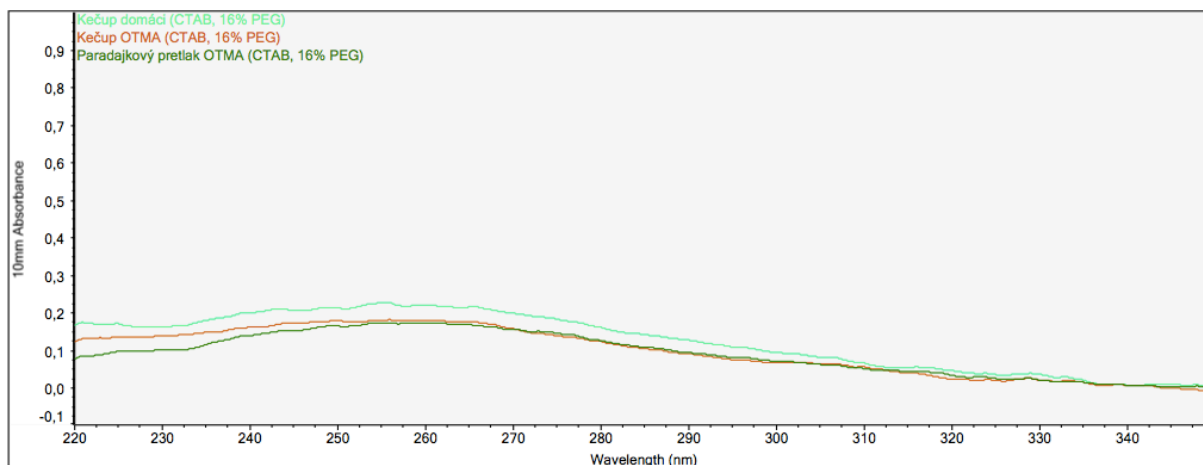
Kečup OTMA	CTAB 16 % PEG 6000	H ₂ O		H ₂ O - po prezrážaní	
		8 % PEG 6000	16 % PEG 6000	16 % PEG 6000	8 % PEG 6000
c DNA [ng/μl]	8,6	3,6	3,3	1,9	2,5
A _{260nm}	0,17	0,07	0,07	0,04	0,05
A _{280nm}	0,12	0,05	0,04	0,01	0,03
A _{260nm} /A _{280nm}	1,48	1,63	1,84	3,06	1,72
A _{260nm} /A _{230nm}	1,32	1,31	1,35	6,11	1,67

Tabuľka 7: Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a parametrov čistoty DNA izolovanej z domáceho kečupu z homogenátu s činidlom s CTAB s použitím 16% PEG 6000 a z homogenátu s vodou s použitím 8 a 16% PEG 6000 (izolácia 2.11.2016) a po prezrážaní izopropanolom (8.11.2016).

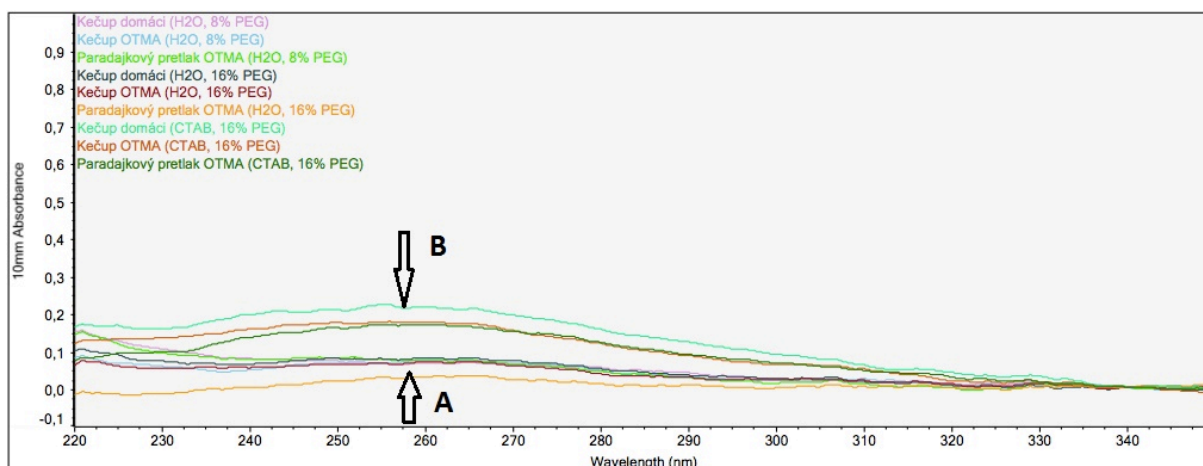
Kečup domáci	CTAB 16 % PEG 6000	H ₂ O		H ₂ O - po prezrážaní	
		8 % PEG 6000	16 % PEG 6000	16 % PEG 6000	8 % PEG 6000
c DNA [ng/μl]	10,7	3,2	4,7	2,0	3,5
A _{260nm}	0,21	0,06	0,10	0,04	0,07
A _{280nm}	0,15	0,05	0,07	0,02	0,05
A _{260nm} /A _{280nm}	1,38	1,28	1,39	1,66	1,55
A _{260nm} /A _{230nm}	1,36	0,53	1,53	7,71	1,46



Obrázok 9: Graf závislosti absorbancie od vlnovej dĺžky žiarenia v DNA z paradajkového pretlaku OTMA, kečupu OTMA a domáceho kečupu z homogenátu vzorky s vodou v 8 a 16% PEG 6000 (izolované 2.11.2016).



Obrázok 10: Graf závislosti absorpcie od vlnovej dĺžky žiarenia v DNA z paradajkového pretlaku OTMA, kečupu OTMA a domáceho kečupu z homogenátu pripraveného s použitím lyzačného činidla s CTAB (izolované 2.11.2016).

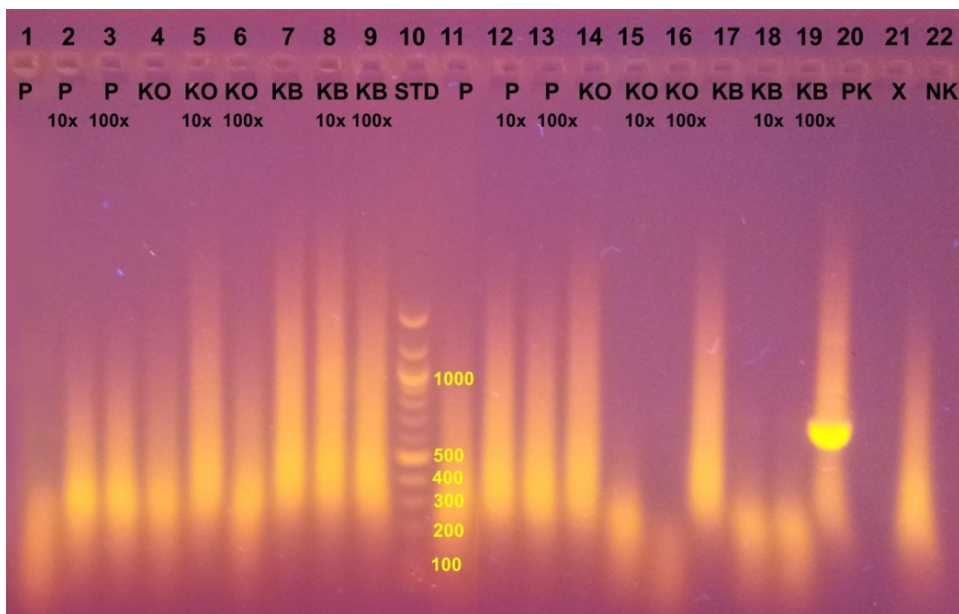


Obrázok 11: Graf závislosti absorpcie od vlnovej dĺžky žiarenia v DNA z paradajkového pretlaku OTMA, kečupu OTMA a domáceho kečupu. A: DNA izolovaná z homogenátu s vodou v 8 a 16% PEG 6000; B: DNA izolovaná z homogenátu, pripraveného s použitím lyzačného činidla s CTAB (2.11.2016).

DNA izolovaná z homogenátov s vodou bola v nízkych koncentráciách (väčšinou medzi 3-4 ng/μl), vo vyšších koncentráciách bola DNA izolovaná z homogenátov v CTAB (8 – 11 ng/μl). Izolovaná DNA bola znečistená.

4.3.1.2 Amplifikovateľnosť izolovanej DNA

Z DNA izolovanej z homogenátu s vodou v prostredí 8 a 16% PEG 6000 boli pripravené zmesi pre PCR podľa postupu uvedeného v bode 4.2.4, Tabuľka 3, s použitím primerov pre amplifikáciu úseku o veľkosti 700 bp. Výsledky tejto amplifikácie zobrazuje agarózový gél na Obrázku 12. Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy špecifických produktov PCR DNA izolovanej z rovnakých vzoriek z homogenátu s použitím CTAB sú uvedené na Obrázku 14.



Beh	Značka	DNA	Použitý PEG	Detekcia produktu PCR	Množstvo DNA pre PCR [ng]
1	P	paradajkový pretlak OTMA neriedený	8%	-	7
2	P 10x	paradajkový pretlak OTMA - riedenie 10x	8%	-	
3	P 100x	paradajkový pretlak OTMA - riedenie 100x	8%	-	
4	KO	kečup OTMA- neriedený	8%	-	7,2
5	KO 10x	kečup OTMA- riedenie 10x	8%	-	
6	KO 100x	kečup OTMA- riedenie 100x	8%	-	
7	KB	kečup domáci - neriedený	8%	-	6,4
8	KB 10x	kečup domáci - riedenie 10x	8%	-	
9	KB 100x	kečup domáci- riedenie 100x	8%	-	
10	STD	štandard molekulových hmotností			
11	P	paradajkový pretlak OTMA neriedený	16%	-	2,6
12	P 10x	paradajkový pretlak OTMA - riedenie 10x	16%	-	
13	P 100x	paradajkový pretlak OTMA - riedenie 100x	16%	-	
14	KO	kečup OTMA- neriedený	16%	-	6,6
15	KO 10x	kečup OTMA- riedenie 10x	16%	-	
16	KO 100x	kečup OTMA- riedenie 100x	16%	-	
17	KB	kečup domáci - neriedený	16%	-	9,4
18	KB 10x	kečup domáci - riedenie 10x	16%	+/-	
19	KB 100x	kečup domáci- riedenie 100x	16%	+/-	
20	PK	pozitívna kontrola	-	+++	20
21	X				
22	NK	negatívna kontrola	-	-	

Obrázok 12: Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy špecifických produktov PCR o veľkosti 700 bp. (2.11.2016).

Po amplifikácii DNA izolovaných z homogenátu s vodou v prostredí 16% PEG 6000 (s výnimkou veľmi slabých produktov PCR z riedenej DNA z domáceho kečupu) neboli detegované produkty PCR. Takýto výsledok značí o prítomnosti inhibítorov PCR. Príprava homogenátu bez lyzačného činidla s CTAB sa ukázala ako neefektívna.

Po amplifikácii DNA izolovanej z homogenátu vo vode v prostredí 8% PEG 6000 neboli detegované žiadne viditeľné amplikóny.

4.3.2 Vplyv spracovania výrobku na kvalitu a množstvo izolovanej DNA

Podľa postupu 4.2.1 a 4.2.2 bola pomocou magnetických častíc P(HEMA-co-GMA) izolovaná DNA z čerstvých paradajok, konkrétne z listov, zrelých a nezrelých plodov a

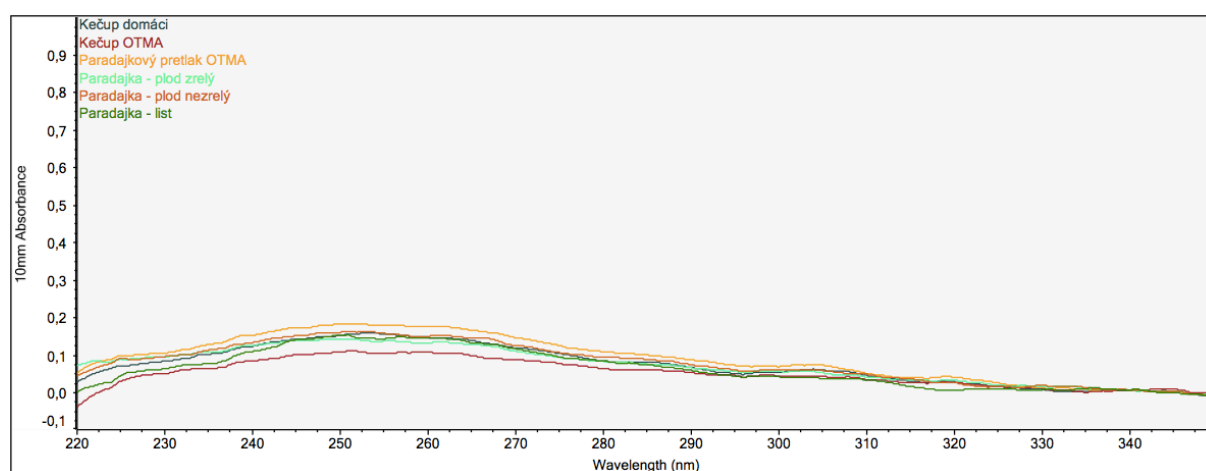
následne bola porovnaná jej amplifikovateľnosť, čistota a koncentrácia s izolátmi z tepelne upravených potravinárskych paradajkových výrobkov, ktoré boli reprezentované paradajkovým pretlakom OTMA, kečupom OTMA a domácim kečupom.

4.3.2.1 Vplyv spracovania výrobku na čistotu a množstvo izolovanej DNA

Namerané hodnoty koncentrácií DNA izolovaných z výrobkov udáva Tabuľka 8, absorbčné krivky pre jednotlivé vzorky izolovanej DNA na Obrázku 13 sú grafickým znázornením závislosti absorbancie na vlnovej dĺžke prechádzajúceho žiarenia.

Tabuľka 8: Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a parametrov čistoty DNA, izolovanej z homogenátov z pripravených výrobkov s použitím činidla s CTAB v prostredí 16 % PEG 6000 (izolované dňa 6.10.2016).

	Paradajkový list	Paradajka zelená	Paradajka zrelá	Paradajkový pretlak OTMA	Kečup OTMA	Kečup domáci
c DNA [ng/μl]	7,0	7,2	6,3	8,4	5,0	7,0
A_{260nm}	0,140	0,143	0,125	0,169	0,100	0,140
A_{280nm}	0,078	0,086	0,076	0,102	0,057	0,077
A_{260nm}/A_{280nm}	1,80	1,67	1,65	1,66	1,77	1,82
A_{260nm}/A_{230nm}	2,52	1,62	1,43	1,72	2,41	1,85

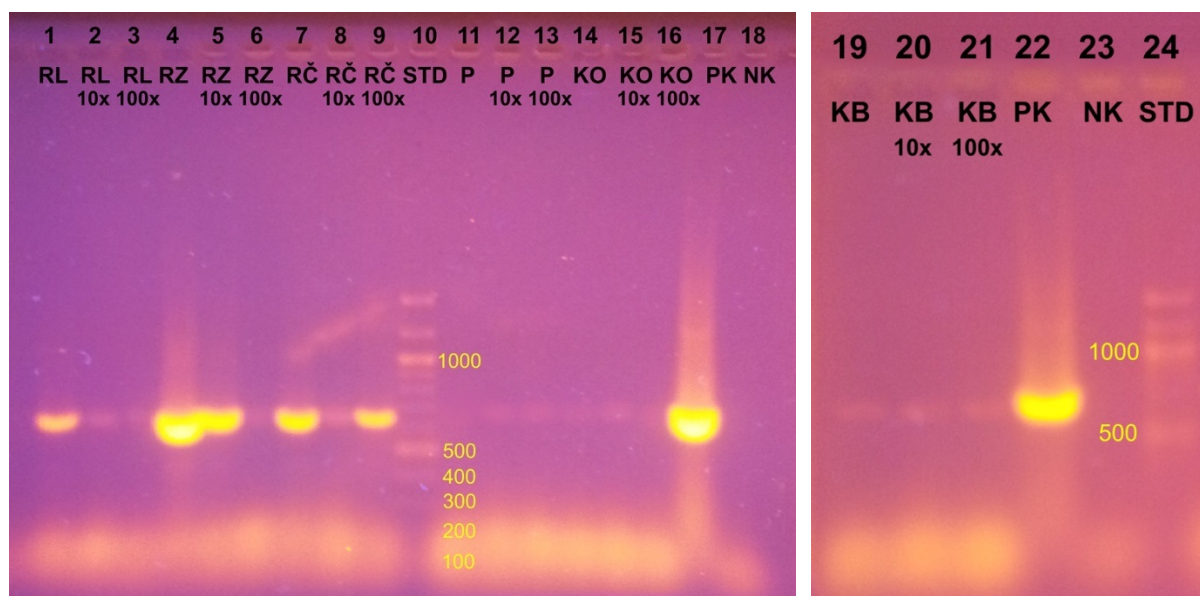


Obrázok 13: Graf závislosti absorbancie od vlnovej dĺžky žiarenia vo vzorkách izolovaných z čerstvých paradajkových listov, nezrelých a zrelých červených plodov, paradajkového pretlaku OTMA, kečupu OTMA a domáceho kečupu (izolované 6.10.2016).

DNA bola izolovaná v koncentrácií 5 – 8,4 ng/μl, hodnoty A_{260nm}/A_{280nm} sa pohybovali v rozmedzí 1,65 – 1,82. Medzi jednotlivými DNA sú viditeľné určité rozdiely v koncentrácií a v čistote vyizolovanej DNA. Z ohľadom na tieto parametre sa nepotvrdil vplyv potravinárskych procesov, akými sú napríklad tepelná úprava, či prídavok aditív na izoláciu DNA.

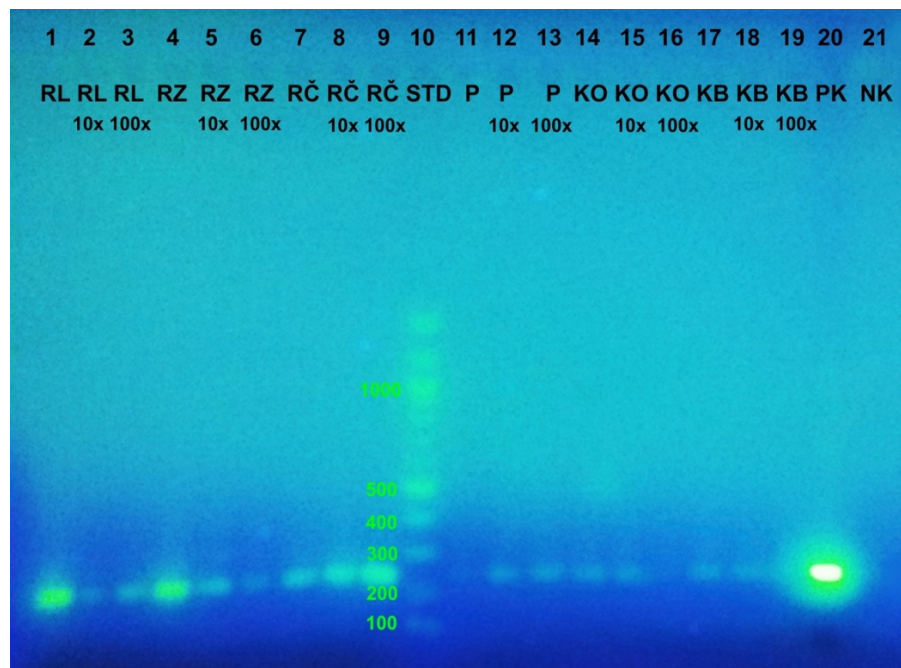
4.3.2.2 Vplyv spracovania na amplifikovateľnosť izolovanej DNA pomocou PCR

Pre sledovanie vplyvu potravinárskych procesov na amplifikovateľnosť izolovanej DNA bola podľa postupu 4.2.4 pripravená zmes pre PCR (do zmesi pre PCR boli pridávané 2 μ l DNA matrice), pričom boli použité 2 typy špecifických primerov, a to pre amplifikáciu úseku o veľkosti 700 bp (podľa Tabuľky 3) a 220 bp (podľa Tabuľky 4). Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy špecifických produktov PCR sú ukázané na Obrázkoch 14 (pre 700 bp) a 15 (pre 220 bp).



Beh	Značka	DNA	Detekcia produktu PCR	Množstvo DNA pre PCR [ng]
1	RL	paradajka - list - neriedená	++	14
2	RL 10x	paradajka - list - riedenie 10x	+	
3	RL 100x	paradajka - list - riedenie 100x	+	
4	RZ	paradajka - zelená - neriedená	+++	14,4
5	RZ 10x	paradajka - zelená - riedenie 10x	+++	
6	RZ 100x	paradajka - zelená - riedenie 100x	+	
7	RČ	paradajka - zrelá - neriedená	+++	12,6
8	RČ 10x	paradajka - zrelá - riedenie 10x	+	
9	RČ 100x	paradajka - zrelá - riedenie 100x	++	
10	STD	štandard molekulových hmotností		
11	P	paradajkový pretlak OTMA neriedený	+/-	16,8
12	P 10x	paradajkový pretlak OTMA - riedenie 10x	+	
13	P 100x	paradajkový pretlak OTMA - riedenie 100x	+	
14	KO	kečup OTMA- neriedený	+	10
15	KO 10x	kečup OTMA- riedenie 10x	+	
16	KO 100x	kečup OTMA- riedenie 100x	+	
17	PK	pozitívna kontrola	+++	20
18	NK	negatívna kontrola	-	
19	KB	kečup domáci - neriedený	+	14
20	KB 10x	kečup domáci - riedenie 10x	+	
21	KB 100x	kečup domáci- riedenie 100x	+	
22	PK	pozitívna kontrola	+++	20
23	NK	negatívna kontrola	-	
24	STD	štandard molekulových hmotností		

Obrázok 14: Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy špecifických produktov PCR rastlinnej DNA o veľkosti 700 bp (13.10.2016).



Beh	Značka	DNA	Detekcia produktu PCR	Množstvo DNA pre PCR [ng]
1	RL	paradajka - list - neriedená	+++	14
2	RL 10x	paradajka - list - riedenie 10x	+	
3	RL 100x	paradajka - list - riedenie 100x	+	
4	RZ	paradajka - zelená - neriedená	+++	14,4
5	RZ 10x	paradajka - zelená - riedenie 10x	+	
6	RZ 100x	paradajka - zelená - riedenie 100x	+	
7	RČ	paradajka - zrelá - neriedená	++	12,6
8	RČ 10x	paradajka - zrelá - riedenie 10x	++	
9	RČ 100x	paradajka - zrelá - riedenie 100x	++	
10	STD	štandard molekulových hmotností		
11	P	paradajkový pretlak OTMA neriedený	+/-	16,8
12	P 10x	paradajkový pretlak OTMA - riedenie 10x	+	
13	P 100x	paradajkový pretlak OTMA - riedenie 100x	+	
14	KO	kečup OTMA- neriedený	+	10
15	KO 10x	kečup OTMA- riedenie 10x	+	
16	KO 100x	kečup OTMA- riedenie 100x	-	
17	KB	kečup domáci - neriedený	+	14
18	KB 10x	kečup domáci - riedenie 10x	+	
19	KB 100x	kečup domáci- riedenie 100x	+	
20	PK	pozitívna kontrola	+++	20
21	NK	negatívna kontrola	-	

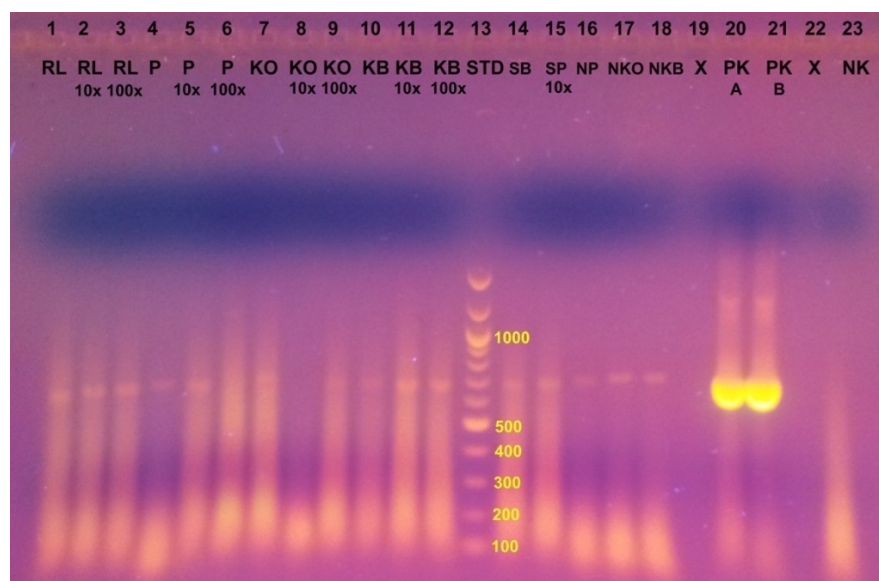
Obrázok 15: Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy špecifických produktov PCR rastlinnej DNA o veľkosti 220 bp (20.10.2016).

Izolovaná DNA sa amplifikovala v polymerázovej reťazovej reakcii. Boli detegované produkty PCR nízkej intenzity pre potravinársky spracované paradajkové výrobky, kým intenzita produktov PCR z DNA z čerstvých paradajok (z listu, či plodu) bola vyššia. Pre tepelne upravené výrobky boli produkty PCR vyššej intenzity detegované po amplifikácii s použitím primerov F 26 S a R 26 S pre produkt o veľkosti 220 bp, oproti primerom F 18 S a R 5,8 S pre produkt o veľkosti 700 bp.

4.3.3 Vplyv použitia PCR enhanceru na amplifikovateľnosť izolovanej DNA

Pri testovaní vplyvu PCR enhanceru na amplifikovateľnosť izolovanej DNA bol použitý rovnaký postup, ako v bode 4.2.4. PCR zmes bola namiešaná podľa Tabuľky 3 s použitím primerov F 18 S a R 5,8 S pre amplifikáciu úseku o veľkosti 700 bp, pričom 0,5 µl vody bolo nahradené prídavkom enhanceru.

Pre stanovenie boli použité izoláty DNA pripravené z homogenátov s činidlom s CTAB z paradajkového pretlaku OTMA, kečupu OTMA a domáceho kečupu z dvoch rôznych izolácií, konkrétne 6.10.2016 a 18.10.2016. Do PCR boli použité 2 µl DNA matrice. Výsledky PCR overené agarózovou gélovou elektroforézou sú zobrazené na Obrázku 16.



Beh	Značka	DNA	Detekcia produktu PCR	Množstvo DNA pre PCR [ng]
1	RL	paradajka - list - neriedená	++	14
2	RL 10x	paradajka - list - riedenie 10x	++	
3	RL 100x	paradajka - list - riedenie 100x	++	
4	P	paradajkový pretlak OTMA neriedený	+	16,8
5	P 10x	paradajkový pretlak OTMA - riedenie 10x	++	
6	P 100x	paradajkový pretlak OTMA - riedenie 100x	+/-	
7	KO	kečup OTMA- neriedený	+	10
8	KO 10x	kečup OTMA- riedenie 10x	-	
9	KO 100x	kečup OTMA- riedenie 100x	+	
10	KB	kečup domáci - neriedený	+	14
11	KB 10x	kečup domáci - riedenie 10x	++	
12	KB 100x	kečup domáci- riedenie 100x	++	
13	STD	štandard molekulových hmotností		
14	SB	zemiakové lupienky neriedené	+	32
15	SP 10x	paradajkový pretlak OTMA - riedenie 10x	++	2,42
16	NP	paradajkový pretlak OTMA neriedený	+	8,4
17	NKO	kečup OTMA- neriedený	++	13,6
18	NKB	kečup domáci - neriedený	++	8,8
19	X			
20	PK A	pozitívna kontrola - koncentrácia	+++	20
21	PK B	pozitívna kontrola - koncentrácia	+++	2
22	X			
23	NK	negatívna kontrola	-	

Obrázok 16: Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy špecifických produktov PCR rastlinnej DNA o veľkosti 700 bp (izolácie zo 6. 10.2016 a 18.10.2016) s použitím enhanceru. (Behy č. 14 a 15 sú vyhodnotené v kapitole 4.5.2)

Prídavkom enhanceru došlo k zvýšeniu intenzity amplikónov detegovaných na agarózovom géli. Produkt PCR bol na agarózovom géli detegovaný aj po amplifikácii neriedenej DNA izolovanej z paradajkového pretlaku OTMA, či 100x riedenej DNA z kečupu OTMA, ktoré bez prídavku enhanceru nebolo možné detegovať.

4.3.4 Vplyv prezrážania vyizolovanej DNA na jej kvalitu

S cieľom zvýšiť množstvo izolovanej DNA sme sa pokúsili DNA zakoncentrovať prezrážaním. Ako zdroj rastlinnej DNA boli použité DNA izolované z homogenátov s lyzačným činidlom s CTAB z paradajkového pretlaku OTMA, kečupu OTMA a domáceho kečupu. Testované boli dva rôzne postupy zakoncentrovania, uvedené v kapitole 4.2.6.

4.3.4.1 Zakoncentrovanie pomocou etanolu

DNA pre stanovenie bola izolovaná paralelne štyrikrát z každého z testovaných výrobkov (paradajkový pretlak OTMA, kečup OTMA a domáci kečup), pomocou postupu 4.2.2. s použitím homogenátov s lyzačným činidlom s CTAB a 16 % PEG 6000 časticami P(HEMA-co-GMA). Paralelné izolácie boli spojené a následne prezrážané podľa postupu 4.2.6.1. Tabuľky 9, 10 a 11 zobrazujú koncentrácie pre paralelné merania jednotlivých izolátov DNA (1 – 4) pred prezrážaním a po prezrážaní pomocou etanolu.

Obrázky 17 a 18 sú absorpčnými krivkami, teda závislosťou absorbancie jednotlivých DNA na vlnovej dĺžke, pričom poukazujú na zmeny v koncentrácii a čistote izolovanej DNA po prezrážaní etanolom. Obrázok 19 je absorpčnou krivkou DNA z *B. oleracea* (10 ng/μl), ktorá bola použitá ako pozitívna kontrola.

Tabuľka 9: Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie DNA (izolovanej 18.10.2016) a parametrov jej čistoty v 4 paralelných izolátoch z paradajkového pretlaku OTMA a ich koncentráty.

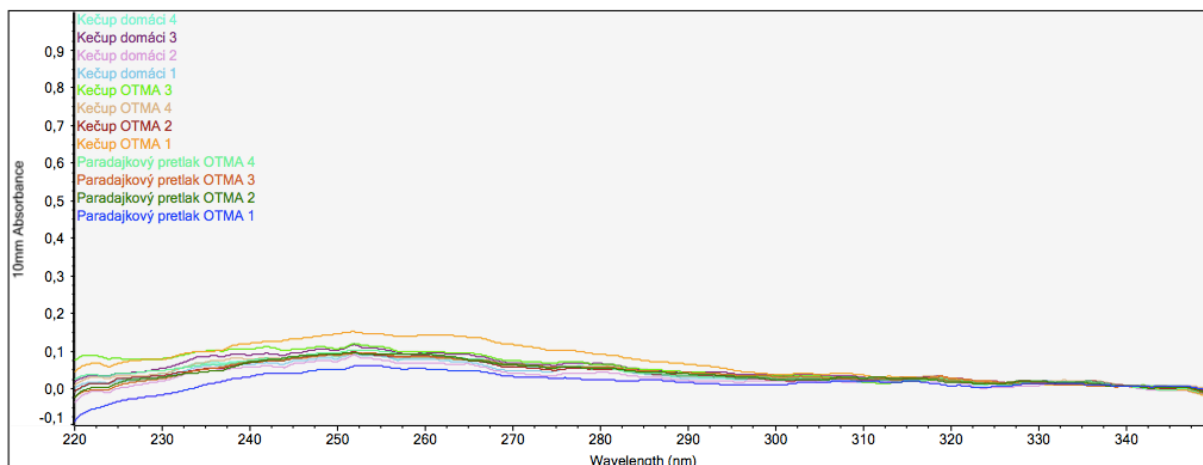
Paradajkový pretlak OTMA	1	2	3	4	Koncentrát
c DNA [ng/μl]	2,2	4,2	3,9	4,3	6,6
A_{260nm}	0,05	0,09	0,08	0,086	0,13
A_{280nm}	0,02	0,05	0,05	0,045	0,07
A_{260nm}/A_{280nm}	2,79	1,82	1,60	1,90	1,99
A_{260nm}/A_{230nm}	1,78	3,88	4,19	2,13	0,55

Tabuľka 10: Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie DNA (izolovanej 18.10.2016) a parametrov jej čistoty v 4 paralelných izolátoch z kečupu OTMA a ich koncentráty.

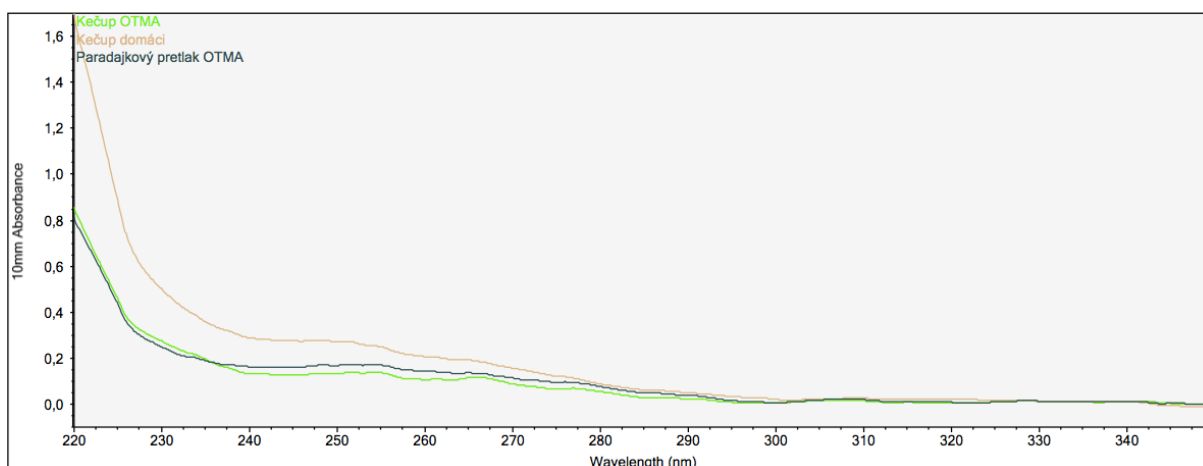
Kečup OTMA	1	2	3	4	Koncentrát
c DNA [ng/μl]	6,8	4,0	4,6	3,8	4,8
A_{260nm}	0,14	0,08	0,09	0,08	0,10
A_{280nm}	0,08	0,04	0,06	0,05	0,04
A_{260nm}/A_{280nm}	1,61	1,80	1,57	1,53	2,20
A_{260nm}/A_{230nm}	1,95	3,02	3,47	2,39	0,36

Tabuľka 11: Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie DNA (izolovanej 18.10.2016) a parametrov jej čistoty v 4 paralelných izolátoch z domáceho kečupu a ich koncentráty.

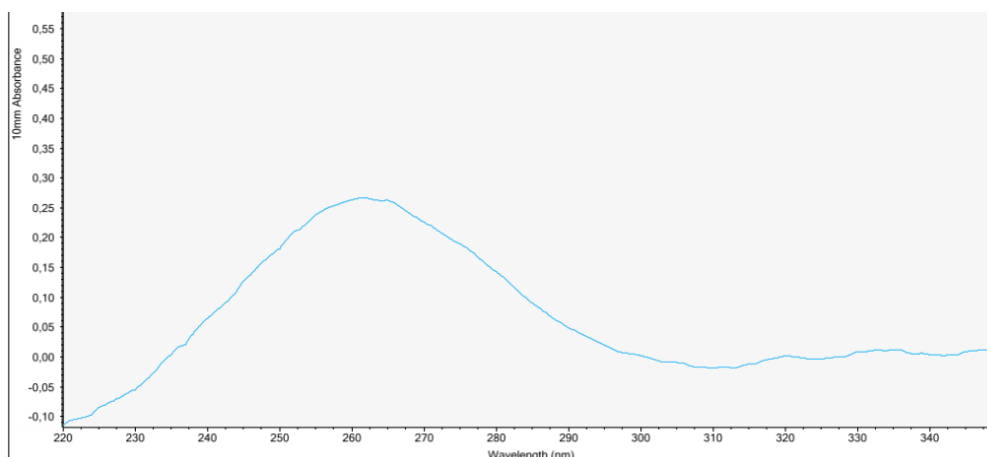
Kečup domáci	1	2	3	4	Koncentrát
c DNA [ng/μl]	3,6	3,0	4,4	3,7	9,8
A_{260nm}	0,07	0,06	0,09	0,07	1,20
A_{280nm}	0,05	0,04	0,06	0,05	0,08
A_{260nm}/A_{280nm}	1,57	1,72	1,48	1,44	2,55
A_{260nm}/A_{230nm}	3,47	5,25	1,94	2,37	0,40



Obrázok 17: Graf závislosti absorpcie DNA od vlnovej dĺžky žiarenia v paralelných DNA (1 – 4) izolovaných z homogénátov s lyzačným činidlom s CTAB v prostredí 16% PEG 6000 z paradajkového pretlaku OTMA, kečupu OTMA a domáceho kečupu (izolované 18.10.2016).



Obrázok 18: Graf závislosti absorpcie od vlnovej dĺžky žiarenia v DNA izolovaných z homogénátov s lyzačným činidlom s CTAB v prostredí 16% PEG 6000 z paradajkového pretlaku OTMA, kečupu OTMA a domáceho kečupu po prezrážaní etanolom.

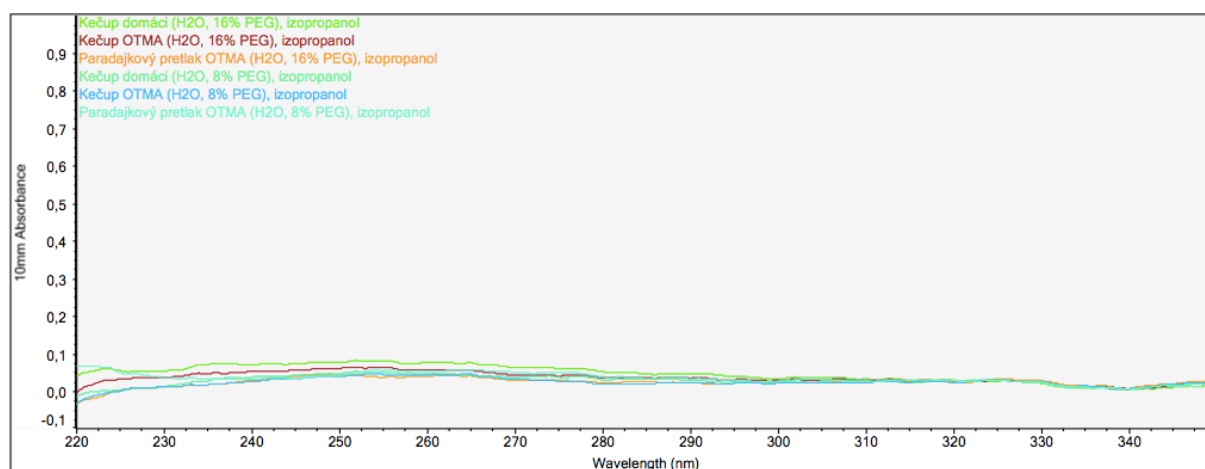


Obrázok 19: Graf závislosti absorpcie od vlnovej dĺžky žiarenia v DNA z *Brassica oleracea*, izolovanej štandardnou metódou s CTAB, ktorá bola použitá ako pozitívna kontrola.

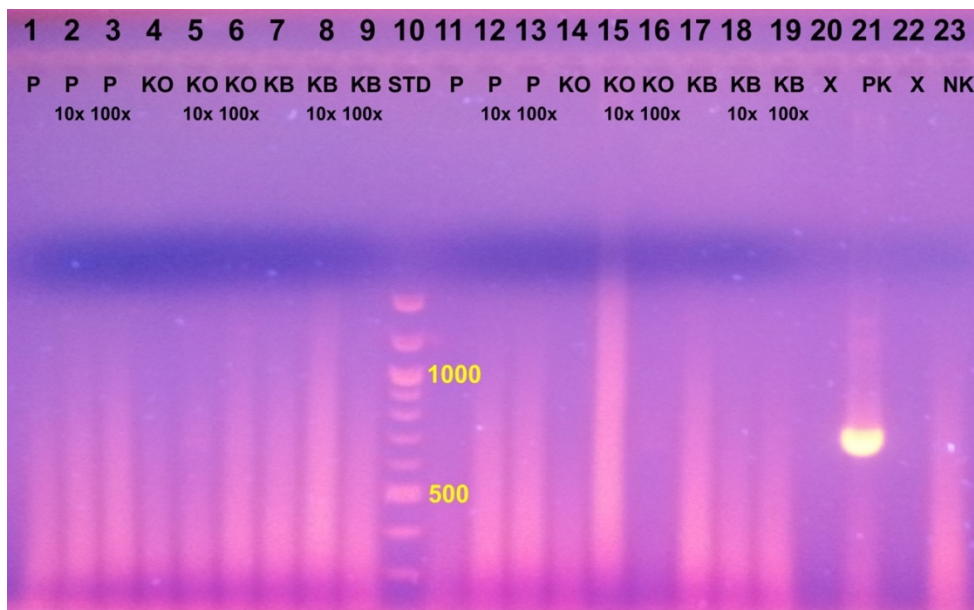
Po prezrážaní etanolom sa hodnota $A_{260\text{nm}}$ zvýšila len pri DNA izolovaných z paradajkového pretlaku OTMA a domáceho kečupu, nie však pri kečupe OTMA. Pri rovnakých DNA došlo tiež k miernemu nárastu hodnôt $A_{280\text{nm}}$.

4.3.4.2 Zakoncentrovanie vyizolovanej DNA pomocou izopropanolu

Prezrážanie izopropanolom bolo prevedené podľa postupu 4.2.6.2. Testované vzorky DNA boli izolované priamo z homogenátov s vodou z paradajkového pretlaku OTMA, kečupu OTMA a domáceho kečupu, s použitím 8 a 16% PEG 6000. Namerané koncentrácie DNA a parametre jej čistoty sú uvedené v Tabuľke 5, 6 a 7. Absorbčné krivky zakoncentrovaných DNA sú zachytené na Obrázku 20. Vzorky boli taktiež použité pre amplifikáciu v PCR (Obrázok 21) podľa postupu 4.2.4, Tabuľka 3, s použitím špecifických primerov pre amplifikáciu úseku 700 bp.



Obrázok 20: Graf závislosti absorpcie DNA od vlnovej dĺžky žiarenia po prezrážaní DNA izopropanolom. DNA bola izolovaná v prostredí 8 a 16 % PEG 6000 z homogenátu s vodou z paradajkového pretlaku OTMA, kečupu OTMA a domáceho kečupu (2.11.2016).



Beh	Značka	DNA	Použitý PEG	Detekcia produktu PCR	Množstvo DNA pre PCR [ng]
1	P	paradajkový pretlak OTMA neriedený	8%	-	4,8
2	P 10x	paradajkový pretlak OTMA - riedenie 10x	8%	-	
3	P 100x	paradajkový pretlak OTMA - riedenie 100x	8%	-	
4	KO	kečup OTMA- neriedený	8%	-	3,8
5	KO 10x	kečup OTMA- riedenie 10x	8%	-	
6	KO 100x	kečup OTMA- riedenie 100x	8%	-	
7	KB	kečup domáci - neriedený	8%	-	4
8	KB 10x	kečup domáci - riedenie 10x	8%	-	
9	KB 100x	kečup domáci- riedenie 100x	8%	-	
10	STD	štandard molekulových hmotností			
11	P	paradajkový pretlak OTMA neriedený	16%	-	3,4
12	P 10x	paradajkový pretlak OTMA - riedenie 10x	16%	-	
13	P 100x	paradajkový pretlak OTMA - riedenie 100x	16%	-	
14	KO	kečup OTMA- neriedený	16%	-	5
15	KO 10x	kečup OTMA- riedenie 10x	16%	-	
16	KO 100x	kečup OTMA- riedenie 100x	16%	-	
17	KB	kečup domáci - neriedený	16%	-	7
18	KB 10x	kečup domáci - riedenie 10x	16%	-	
19	KB 100x	kečup domáci- riedenie 100x	16%	-	
20	X				
21	PK	pozitívna kontrola	-	+++	20
22	X				
23	NK	negatívna kontrola	-	-	

Obrázok 21: Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy špecifických produktov PCR rastlinnej DNA o veľkosti 700 bp, izolovanej z homogenátu s vodou v prostredí 8 a 16 % PEG 6000 (2.11.2016) a po prezrážaní izopropanolom.

Po prezrážaní izopropanolom DNA izolovanej z homogenátov vo vode v prostredí 8 a 16 % PEG 6000 nedošlo k zvýšeniu koncentrácie DNA. Po amplifikácii neboli agarózovou gélovou elektroforézou detegované produkty PCR. Na základe predchádzajúcich výsledkov predpokladáme koextrakciu inhibítorov PCR spolu s DNA. Inhibítory neboli odstránené prezrážaním.

4.3.5 Vplyv skladovania na amplifikovateľnosť DNA

Podľa vyššie uvedeného postupu sme izolovali rastlinnú DNA z tepelne upravených potravín rastlinného pôvodu. Na začiatku sme pracovali s paradajkovým pretlakom OTMA a zemiakovými lupienkami.

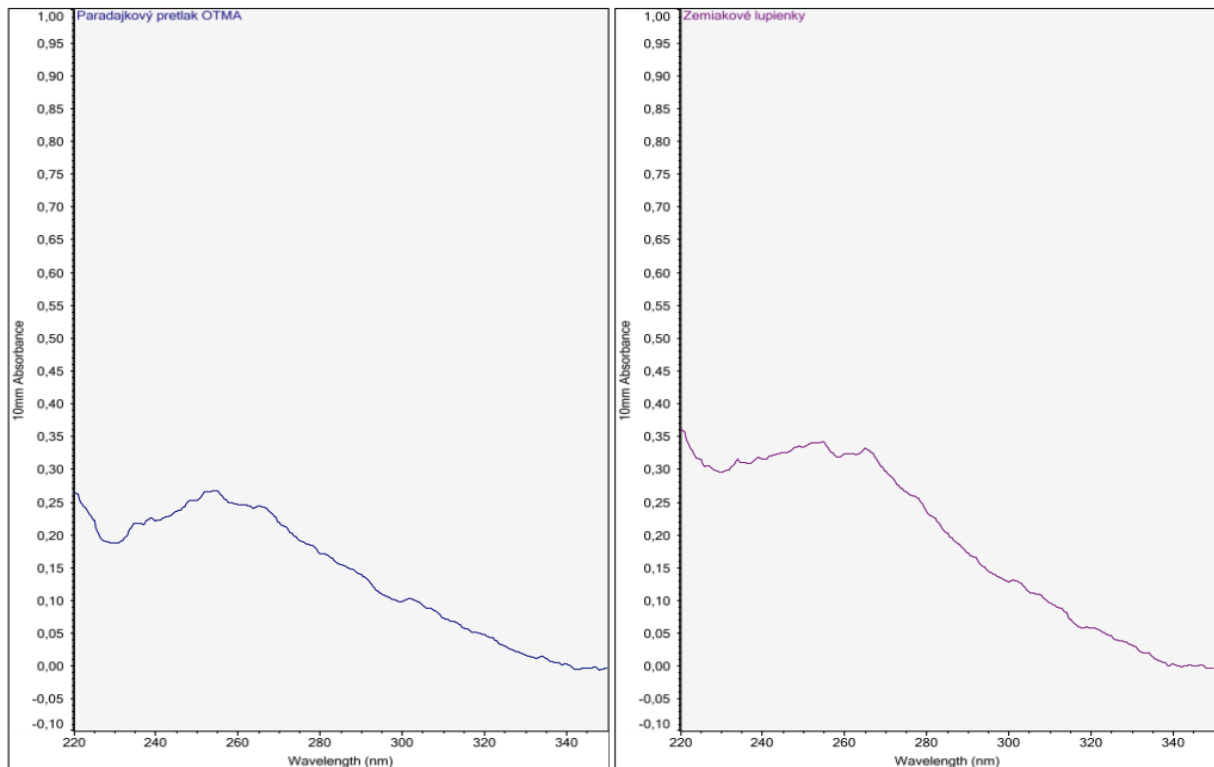
- Pre paradajkový pretlak (0,7 g) sme použili 1,5 ml skúmavku a pridali sme 500 μ l lyzačného činidla s CTAB a 1 μ l merkaptoetanolu, ako je uvedené v postupe v bode 4.2.1.
- K rozdrteným zemiakovým lupienkom (0,2 g) sme kvôli vysokej hustote zmesi pridali 1500 μ l lyzačného činidla s CTAB a 1 μ l merkaptoetanolu, pričom bolo nutné použiť väčšiu skúmavku (3 ml).

4.3.5.1 Koncentrácia a čistota čerstvo izolovanej DNA

Výsledky koncentrácie a čistoty DNA izolovanej z paradajkového pretlaku OTMA a zo zemiakových lupienkov podľa postupu 4.2.1 a 4.2.2 zo dňa 8.3.2016 uvádza Tabuľka 12. DNA bola izolovaná z homogenátu pripraveného s použitím činidla s CTAB v prostredí 16 % PEG 6000. Spektrofotometricky boli tiež merané absorbancie jednotlivých DNA pri rôznych vlnových dĺžkach. Zmeny absorbancií DNA v závislosti od zmeny vlnovej dĺžky prechádzajúceho žiarenia sú graficky zaznamenané na Obrázku 22.

Tabuľka 12: Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie DNA izolovanej z paradajkového pretlaku OTMA a zemiakových lupienkov 8.3.2016.

	Paradajkový pretlak OTMA	Zemiakové lupienky
c DNA [ng/μl]	12,1	16,0
A_{260nm}	0,24	0,32
A_{280nm}	0,17	0,23
A_{260nm}/A_{280nm}	1,45	1,38
A_{260nm}/A_{230nm}	1,32	1,09

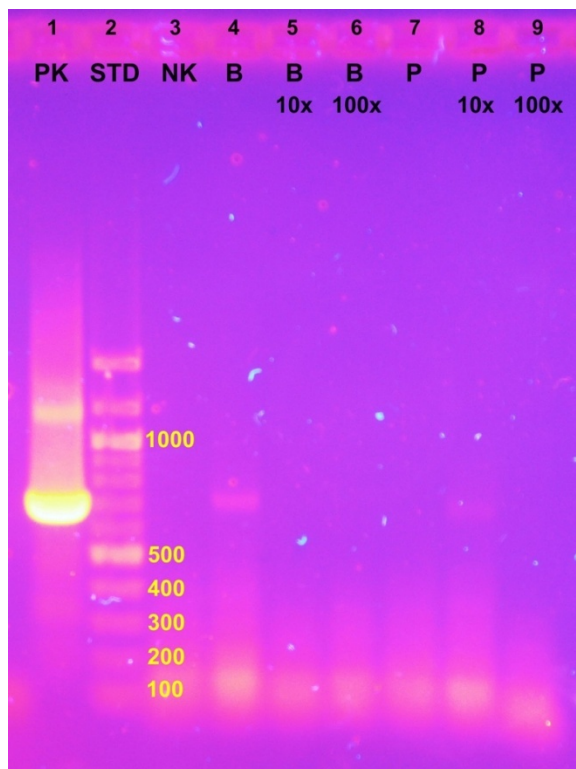


Obrázok 22: Graf závislosti absorbancie DNA izolovanej z paradajkového pretlaku OTMA (vľavo) a zemiakových lupienkov (vpravo) od vlnovej dĺžky žiarenia (8.3.2016).

DNA bola izolovaná v koncentrácii 12,1 ng/μl z paradajkového pretlaku OTMA a 16 ng/μl zo zemiakových lupienkov. DNA bola znečistená.

4.3.5.2 *Amplifikácia čerstvo izolovanej DNA a po jej skladovaní*

Pomocou PCR bola najprv overená amplifikovateľnosť čerstvo izolovanej DNA z 8.3.2016, určenej pre ďalšie skladovanie. Výsledky amplifikácie DNA v PCR pred uskladnením zobrazuje agarózový gél na Obrázku 23. Po overení amplifikovateľnosti bola DNA uskladnená pri -20 °C a jej amplifikovateľnosť bola opäť overená po približne 7 mesiacoch.

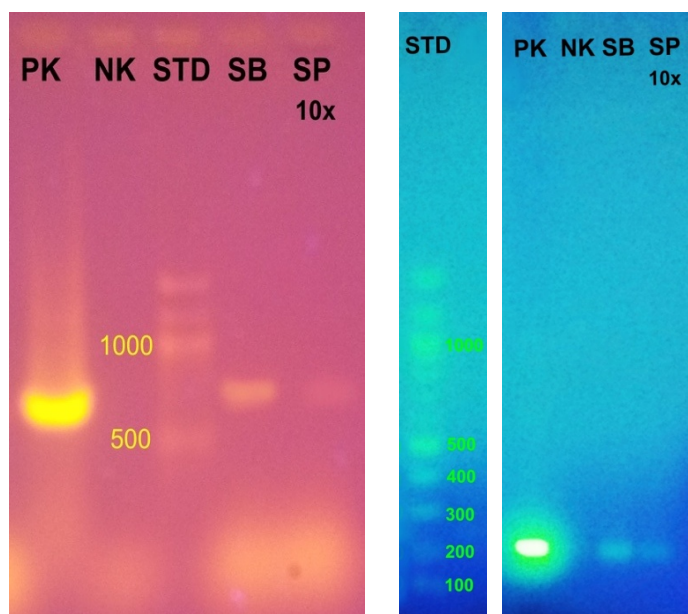


Príprava homogenátu	Dátum izolácie	Dátum PCR	Beh	Značka	DNA	Detekcia produktu PCR	Množstvo DNA [ng]	Veľkosť [bp]
-	-	8.3.2016	1	PK	pozitívna kontrola	+++	20,000	700
-	-	-	2	STD	štandard molekulových hmotností			
-	-	8.3.2016	3	NK	negatívna kontrola	-		700
8.3.2016	8.3.2016	8.3.2016	4	B	zemiakové lupienky neriedené	++	32,000	700
8.3.2016	8.3.2016	8.3.2016	5	B 10x	zemiakové lupienky - riedenie 10x	-		700
8.3.2016	8.3.2016	8.3.2016	6	B 100x	zemiakové lupienky - riedenie 100x	-		700
8.3.2016	8.3.2016	8.3.2016	7	P	paradajkový pretlak OTMA neriedený	-	24,200	700
8.3.2016	8.3.2016	8.3.2016	8	P 10x	paradajkový pretlak OTMA - riedenie 10x	+		700
8.3.2016	8.3.2016	8.3.2016	9	P 100x	paradajkový pretlak OTMA - riedenie 100x	-		700

Obrázok 23: Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy špecifických produktov PCR o veľkosti 700 bp. Amplifikovaná bola DNA izolovaná z paradajkového pretlaku OTMA a zo zemiakových lupienkov.

Skladovanie izolátu

Obrázok 24 zobrazuje amplifikovateľnosť po skladovaní izolátu DNA (v TE pufri) pri -20 °C po dobu približne 7 mesiacov.



Príprava homogenátu	Dátum izolácie	Dátum PCR	Značka	DNA	Detekcia produktu PCR	Množstvo DNA pre PCR [ng]	Veľkosť [bp]
-	-	12.10.2016	PK	pozitívna kontrola	+++	20	700
-	-	12.10.2016	NK	negatívna kontrola	-		700
-	-	-	STD	štandard molekulových hmotností			
8.3.2016	8.3.2016	12.10.2016	SB	zemiakové lupienky neriedené	++	32	700
8.3.2016	8.3.2016	12.10.2016	SP 10x	paradajkový pretlak OTMA - riedenie 10x	+	2,42	700
-	-	-	STD	štandard molekulových hmotností			
8.3.2016	8.3.2016	20.10.2016	SB	zemiakové lupienky neriedené	++	32	220
8.3.2016	8.3.2016	20.10.2016	SP 10x	paradajkový pretlak OTMA - riedenie 10x	+	2,42	220
-	-	-	PK	pozitívna kontrola	+++	20	220
-	-	20.10.2016	NK	negatívna kontrola	-		220

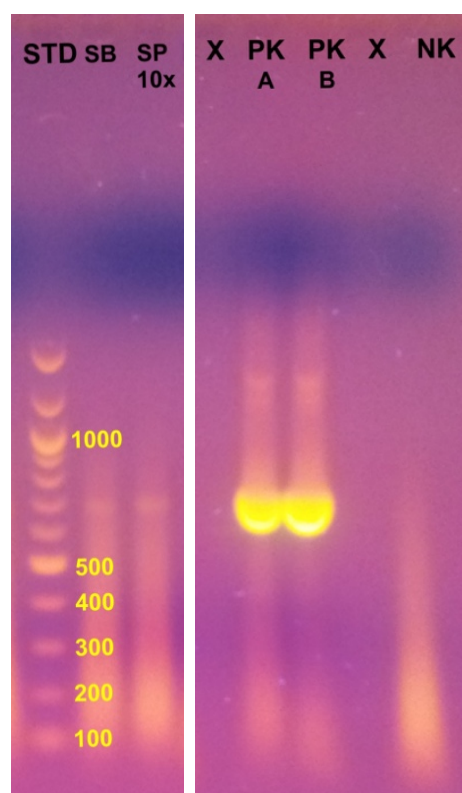
Obrázok 24: Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy špecifických produktov PCR rastlinnej DNA o veľkosti 700 a 220 bp. DNA bola izolovaná 8.3.2016 a amplifikovaná po skladovaní pri -20 °C po dobu približne 7 mesiacov.

Špecifický produkt PCR nízkej intenzity bol detegovaný po amplifikácii neriedenej DNA izolovanej zo zemiakových lupienkov a 10x riedenej DNA izolovanej z paradajkového pretlaku OTMA. Tento výsledok potvrdzuje prítomnosť inhibítorov PCR, koextrahovaných s DNA z paradajkového pretlaku OTMA.

Amplikóny boli detegované aj po viac ako 7 mesiacoch skladovania DNA izolátu. Vplyv skladovania DNA izolovanej magnetickými časticami na jej amplifikovateľnosť sa nepotvrdil.

Skladovanie homogenátu

Za rovnakých podmienok (-20 °C) bol skladovaný aj rastlinný homogenát pripravený s CTAB pufrom zo zemiakových lupienkov a paradajkového pretlaku OTMA. Po približne 7 mesiacoch bola z tohto homogenátu izolovaná DNA pomocou magnetických častíc P(HEMA-co-GMA), ako je uvedené v postupe 4.2.2. Izolovaná DNA bola amplifikovaná v PCR s použitím primerov F 5,8 S a R 18 S pre špecifický úsek o veľkosti 700 bp. Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy týchto špecifických produktov PCR uvádza Obrázok 25.



Príprava homogenátu	Dátum izolácie	Dátum PCR	Značka	DNA	Detekcia produktu PCR	Veľkosť [bp]
-	-	-	STD	štandard molekulových hmotností		
8.3.2016	18.10.2016	25.10.2016	SB	zemiakové lupienky neriedené	++	700
8.3.2016	18.10.2016	25.10.2016	SP 10x	paradajkový pretlak OTMA - riedenie 10x	+	700
			X			
8.3.2016	18.10.2016	25.10.2016	PK A	pozitívna kontrola - koncentrácia 10 ng/μl	+++	700
8.3.2016	18.10.2016	25.10.2016	PK B	pozitívna kontrola - koncentrácia 1 ng/μl	+++	700
			X			
8.3.2016	18.10.2016	25.10.2016	NK	negatívna kontrola	-	700

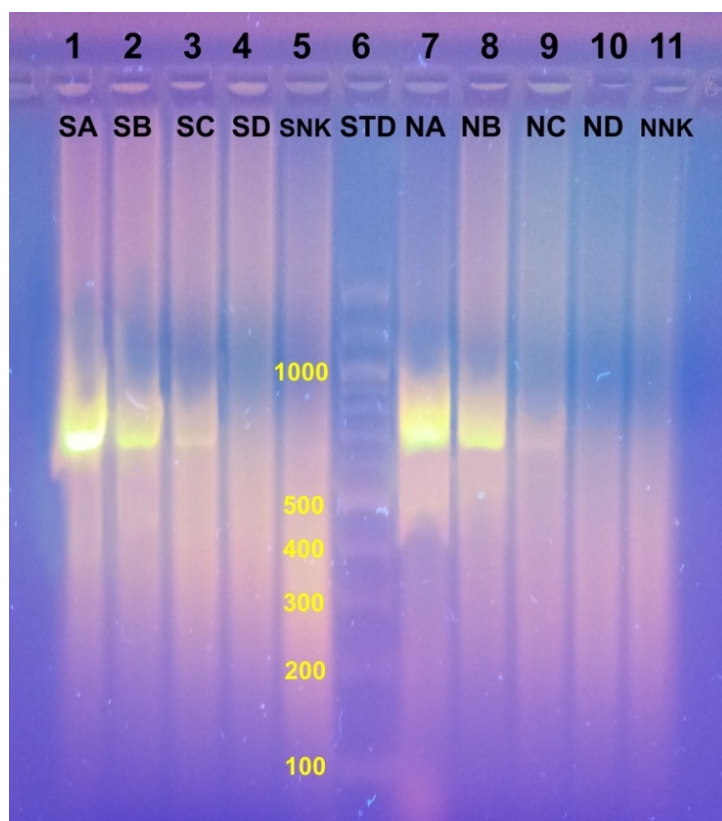
Obrázok 25: Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy špecifických produktov PCR rastlinnej DNA o veľkosti 700 bp, izolovanej z homogenátu pripraveného 8.3.2016 po skladovaní pri -20 °C po dobu približne 7 mesiacov.

Amplikóny boli detegované po amplifikácii DNA z oboch výrobkov. Vplyv skladovania homogenátu v CTAB pufri (-20 °C / 7 mesiacov) na amplifikovateľnosť DNA sa nepovrdil.

4.3.6 Amplifikácia špecifického produktu PCR z kontrolnej DNA *Brasica oleracea*.

DNA používaná ako pozitívna kontrola, izolovaná z *B. oleracea* (10 ng/μl) klasickou CTAB metódou, bola nariedená v TE pufri 10x, 100x a 1000x a použitá pre amplifikáciu v

PCR. Na týchto rôznych koncentráciách bola testovaná citlivosť PCR so starými a novými komponentami. PCR zmesi boli pripravené podľa Tabuľky 2 a 3 a PCR prebehla za podmienok uvedených v postupe 4.2.4. Boli testované nové komponenty pre PCR (*Taq* polymeráza 1.1) a pre porovnanie boli zmesi pre PCR pripravené aj s komponentami starými. Výsledky amplifikácie boli overené agarózovou gélovou elektroforézou, ktorej výsledok je na Obrázku 26.



Beh	Značka	PCR	DNA	Detekcia produktu PCR	Množstvo DNA pre PCR [ng]
1	SA	Staré komponenty	pozitívna kontrola	+++	20
2	SB		pozitívna kontrola	++	2
3	SC		pozitívna kontrola	+	0,2
4	SD		pozitívna kontrola	-	0,02
5	SNK		negatívna kontrola	-	-
6	STD	štandard molekulových hmotností			
7	NA	Nové komponenty	pozitívna kontrola	+++	20
8	NB		pozitívna kontrola	++	2
9	NC		pozitívna kontrola	+	0,2
10	ND		pozitívna kontrola	-	0,02
11	NNK		negatívna kontrola	-	-

Obrázok 26: Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy špecifických produktov PCR rastlinnej DNA z *B. oleracea* o veľkosti 700 bp.

Najnižšie množstvo DNA, ktoré sa v PCR amplifikovalo a umožnilo detekciu špecifického produktu PCR po agarózovej gélovej elektroforéze bolo 0,2 ng.

4.3.7 Porovnanie vplyvu rôznych magnetických častíc na kvalitu a množstvo izolovanej DNA

Celý postup bol vybraný na základe výsledkov predchádzajúcich testov, ktoré boli prevedené na vzorkách rastlinnej DNA izolovanej z potravinárskych paradajkových produktov (paradajkové listy, nezrelé a zrelé plody, paradajkový pretlak OTMA, kečup OTMA a domáci kečup) pomocou magnetických mikročastíc P(HEMA-co-GMA). Výsledky dosiahnuté najefektívnejším postupom izolácie a amplifikácie s použitím týchto častíc boli porovnané s výsledkami dosiahnutými rovnakým postupom, ale pomocou častíc MPG (magnetické porézne sklo) a HPS B-M-NH₂. Homogenáty v lyzačnom roztoku s CTAB pre izoláciu DNA magnetickými časticami boli pripravené z potravinových výrobkov rastlinného pôvodu podľa postupu 4.2.2. Postup izolácie DNA magnetickými časticami je uvedený v bode 4.2.3. Tabuľka 1 uvádza presné zloženie separačnej zmesi, pričom použitá koncentrácia PEG 6000 bola 16 %. Zmes pre PCR bola namiešaná podľa Tabuľky 4 s prídavkom PCR enhanceru (0,5 µl vody bolo nahradených 0,5 µl enhanceru).

4.3.7.1 Koncentrácia a čistota DNA izolovanej rôznymi časticami

Rastlinná DNA izolovaná magnetickými časticami P(HEMA-co-GMA), MPG a HPS B-M-NH₂ bola eluovaná do TE pufru do druhého dňa a následne bola spektrofotometricky stanovená jej koncentrácia. Tieto výsledky sú zhrnuté v Tabuľkách 13, 14 a 15. Absorpčné krivky DNA pre jednotlivé častice zobrazujú grafy na Obrázkoch 27, 28 a 29. Graf na Obrázku 30 poukazuje na rozdiely absorpčných kriviek v závislosti od typu magnetických častíc použitých pre izoláciu DNA. Uvedené výsledky boli potvrdené opakovaním daného postupu s rovnakými vzorkami.

Tabuľka 13: Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty rastlinnej DNA, izolovanej z homogenátov s lyzačným činidlom CTAB pomocou magnetických častíc P(HEMA-co-GMA)

29.3.2017.

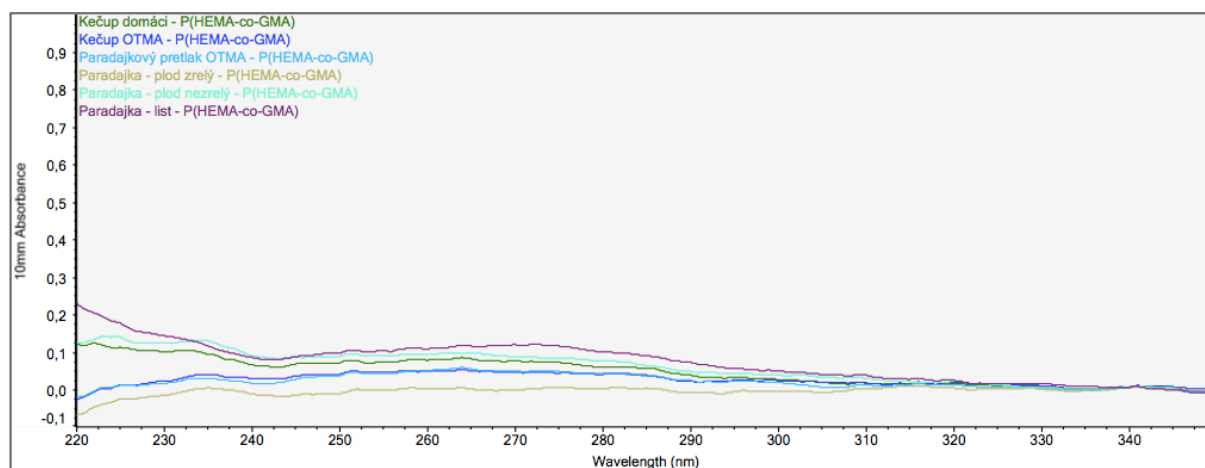
	Paradajkový list	Paradajka zelená	Paradajka zrelá	Paradajkový pretlak OTMA	Kečup OTMA	Kečup domáci
c DNA [ng/µl]	5,1	4,4	0,3	2,2	2,1	3,6
A _{260nm}	0,10	0,09	0,01	0,04	0,04	0,07
A _{280nm}	0,09	0,07	0,01	0,04	0,03	0,05
A _{260nm} /A _{280nm}	1,08	1,25	0,91	1,25	1,23	1,33
A _{260nm} /A _{230nm}	0,74	0,74	0,23	4,50	2,72	0,77

Tabuľka 14: Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty rastlinnej DNA, izolovanej z homogenátov s lyzačným činidlom CTAB pomocou magnetických častíc HPS B-M-NH₂ (30.3.2017).

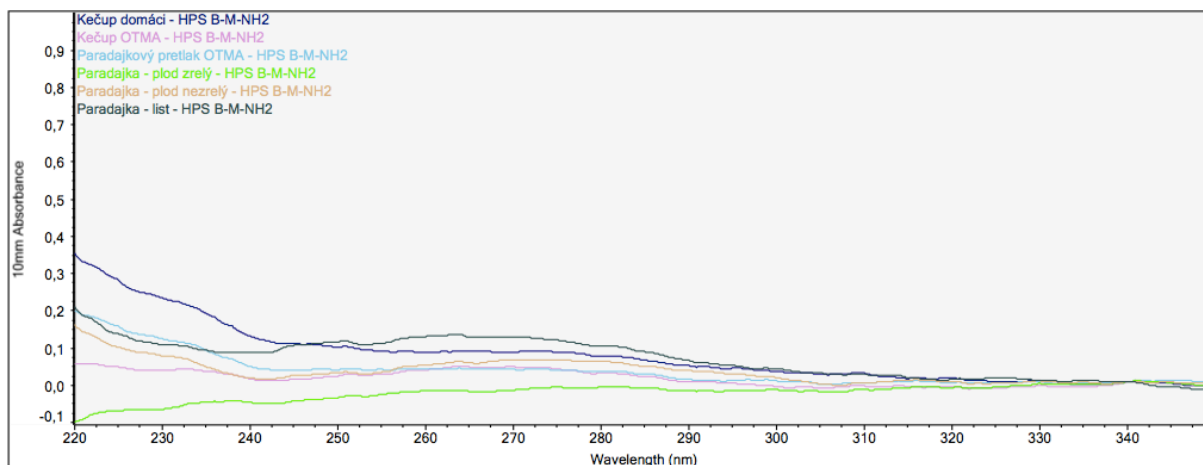
	Paradajkový list	Paradajka zelená	Paradajka zrelá	Paradajkový pretlak OTMA	Kečup OTMA	Kečup domáci
c DNA [ng/μl]	9,0	4,1	2,1	13,6	3,9	6,0
A_{260nm}	0,18	0,08	0,04	0,27	0,08	0,12
A_{280nm}	0,13	0,06	0,01	0,29	0,06	0,10
A_{260nm}/A_{280nm}	1,35	1,36	3,06	0,95	1,37	1,25
A_{260nm}/A_{230nm}	1,21	0,59	0,74	0,61	0,99	0,42

Tabuľka 15: Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty rastlinnej DNA, izolovanej z homogenátov s lyzačným činidlom CTAB pomocou magnetických častíc MPG (30.3.2017).

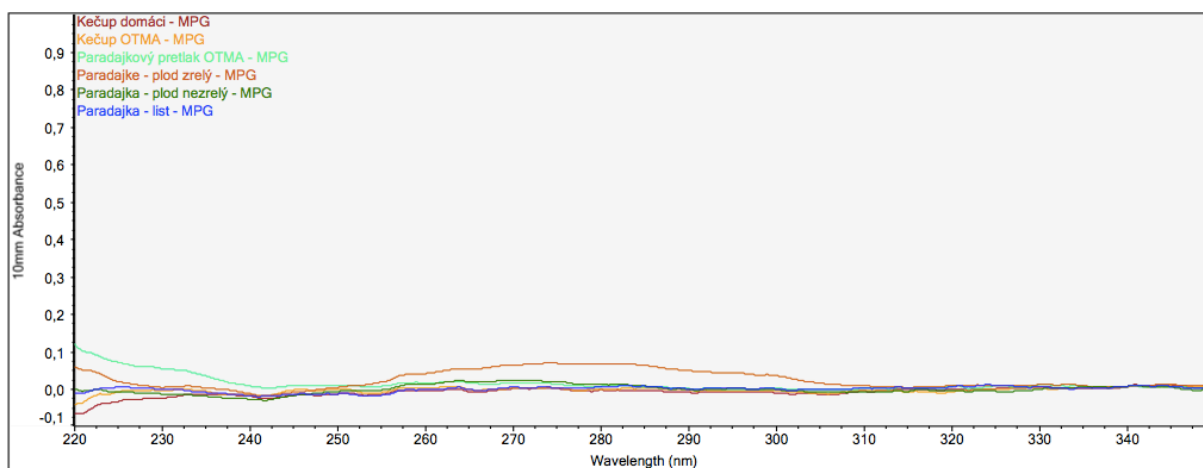
	Paradajkový list	Paradajka zelená	Paradajka zrelá	Paradajkový pretlak OTMA	Kečup OTMA	Kečup domáci
c DNA [ng/μl]	3,2	1,4	1,0	1,7	1,5	1,7
A_{260nm}	0,06	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03
A_{280nm}	0,05	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02
A_{260nm}/A_{280nm}	1,34	1,36	1,43	2,16	3,11	1,63
A_{260nm}/A_{230nm}	0,65	0,54	0,56	0,36	0,55	0,38



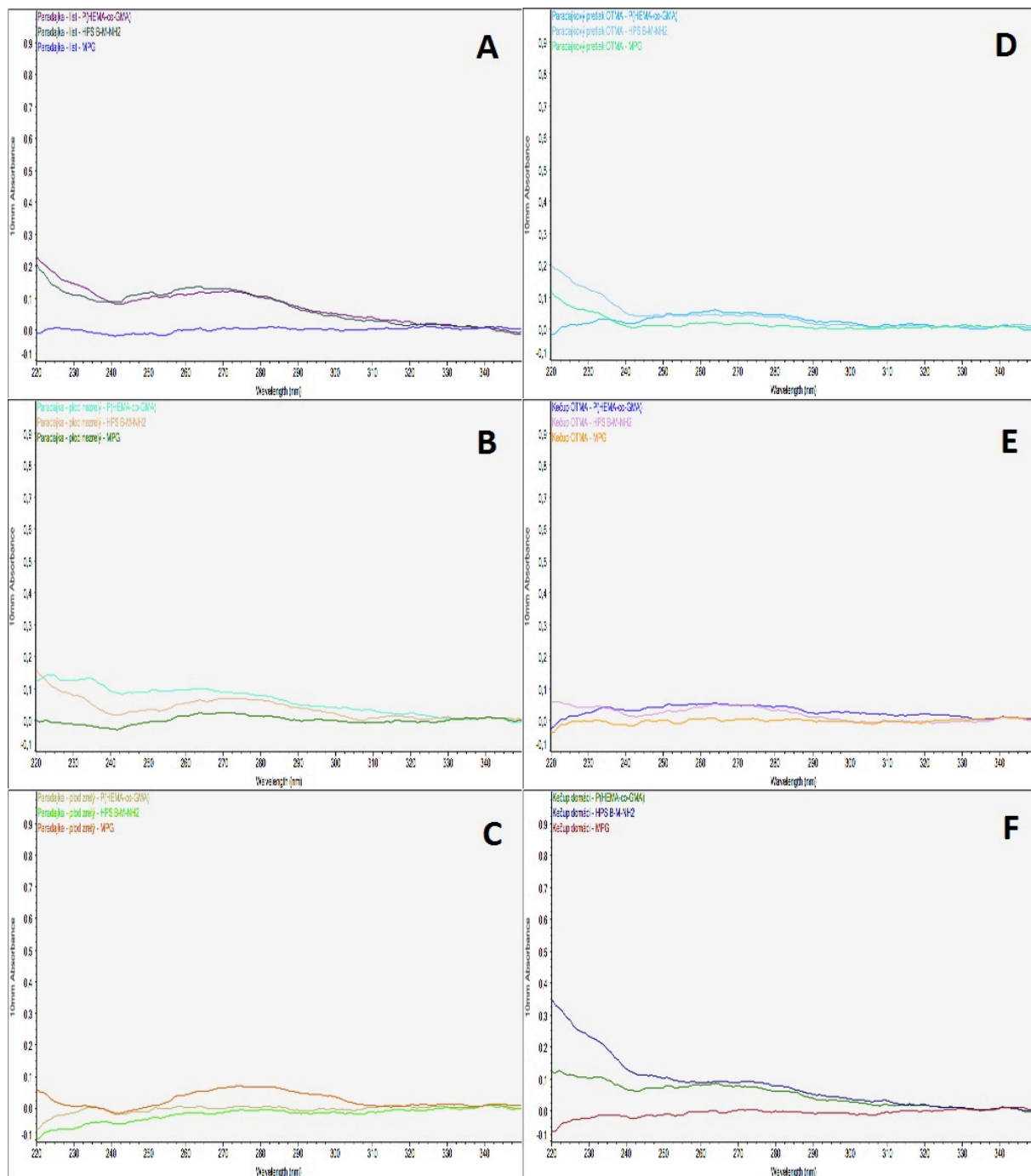
Obrázok 27: Graf závislosti absorpcie od vlnovej dĺžky žiarenia rastlinnej DNA izolovanej z homogenátov s lyzačným činidlom CTAB pomocou magnetických častíc P(HEMA-co-GMA) 29.3.2017.



Obrázok 28: Graf závislosti absorpcie od vlnovej dĺžky žiarenia rastlinnej DNA izolovanej z homogenátov s lyzačným činidlom CTAB pomocou magnetických častíc HPS B-M-NH₂ 30.3.2017.



Obrázok 29: Graf závislosti absorpcie od vlnovej dĺžky žiarenia rastlinnej DNA izolovanej z homogenátov s lyzačným činidlom CTAB pomocou magnetických častíc MPG 30.3.2017.



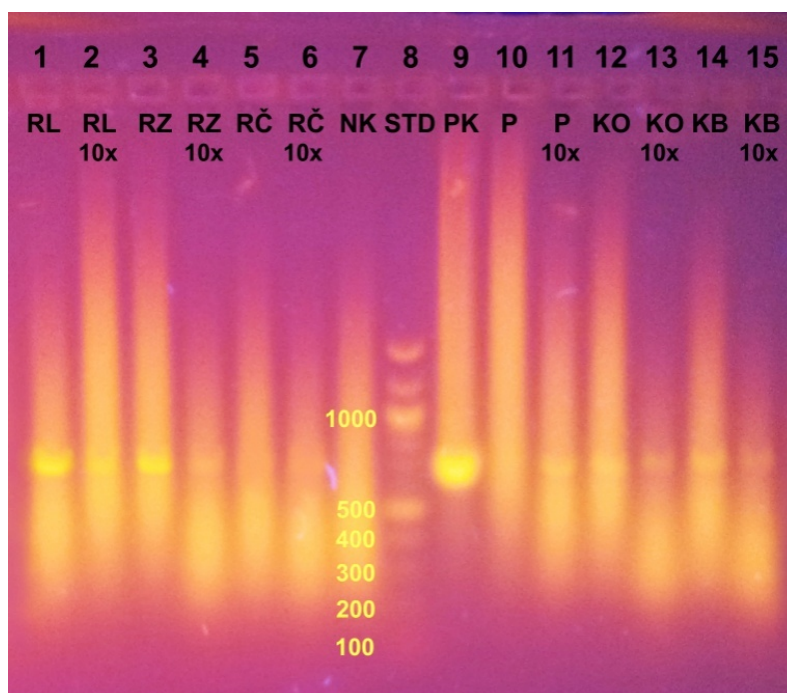
Obrázok 30: Grafy závislosti absorbcie od vlnovej dĺžky žiarenia DNA izolovanej z homogenátov s lyzačným činidlom CTAB: A: paradajkového listu; B: nezrelého plodu paradajky; C: zrelého červeného plodu paradajky; D: paradajkového pretlaku OTMA; E: kečupu OTMA; F: domáceho kečupu; pomocou magnetických častíc P(HEMA-co-GMA), HPS B-M-NH₂ a MPG 29.3.2017.

Boli zistené rozdiely v množstve izolovanej DNA v závislosti na druhu výrobku a použitých časticiach. Najväčšie množstvá DNA boli izolované z paradajkového listu, zo zelenej paradajky a z domáceho kečupu časticami P(HEMA-co-GMA) a HPS B-M-NH₂, na rozdiel od častíc MPG.

Zo závislosti absorbancie izolovanej DNA na vlnovej dĺžke vyplýva, že DNA je znečistená (proteínmi, prípadne polyfenolmi).

4.3.7.2 Amplifikovateľnosť DNA izolovanej rôznymi časticami

Čistota DNA izolovanej rôznymi časticami môže mať vplyv na jej amplifikovateľnosť. Tá bola overená pomocou PCR s použitím PCR enhanceru. Amplifikované boli neriedené vzorky DNA izolovanej z paradajkových produktov (2 μ l) a ich desaťnásobné riedenia. Produkty PCR boli vizualizované a vyhodnotené pomocou agarózovej gélovej elektroforézy, ktorej výsledky vidíme na Obrázku 31 a 32.

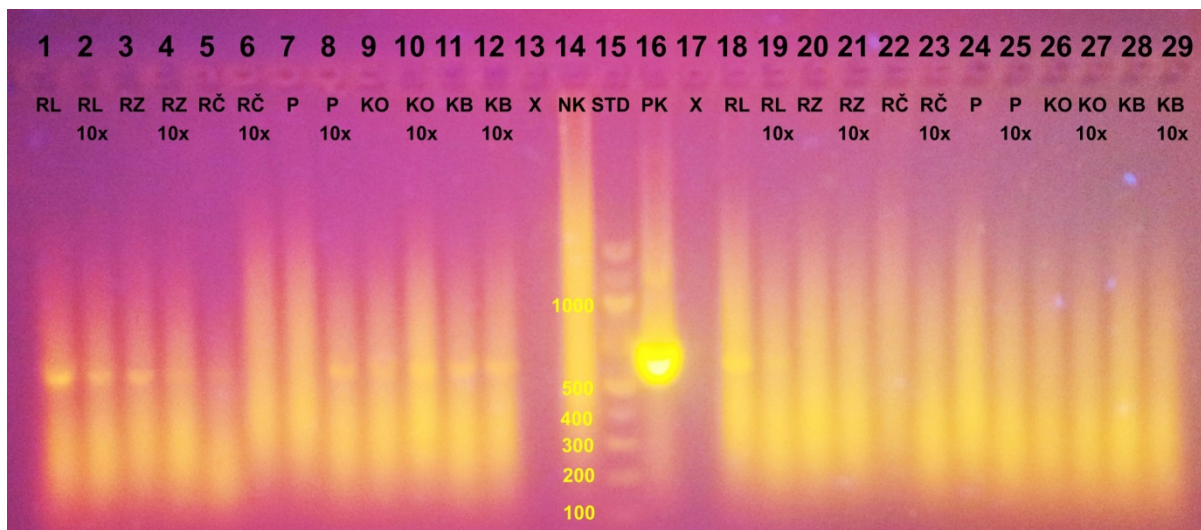


Beh	Značka	DNA	Detekcia produktu PCR	Množstvo DNA pre PCR [ng]
1	RL	paradajka - list - neriedená	+++	10,2
2	RL 10x	paradajka - list - riedenie 10x	++	
3	RZ	paradajka - zelená - neriedená	+++	8,8
4	RZ 10x	paradajka - zelená - riedenie 10x	+	
5	RČ	paradajka - zrelá - neriedená	-	0,6 *
6	RČ 10x	paradajka - zrelá - riedenie 10x	-	
7	NK	negatívna kontrola	-	
8	STD	štandard molekulových hmotností		
9	PK	pozitívna kontrola	+++	20,0
10	P	paradajkový pretlak OTMA neriedený	-	4,4
11	P 10x	paradajkový pretlak OTMA - riedenie 10x	++	
12	KO	kečup OTMA- neriedený	++	4,2
13	KO 10x	kečup OTMA- riedenie 10x	+	
14	KB	kečup domáci - neriedený	++	7,2
15	KB 10x	kečup domáci - riedenie 10x	+	

*veľmi malé množstvo DNA; väčšie množstvo DNA sa v PCR po opakovaní amplifikovalo.

Obrázok 31: Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy špecifických produktov PCR o veľkosti 700 bp DNA izolovanej z výrobkov pomocou magnetických mikročastíc P(HEMA-co-GMA)

29.3.2017.



Beh	Značka	DNA	Detekcia produktu PCR	Množstvo DNA pre PCR [ng]
1	RL	paradajka - list - neriedená	+++	18,0
2	RL 10x	paradajka - list - riedenie 10x	++	
3	RZ	paradajka - zelená - neriedená	++	8,2
4	RZ 10x	paradajka - zelená - riedenie 10x	+	
5	RČ	paradajka - zrelá - neriedená	+	4,2
6	RČ 10x	paradajka - zrelá - riedenie 10x	-	
7	P	paradajkový pretlak OTMA neriedený	+/-	27,2
8	P 10x	paradajkový pretlak OTMA - riedenie 10x	++	
9	KO	kečup OTMA- neriedený	++	7,8
10	KO 10x	kečup OTMA- riedenie 10x	++	
11	KB	kečup domáci - neriedený	++	12,0
12	KB 10x	kečup domáci - riedenie 10x	++	
13	X			
14	NK	negatívna kontrola	-	
15	STD	štandard molekulových hmotností		
16	PK	pozitívna kontrola	+++	20,0
17	X			
18	RL	paradajka - list - neriedená	++	6,4
19	RL 10x	paradajka - list - riedenie 10x	+	
20	RZ	paradajka - zelená - neriedená	-	2,8
21	RZ 10x	paradajka - zelená - riedenie 10x	-	
22	RČ	paradajka - zrelá - neriedená	-	2,0
23	RČ 10x	paradajka - zrelá - riedenie 10x	-	
24	P	paradajkový pretlak OTMA neriedený	-	3,4
25	P 10x	paradajkový pretlak OTMA - riedenie 10x	-	
26	KO	kečup OTMA- neriedený	-	3,0
27	KO 10x	kečup OTMA- riedenie 10x	-	
28	KB	kečup domáci - neriedený	-	3,4
29	KB 10x	kečup domáci - riedenie 10x	-	

Obrázok 32: Výsledky agarózovej gélovej elektroforézy špecifických produktov PCR o veľkosti 700 bp. DNA bola izolovaná pomocou magnetických mikročastíc HPS B-M-NH₂ (behy číslo 1-12) a MPG (behy číslo 18-29) 29.3.2017.

DNA izolovaná z analyzovaných paradajkových produktov časticami P(HEMA-co-GMA) a HPS B-M-NH₂ sa amplifikovala v PCR. DNA izolovaná magnetickým poréznym sklom sa v PCR neamplifikovala (s výnimkou DNA izolovanej z listu paradajky).

4.4 Diskusia

4.4.1 Testovanie rôznych postupov pre prípravu homogenátu z paradajkových výrobkov

Sledovanými matricami boli predovšetkým potravinárske produkty paradajkového pôvodu, a to jednak čerstvé paradajky, jednak tepelne upravené paradajkové výrobky, akými sú pretlak, či kečup. Na Obrázku 9 je vidieť, že hodnoty absorbancií pre oblasť 260 nm (priamo úmerne odpovedajúce koncentráciám DNA) sú približne rovnaké vo všetkých vzorkách izolovaných metódou z homogenátu s vodou a sú nízke. Dôvodom veľmi nízkych koncentrácií DNA by mohla byť vedľa malého množstva DNA v homogenáte, pomerne vysoká viskozita homogenátu, čo mohlo spomaliť, či zabrániť prestupu magnetických nosičov s naviazanou DNA ku stene skúmavky, a tým zapríčiniť nízky výťažok izolácie.

Absorbčná krivka vzoriek DNA izolovaných metódou s použitím lyzačného činidla s CTAB (Obrázok 10) má typickejší priebeh v porovnaní s izoláciou z vodného roztoku, nakoľko pík v oblasti absorpcie pre DNA (260 nm) je zreteľnejší a hodnoty absorbancií v ostatných oblastiach spektra sú naopak nižšie. Takýto priebeh absorbčnej krivky naznačuje vyššiu koncentráciu izolovanej DNA.

Pri porovnaní všetkých absorbčných kriviek vedľa seba sa ukázala jednak vzájomná podobnosť DNA izolovaných rovnakým postupom, jednak vystúpili rozdiely medzi DNA, ktoré boli izolované odlišne. Hlavný viditeľný rozdiel je medzi izoláciou DNA z homogenátu s prídavkom vody a izoláciou z homogenátu s prídavkom činidla s CTAB. Uvedené taktiež naznačuje, že izolácia pomocou lyzačného činidla s CTAB je efektívnejšia, nakoľko vzorky DNA izolované týmto spôsobom (a s použitím 16% PEG 6000) vykazujú jednoznačne zreteľnejší a výraznejší pík v oblasti absorpcie DNA oproti vzorkám izolovaným z homogenátu s vodou. Tento jav je daný tým, že z homogenátu pripraveného s lyzačným činidlom s CTAB v prostredí 16% PEG 6000 boli namerané vyššie hodnoty absorbancie pri vlnovej dĺžke 260 nm.

Na základe výsledkov môžeme teda predpokladať, že 16 % PEG 6000 je pravdepodobne efektívnejší pre daný typ izolácie, ako 8 %. Tento výsledok bol potvrdený aj výsledkami gélovej elektroforézy špecifických produktov PCR (Obrázok 12).

Ako možno vidieť z Obrázku 12, boli viditeľné len dva nevýrazné amplikóny, a to len pri niektorých DNA získaných izoláciou z homogenátu s vodou v prítomnosti 16 % PEG 6000 (z riedeného domáceho kečupu). Taktiež vidíme, že amplikóny sú veľmi slabej intenzity, preto usudzujeme na prítomnosť inhibítorov PCR. Naproti tomu, agarózový gél produktov PCR DNA izolovanej z homogenátov pripravených s lyzačným činidlom CTAB v prostredí 16 % PEG 6000 môžeme vidieť na Obrázku 14. Amplikóny boli pre väčšinu vzoriek detegované.

Účinnosť lyzačného činidla s CTAB bola potvrdená v celej rade publikácii ako efektívneho prostriedku pre izoláciu DNA z rastlinných materiálov s vysokým obsahom polysacharidov, polyfenolov, či iných potenciálnych inhibítorov PCR. Sahu a kol. (2012) [3] taktiež potvrdil, že pomocou činidla s CTAB je možné izolovať vysoko kvalitnú DNA, vhodnú pre ďalšie rozličné analýzy, vrátane PCR a to aj z rastlinných vzoriek s vysokým obsahom potenciálnych kontaminantov.

4.4.2 Vplyv spracovania výrobku na kvalitu a množstvo izolovanej DNA

Ako vyplýva z Obrázkov 14 a 15, výsledky gélovej elektroforézy potvrdili rozdiely v amplifikácii DNA izolovanej z čerstvých a z potravinársky spracovaných paradajkových výrobkov, a to napriek tomu, že koncentrácie DNA boli približne rovnaké, rovnako aj ukazovatele jej čistoty. DNA izolovaná z čerstvej paradajky vykazuje po amplifikácii omnoho intenzívnejšie amplikóny v oblasti špecifických produktov PCR, než DNA z potravinárskych produktov z paradajok vyrobených. Môžeme teda na základe toho predpokladať, že DNA izolovaná z čerstvých paradajok je lepšie amplifikovateľná, a teda, že potravinárske výrobné procesy majú do istej miery negatívny vplyv na amplifikovateľnosť izolovanej DNA. Tento jav by mohol byť spôsobený degradáciou DNA (napríklad vplyvom tepla pri potravinárskom spracovaní).

N. Gryson (2010) [91] vo svojej práci taktiež potvrdil, že mnohé procesy spracovania potravín vedú k degradácii DNA na menšie fragmenty. PCR s templátovou DNA izolovanou z takýchto matríc je napriek fragmentácii možná, avšak výsledky môžu byť ovplyvnené, rovnako aj metóda extrakcie takejto DNA.

Možno tiež predpokladať prítomnosť inhibítorov PCR koextrahovaných s DNA v niektorých tepelne upravených potravinách, ako je vidieť napríklad pri DNA z paradajkového pretlaku OTMA, ktorá sa opakovane amplifikovala lepšie pri desaťnásobnom riedení ako pri neriedenej DNA. Riedením mohlo dôjsť práve k zníženiu koncentrácie inhibítorov PCR a zároveň množstvo DNA pre amplifikáciu bolo stále postačujúce. Pri spracovaných paradajkových výrobkoch sa o niečo lepšie amplifikoval kratší úsek DNA (s použitím primerov F a R 26 S pre 220 bp produkt) oproti dlhšiemu, 700 bp úseku, čo taktiež môže svedčiť o degradácii izolovanej DNA vplyvom potravinárskeho spracovania.

4.4.3 Vplyv použitia PCR enhanceru na amplifikovateľnosť izolovanej DNA

Porovnaním výsledkov agarózovej gélovej elektroforézy špecifických produktov PCR s použitím enhanceru s ostatnými výsledkami bez použitia enhanceru v zmesiach pre PCR sme zistili, že s prídavkom enhanceru sa zvýšila intenzita detegovaných amplikónov a zároveň sa zvýšil aj počet DNA, pri ktorých sa po amplifikácii objavil viditeľný amplikón. Napríklad pre neriedené DNA izolované z paradajkového pretlaku OTMA sa nám bez prídavku enhanceru doposiaľ nepodarilo gélovou elektroforézou detegovať žiadny špecifický PCR produkt, na základe čoho sme predpokladali prítomnosť inhibítorov PCR. S použitím enhanceru bol opakovane detegovaný amplikón po amplifikácii neriedenej DNA z paradajkového pretlaku OTMA. Na základe uvedených výsledkov predpokladáme prítomnosť inhibítorov PCR a význam použitia PCR enhanceru pre lepšiu amplifikovateľnosť izolovanej DNA za daných podmienok.

4.4.4 Vplyv prezrážania vyizolovanej DNA na jej kvalitu

Ako možno vidieť z tabuliek 9, 10 a 11, koncentrácie izolovanej DNA boli pred prezrážaním etanolom o niečo nižšie v porovnaní s hodnotami koncentrácií po prezrážaní. Avšak porovnaním parametrov čistoty, prípadne absorbčných kriviek na Obrázkoch 14 a 15 možno pozorovať rozdiely v čistote zakoncentrovanej DNA oproti pôvodným izolátom. Procesom prezrážania sa teda mierne zvýšila koncentrácia DNA izolovanej z paradajkového

pretlaku OTMA a domáceho kečupu (Obrázok 10). Za daných okolností amplifikovateľnosť pomocou PCR nebola overená. Pre porovnanie so štandardnou metódou izolácie bola tiež zmeraná koncentrácia DNA pozitívnej kontroly z *B. oleracea* o koncentrácii 10 ng/μl (Obrázok 19), u ktorej možno vidieť priebeh absorpčnej krivky DNA vysokej čistoty.

Ako je zrejmé z hodnôt koncentrácií v Tabuľkách 5, 6 a 7 v kapitole 4.3.1, postup prezrážania DNA izopropanolom (podobne ako etanolom) nijakým výrazným spôsobom nepomohol DNA zakonzentrovat'. Hodnoty koncentrácií boli po prezrážaní v niektorých prípadoch ešte nižšie, ako v pôvodnom izoláte. Tento jav by mohol byť spôsobený vysokými stratami pri jednotlivých pracovných úkonoch, k čomu by do určitej miery mohol prispievať aj charakter výrobku použitého pre izoláciu DNA.

Špecifické produkty PCR boli nanesené na agarózový gél (Obrázok 21), na ktorom bol len jediný výrazný amplikón pre pozitívnu kontrolu. Na základe takéhoto výsledku predpokladáme, že uvedená DNA sa neamplifikovala, pravdepodobne kvôli nedostatočnej čistote. Z homogenátov výrobkov pripravených vo vode sa pravdepodobne vo väčšej miere koextrahujú inhibítory PCR (polyfenoly, proteíny, polysacharidy a pod.) z rastlinného materiálu. Mnohí autori tiež overili, že inhibítory PCR môžu byť do vzoriek vnesené aj v procese manipulácie s DNA, vrátane jej izolácie a purifikácie. (Katcher a Schwartz, 1994 [95]; Burkardt, 2000 [96]; Peist et al., 2001 [68]; Demeke a Jenkins, 2010 [72]). V práci Schardera a kol. (2012) [60] boli tiež ako jedny z možných inhibítorov PCR popísané aj alkoholy, predovšetkým etanol a izopropanol, ktoré v zbytkových množstvách vo vzorke môžu tiež spôsobiť inhibíciu PCR.

4.4.5 Vplyv skladovania na amplifikovateľnosť DNA

Koncentrácia DNA bola stanovená meraním absorbancie pri vlnovej dĺžke 260 nm. Vysoké hodnoty absorbancie pri určitých vlnových dĺžkach, či určité hodnoty ich pomerov značia prítomnosť príslušných znečisťujúcich látok, akými sú napríklad proteíny, či RNA. Ako je zrejmé z Tabuľky 9, hodnota $A_{260\text{nm}/280\text{nm}}$ bola 1,45 pri DNA izolovanej z paradajkového pretlaku OTMA a 1,38 zo zemiakových lupienkov. To vypovedá o prítomnosti určitého množstva proteínov, ktoré v priebehu izolácie DNA neboli odseparované. Prítomnosť proteínov v izoláte DNA by počas skladovania mohla spôsobiť degradáciu DNA (v závislosti na charaktere prítomných proteínov), čo by mohlo mať vplyv na jej amplifikovateľnosť. Z hodnôt pomeru absorbancií $A_{260\text{nm}/230\text{nm}}$ zrejme taktiež vyplýva, že fenolické látky v DNA sú prítomné a neboli v priebehu procesu izolácie úspešne eliminované. Koncentrácia DNA 12,1 ng/μl (paradajkový pretlak OTMA) a 16,0 ng/μl (zemiakové lupienky) je nízka, pre potrebu PCR je ale postačujúca. To sa potvrdilo gélovou elektroforézou produktov PCR, nakoľko amplikóny boli detegované, PCR teda prebehla, ale produkty PCR neboli príliš výrazné v dôsledku nízkej počiatočnej koncentrácie, prípadne v dôsledku prítomnosti inhibítorov PCR (Obrázok 23 a 24). Možno predpokladať, že i počas izolácie došlo k stratám DNA, ktorých obmedzením by sme mohli koncentráciu DNA v izoláte zvýšiť.

Prítomnosťou výrazného amplikónu pre pozitívnu kontrolu v oblasti 700 bp a zároveň jeho absenciou pre kontrolu negatívnu sme potvrdili správnosť výsledkov PCR. Pri zemiakových lupienkoch došlo k amplifikácii a následnej detekcii produktu PCR len po

amplifikácii neriedenej DNA, kde bola koncentrácia DNA najvyššia. V riedených vzorkách pravdepodobne množstvo DNA nebolo postačujúce pre priebeh reakcie, čo malo za následok absenciu produktu PCR na agarózovom géli.

Pri paradajkovom pretlaku OTMA PCR produkt nebol detegovaný pri amplifikácii neriedenej DNA, ale ani pri 100-násobnom riedení. Možno teda usúdiť, že optimálnym riedením bolo riedenie 10-krát, kedy koncentrácia DNA bola ešte postačujúca ako templát pre PCR, ale zároveň sa zriedila koncentrácia niektorých látok koextrahovaných s DNA (inhibitory PCR), ktoré mohli potenciálne priebeh PCR narušiť.

Skladovanie, ako izolovanej DNA, tak aj homogenátu v lyzačnom roztoku s CTAB pri -20 °C po dobu 7 mesiacov, nemalo vplyv na amplifikáciu špecifického úseku DNA v PCR. Platí to pre DNA izolovanú z paradajkového pretlaku OTMA aj zemiakových lupienkov.

4.4.6 Amplifikácia špecifického produktu PCR z kontrolnej DNA *Brasica oleracea* o rôznych koncentráciách.

Pre kontrolu komponentov boli pre PCR použité ako nové, tak aj staré komponenty, vrátane DNA polymerázy, pričom v oboch prípadoch sme dospeli k rovnakému výsledku. Optimálne množstvá DNA pre použitie za účelom amplifikácie boli 20 ng a 2 ng. Pri 0,2 ng bola DNA ešte stále amplifikovateľná (koncentrácia bola postačujúca), aj keď amplicón nebol príliš výrazný. Posledné riedenie (20 pg) sa však už neamplifikovalo tak, aby bol amplicón detegovaný.

Tieto výsledky tiež naznačujú, že vo vzorkách DNA z potravinársky spracovaných zeleninových výrobkov dochádza k problémom s amplifikáciou nielen kvôli nízkym koncentráciám DNA, ale pravdepodobne aj kvôli jej znečisteniu, prípadne degradácii DNA. Pri použití pozitívnej kontroly z *B. oleracea* sa totiž za vzniku intenzívneho produktu PCR amplifikovala aj DNA v množstve 0,2 ng, čo je koncentrácia značne nižšia, ako koncentrácie DNA, ktoré sa nám podarilo izolovať zo spracovaných výrobkov.

4.4.7 Porovnanie vplyvu rôznych magnetických častíc na kvalitu a množstvo izolovanej DNA

Z uvedených výsledkov vyplýva, že izolácia DNA pomocou magnetického porézneho skla nie je tak efektívna, ako ostatnými testovanými časticami (HPS B-M-NH₂, a P(HEMA-co-GMA)). Koncentrácie DNA získané pomocou magnetického porézneho skla neboli väčšinou omnoho nižšie, než pri použití ostatných typov magnetických častíc.

Obrázok 30 čiastočne poukazuje na rozdiely v koncentrácii a čistote DNA izolovanej jednotlivými časticami, a to pre každý potravinársky produkt samostatne, kde u každého, až na výnimku zrelého plodu paradajky, je absorpčná krivka DNA izolovanej magnetickým poréznym sklom najspodnejšou zo všetkých troch.

V absorpčných spektrách pre všetky častice môžeme tiež pozorovať posun maxima píku absorpčných kriviek smerom k vyšším vlnovým dĺžkam, čo je dané znečistením proteínmi. Okrem proteínov je zrejme pomerne výrazné aj znečistenie fenolovými látkami. Prítomnosť proteínov by mohla mať za následok zhoršenie skladovateľnosti izolovanej DNA, nakoľko by mohlo dochádzať k enzymatickému rozkladu DNA, v závislosti od charakteru prítomných proteínov.

Ako vyplýva z Obrázkov 31 a 32, výsledky gélovej elektroforézy potvrdili amplifikovateľnosť DNA izolovanej pomocou častíc HPS B-M-NH₂ a P(HEMA-co-GMA). Metódy izolácie využívajúce adsorpciu DNA na pevnú fázu teda poskytujú DNA o postačujúcej koncentrácii pre potreby PCR a sú pre tento účel vhodné. Izoláciou DNA pomocou magnetického porézneho skla sa nám nepodarilo za daných podmienok dosiahnuť postačujúce množstvo izolovanej DNA pre amplifikáciu. Výnimkou bola len DNA izolovaná z paradajkového listu, ktorá sa amplifikovala možno vďaka väčšiemu množstvu DNA. Na základe tohto výsledku môžeme potvrdiť obsah znečisťujúcich látok v izolovanej DNA, ktoré môžu ovplyvňovať amplifikáciu DNA, či samotné stanovenie koncentrácie DNA. Stanovenie koncentrácie DNA ovplyvňujú predovšetkým fenoly a proteíny, pretože absorbujú v oblasti UV žiarenia. Hodnoty absorbančie týchto látok sa prekrývajú s hodnotami absorbančie DNA, preto stanovenie koncentrácie DNA z hodnôt $A_{260\text{nm}}$ nemusí byť presné.

5 ZÁVER

Mikrometódou s využitím 3 typov magnetických nosičov je možné izolovať DNA z vybraných potravinárskych výrobkov, ktorými boli paradajkový pretlak OTMA, kečup OTMA a kečup domáci. Táto metóda rýchlo, lacno a jednoducho poskytla DNA v kvalite vhodnej pre využitie v PCR. Optimálny postup izolácie bol nasledovný. Približne 0,7 g potravinovej vzorky bolo homogenizovanej kopistom v Eppendorfovej skúmavke za chladu v mrazenom kovovom bloku s prídavkom 500 μ l činidla s CTAB a 1 μ l merkptoetanolu. Dôkladne homogenizovaný materiál bol inkubovaný v termostate pri teplote 60 °C po dobu 30 minút. Po inkubácii boli vzorky odstredené pri 14500 ot./10 min. 100 μ l supernatantu homogenátu, spolu so 400 μ l 40 % PEG 6000 (výsledná koncentrácia bola 16 %), 400 μ l 5 M NaCl a 100 μ l magnetických častíc o koncentrácii 2 mg/ml, bolo použitých do separačnej zmesi pre izoláciu DNA. DNA bola eluovaná do 100 μ l TE pufru 1 hodinu pri laboratórnej teplote a následne umiestnená do chladničky do druhého dňa.

Boli zaznamenané rozdiely v množstve a kvalite izolovanej DNA, v závislosti od použitých magnetických nosičov a typu analyzovanej vzorky. Ako najvhodnejšie sa ukázali častice P(HEMA-co-GMA) a HPS B-M-NH₂, kde v oboch prípadoch bola izolovaná DNA v kvalite pre PCR. Magnetické porézne sklo bolo pre izoláciu DNA z daného typu matrice menej vhodné.

Vyššie koncentrácie amplifikovateľnej DNA boli dosiahnuté hlavne pri čerstvých produktoch (paradajkové listy, zrelé a nezrelé plody), oproti produktom potravinársky spracovaným (paradajkovým pretlak OTMA, domáci kečup a kečup OTMA). Potvrdil sa vplyv spracovania výrobku na kvalitu DNA.

Intenzívnejšie produkty PCR bli detegované pri amplifikácii kratšieho úseku izolovanej DNA (220bp), s použitím primerov F 26 S a R 26 S, v porovnaní s dlhším, 700 bp úsekom, pre ktorý boli použité primery F 5,8 S a R 18 S. Tento výsledok potvrdzuje degradáciu molekúl DNA vplyvom tepelnej úpravy výrobkov.

Pri niektorých vzorkách DNA, najmä pri paradajkovom pretlaku OTMA sa potvrdila koextrakcia inhibítorov PCR, nakoľko bola izolovaná DNA opakovane lepšie amplifikovateľná až po vyrierdení. Potvrdil sa aj vplyv použitia PCR enhanceru na amplifikovateľnosť izolovanej DNA.

Zistené minimálne množstvo kontrolnej DNA *Brasica oleracea* použité v PCR pre detekciu produktu agarózovou gélovou elektroforézou bolo 0,2 ng.

6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] A. M. SYED, G. M. MASOOD, Q. H. PERVAIZ, V. VIJESHVER, B. F. SEEMI and Q. N. GHULUM, "Rapid DNA isolation protocol for angiospermic plants," *Bulgarian journal of plant physiology*, vol. 30, no. 2, pp. 25-33, 2004.
- [2] S. P. S. KHANUJA, A. K. SHASANY, M. P. DAROKAR and S. KUMAR, "Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils," *Plant molecular biology reporter*, vol. 17, no. 1, p. 74–81, 1999.
- [3] S. K. SAHU, M. THANGARAJ and K. KATHIRESAN, "DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol," *Molecular biology*, vol. 6, no. 4, 2012.
- [4] D. WARUDE, P. CHAVAN, K. JOSHI and B. PATWARDHAN, "DNA isolation from fresh, dry plant samples with highly acidic tissue extracts," *Plant molecular biology reporter*, vol. 21, no. 4, p. 467–467, 2003.
- [5] A. DEHESTANI and S. K. KAZEMI TABAR, "A Rapid Efficient Method for DNA Isolation from Plants with High Levels of Secondary Metabolites," *Asian Journal of Plant Science*, vol. 6, no. 6, pp. 977-981, 2007.
- [6] R. A. RIBEIRO and M. B. LOVATO, "Comparative analysis of different DNA extraction protocols in fresh and herbarium specimens of the genus *Dalbergia*," *Genetics and molecular research : GMR*, vol. 6, no. 1, pp. 173-187, 2007.
- [7] D. G. PETERSON, K. S. BOEHM and S. M. STACK, "Isolation of milligram quantities of nuclear DNA from tomato (*Lycopersicon esculentum*), A plant containing high levels of polyphenolic compounds," *Plant Molecular Biology Reporter*, vol. 15, no. 2, p. 148–153, 1997.
- [8] D. GOLDENBERGER, I. PERSCHIL, M. RITZLE and M. ALTWEGG, "A Simple "Universal" DNA Extraction Procedure Using SDS and Proteinase K Is Compatible with Direct PCR Amplification," *Genome research*, vol. 4, no. 6, pp. 368-370, 1995.
- [9] K. K. VINOD, "Total genomic dna extraction quality check and quantitation," in *Proceedings of the training programme on "Classical and modern plant breeding techniques – A hands on training"*, Coimbatore, 2004.
- [10] W. W. GORDY and R. M. NAKAMURA, *Molecular Diagnostics Techniques and Applications for the Clinical Laboratory*, 1. ed., Burlington: Elsevier, 2009.
- [11] M. R. ADAMS and M. J. R. NOUT, *Fermentation and food safety*, 1. ed., Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc., 2001.
- [12] K. S. KIRBY , "A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids: evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acid and protein," *The Biochemical*

Journal, vol. 66, no. 3, pp. 495-504, 1957.

- [13] D. BOWTELL and J. SAMBROOK, *DNA Microarrays: A molecular cloning Manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003.
- [14] B. S. BHAU, G. GOGOI, D. BARUAH, R. AHMED, G. HAZARIKA, B. BORAH, B. GOGOI, D. K. SARMAH, S. C. NATH and S. B. WANN, "Development of an effective and efficient DNA isolation method for *Cinnamomum* species," *Food chemistry*, vol. 188, p. 264–270, 2015.
- [15] V. V. VASILEVSKAYA, A. R. KHOKHLOV, Y. MATSUZAWA and K. YOSHIKAWA, "Collapse of single DNA molecule in poly(ethylene glycol) solutions," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 102, no. 16, pp. 6595-6602, 1995.
- [16] "Medical Genomics," 2016. [Online]. Available: <http://www.medicinalgenomics.com/purificationkit/>. [Accessed 05 04 2017].
- [17] D. HORÁK, B. RITTICH and A. ŠPANOVÁ, "Carboxyl-functionalized magnetic microparticle carrier for isolation and identification of DNA in dairy products," *Journal of magnetism and magnetic materials*, vol. 311, no. 1, p. 249–254, 2007.
- [18] K. AGUILAR-ARTEAGA, J. A. RODRIGUEZ and E. BARRADO, "Magnetic solids in analytical chemistry: A review," *Analytica chimica acta*, vol. 674, no. 2, pp. 157-165, 2010.
- [19] Z. M. SAIYED, C. BOCHIWAL, H. GORASIA, S. D. TELANG and C. N. RAMCHAND, "Application of magnetic particles (Fe₃O₄) for isolation of genomic DNA from mammalian cells," *Analytical biochemistry*, vol. 356, no. 2, pp. 306-308, 2006.
- [20] C. BERGEMANN, D. MÜLLER-SCHULTE, J. OSTER, L. À. BRASSARD and A. S. LÜBBE, "Magnetic ion-exchange nano- and microparticles for medical, biochemical and molecular biological applications," *Journal of magnetism and magnetic materials*, vol. 194, no. 1–3, p. 45–52, 1999.
- [21] A. K. GUPTA and M. GUPTA, "Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications," *Biomaterials*, vol. 26, no. 18, pp. 3995-4021, 2005.
- [22] D. HORÁK, M. BABIČ, H. MACKOVÁ and M. J. BENEŠ, "Preparation and properties of magnetic nano- and microsized particles for biological and environmental separations," *Journal of separation science*, vol. 30, no. 11, pp. 1751-1772, 2007.
- [23] A. ŠPANOVÁ, B. RITTICH, M. J. BENEŠ and D. HORÁK, "Ferrite supports for isolation of DNA from complex samples and polymerase chain reaction amplification," *Journal of chromatography. A*, vol. 1080, no. 1, pp. 93-98, 2005.
- [24] P. TARTAJ, M. P. MORALES, T. GONZÁLEZ-CARREÑO, S. VEINTEMILLAS-VERDAGUER and C. J. SERNA, "Advances in magnetic nanoparticles for

- biotechnology applications," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 290–291, p. 28–34, 2005.
- [25] B. RITTICH, A. ŠPANOVÁ, D. HORÁK, M. J. BENEŠ, L. KLESNILOVÁ, K. PETROVÁ and A. RYBNÍKÁŘ, "Isolation of microbial DNA by newly designed magnetic particles," *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, vol. 52, no. 2, p. 143–148, 2006.
- [26] M. A. M. GIJS, "Magnetic bead handling on-chip: new opportunities for analytical applications," *Microfluidics and nanofluidics*, vol. 1, no. 1, p. 22–40, 2004.
- [27] D. HORÁK and N. BENEDYK, "Magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres prepared by dispersion polymerization in the presence of electrostatically stabilized ferrofluids," *Journal of polymer science. Part A-1, Polymer chemistry*, vol. 42, no. 22, p. 5827–5837, 2004.
- [28] S. C. MCBAIN, H. H. P. YIU and J. DOBSON, "Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery," *International journal of nanomedicine*, vol. 3, no. 2, p. 169–180, 2008.
- [29] I.-M. HSING, Y. XU and W. ZHAO, "Micro- and Nano- Magnetic Particles for Applications in Biosensing," *Electroanalysis*, vol. 19, no. 7-8, p. 755–768, 2007.
- [30] I. ŠAFAŘÍK and M. ŠAFAŘÍKOVÁ, "Use of magnetic techniques for the isolation of cells," *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, vol. 722, no. 1-2, pp. 33-53, 1999.
- [31] S. LAURENT, D. FORGE, M. PORT, A. ROCH, C. ROBIC, L. VANDER ELST and R. N. MULLER, "Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications," *Chemical reviews*, vol. 110, no. 4, p. 2064–2110, 2010.
- [32] J. W. M. BULTE and D. L. KRAITCHMAN, "Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging," *NMR in biomedicine*, vol. 17, no. 7, p. 484 – 499, 2004.
- [33] Z. MA and H. LIU, "Synthesis and surface modification of magnetic particles for application in biotechnology and biomedicine," *Bioconjugate chemistry*, vol. 15, no. 2, pp. 394-401, 2004.
- [34] A.-H. LU, E. L. SALABAS and F. SCHÜTH, "Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application," *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, vol. 46, no. 8, p. 1222–1244, 2007.
- [35] C. C. BERRY and A. S. G. CURTIS, "Functionalisation of magnetic nanoparticles for application in biomedicine," *Journal of physics D: Applied physics*, vol. 36, no. 13, p. 198 – 206, 2003.
- [36] E. E. HASSAN, R. C. PARISH and J. M. GALLO, "Optimized Formulation of Magnetic Chitosan Microspheres Containing the Anticancer Agent, Oxantrazole,"

- Pharmaceutical Research*, vol. 9, no. 3, pp. 390-397, 1992.
- [37] K. G. PAUL, T. B. FRIGO, J. Y. GROMAN and E. V. GROMAN, "Synthesis of Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxides Using Reduced Polysaccharides," *Bioconjugate chemistry*, vol. 15, no. 2, pp. 394-401, 2004.
- [38] V. VEIGA, D. H. RYAN, E. SOURTY, F. LLANES and R. H. MARCHESSAULT, "Formation and characterization of superparamagnetic cross-linked high amylose starch," *Carbohydrate polymers*, vol. 42, no. 4, p. 353–357, 2000.
- [39] S. A. GÓMEZ-LOPERA, R. C. PLAZA and A. V. DELGADO , "Synthesis and Characterization of Spherical Magnetite/Biodegradable Polymer Composite Particles," *Journal of colloid and interface science*, vol. 240, no. 1, pp. 40-47, 2001.
- [40] W. WU, Q. HE and C. JIANG, "Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies," *Nanoscale research letters*, vol. 3, no. 11, p. 397–415, 2008.
- [41] T. L. HAWKINS, T. O'CONNOR-MORIN, A. ROY and C. SANTILLAN, "DNA purification and isolation using a solid-phase.," *Nucleic acids research*, vol. 22, no. 21, p. 4543–4544, 1994.
- [42] T. R. SARKAR and J. IRUDAYARAJ, "Carboxyl-coated magnetic nanoparticles for mRNA isolation and extraction of supercoiled plasmid DNA.," *Analytical biochemistry*, vol. 379, no. 1, pp. 130-132, 2008.
- [43] V. B. TEIF and K. BOHINC, "Condensed DNA: Condensing the concepts," *Progress in biophysics and molecular biology*, vol. 105, no. 3, pp. 208-222, 2011.
- [44] J. LEE and J. H. CHANG, "Magnetic DNA separation process with functionalized magnetic silica nanoparticles Proc. SPIE 7270, in Biomedical Applications of Micro- and Nanoengineering IV and Complex Systems, 72701C," *Proceedings of SPIE*, vol. 7270, 2008.
- [45] M. M. RAHMAN and A. ELAISSARI, "Temperature and magnetic dual responsive microparticles for DNA separation," *Separation and purification technology*, vol. 81, no. 3, p. 286–294, 2011.
- [46] T. RAMANATHAN, F. T. FISHER, R. S. Ruoff and L. C. BRINSON, "Amino-Functionalized Carbon Nanotubes for Binding to Polymers and Biological Systems," *Chemistry of materials : a publication of the American Chemical Society*, vol. 17, no. 6, p. 1290–1295, 2005.
- [47] C. YANG, Y. GUAN, J. XING and H. LIU, "Surface Functionalization and Characterization of Magnetic Polystyrene Microbeads," *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, vol. 24, no. 16, p. 9006–9010, 2008.
- [48] B. KRÁLOVÁ, L. FUKAL, P. RAUCH and T. RUMIL, *Bioanalytické metody*, 3. ed., Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, p. 254.

- [49] J. M. WALKER and R. RAPLEY, *Molecular biotechnology handbook*, 2. ed., Totowa: Humana Press, 2008.
- [50] N. BERMINGHAM and K. LUETTICH, "Polymerase chain reaction and its applications," *Current Diagnostic Pathology*, vol. 9, no. 3, p. 159–164, 2003.
- [51] S. ROSYPAL, J. DOŠKAŘ, K. PETRZIK and V. RŮŽIČKOVÁ, *Úvod do molekulární biologie. Díl IV. Molekulární biologie rostlinných virů, priony, molekulární evoluce, vznik života, metody molekulární biologie, genové inženýrství*, 3. ed., Brno: Grafex, 2002, p. 300.
- [52] "Thermo Fischer Scientific," 2016. [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-cycling-considerations.html>. [Accessed 05 04 2017].
- [53] "Your Genome," 26 02 2017. [Online]. Available: <http://www.yourgenome.org/facts/what-is-pcr-polymerase-chain-reaction>. [Accessed 05 04 2017].
- [54] T. A. BROWN, *Klonování genů a analýza DNA*, 1. české vyd. v Olomouci, Univerzita Palackého v Olomouci, 2007.
- [55] "DNA polymerázy," Top Bio, [Online]. Available: <http://www.topbio.cz/>. [Accessed 05 04 2017].
- [56] J. M. WALKER, *Molecular Biology and Biotechnology*, 4. ed., Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2000, p. 563.
- [57] A. ŠPANOVÁ and B. RITTICH, *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*, 1. ed., Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010, p. 86.
- [58] P. WARD and D. ROY, "Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria," *Dairy science & technology*, vol. 85, no. 1-2, pp. 23-32, 2005.
- [59] W. ABU AL-SOUD and P. RÅDSTRÖM, "Capacity of Nine Thermostable DNA Polymerases To Mediate DNA Amplification in the Presence of PCR-Inhibiting Samples," *Applied and environmental microbiology*, vol. 64, no. 10, p. 3748–3753, 1998.
- [60] C. SCHRADER, A. SCHIELKE, L. ELLERBROEK and R. JOHN, "PCR inhibitors - occurrence, properties and removal," *Journal of applied microbiology*, vol. 113, no. 5, pp. 1014-1026, 2012.
- [61] I. G. WILSON, "Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification," *Applied and environmental microbiology*, vol. 63, no. 10, p. 3741 – 3751, 1997.

- [62] J. F. HUGGETT, T. NOVAK, J. A. GARSON, C. GREEN, S. D. MORRIS-JONES, R. F. MILLER and A. ZUMLA, "Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon," *BMC research notes*, vol. 1, no. 70, 2008.
- [63] H. A. POWELL, C. M. GOODING, S. D. GARRETT, B. M. LUND and R. A. McKEE, "Protease inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction," *Letters in applied microbiology*, vol. 18, no. 1, p. 59–61, 1994.
- [64] M. ABBASZADEGAN, P. STEWART and M. LECHEVALLIER, "A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR," *Applied and environmental microbiology*, vol. 65, no. 2, p. 444–449, 1999.
- [65] D. P. CHANDLER, C. A. WAGNON and H. BOLTON, "Reverse transcriptase (RT) inhibition of PCR at low concentrations of template and its implications for quantitative RT-PCR," *Applied and environmental microbiology*, vol. 64, no. 2, p. 669–677, 1998.
- [66] L. ROSSEN, P. NORSKOV, K. HOLMSTROM and O. F. RASMUSSEN, "Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions," *International journal of food microbiology*, vol. 17, no. 1, p. 37–45, 1992.
- [67] K. L. OPEL, D. CHUNG and B. R. McCORD, "A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR," *Journal of forensic sciences*, vol. 55, no. 1, pp. 25-33, 2010.
- [68] R. PEIST, D. HONSEL, G. TWIELING and D. LÖFFERT, "PCR inhibitors in plant DNA preparations," *QIAGEN News*, vol. 3, p. 7–9, 2001.
- [69] T. WEI, G. LU and G. CLOVER, "Novel approaches to mitigate primer interaction and eliminate inhibitors in multiplex PCR, demonstrated using an assay for detection of three strawberry viruses," *Journal of virological methods*, vol. 151, no. 1, pp. 132-139, 2008.
- [70] E. ANKLAM, F. GADANI, P. HEINZE, H. PIJNENBURG and G. VAN DEN EEDE, "Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products," *European Food Research and Technology*, vol. 214, no. 1, p. 3–26, 2002.
- [71] R. S. WEYANT, P. EDMONDS and B. SWAMINATHAN, "Effect of ionic and nonionic detergents on the Taq polymerase," *BioTechniques*, vol. 9, p. 308–309, 1990.
- [72] T. DEMEKE and G. R. JENKINS, "Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits," *Applied and environmental microbiology*, vol. 396, no. 2, p. 1977–1990, 2010.
- [73] S. BUTOT, T. PUTALLAZ, C. CROQUET, G. LAMOTHE, R. MEYER, H. JOOSTEN and G. SANCHEZ, "Attachment of enteric viruses to bottles," *Applied and environmental microbiology*, vol. 73, no. 16, p. 5104–5110, 2007.

- [74] D. H. FOX, C. K. HUANG, J. DU, T. Y. CHANG and Q. PAN, "Profound inhibition of the PCR step of CF V3 multiplex PCR/OLA assay by the use of UV-irradiated plastic reaction tubes," *Diagnostic molecular pathology: the American journal of surgical pathology, part B*, vol. 16, no. 2, p. 121–123, 2007.
- [75] B. GASSILLOUD, L. HUGUET, A. MAUL and C. GANTZER , "Development of a viral concentration method for bottled water stored in hydrophobic support," *Journal of virological methods*, vol. 142, no. 1-2, p. 98–104, 2007.
- [76] A. GONZALES, R. GRIMES, E. J. WALSH, T. DALTON and M. DAVIES, "Interaction of quantitative PCR components with polymeric surfaces," *Biomedical microdevices*, vol. 9, no. 2, p. 261–266, 2007.
- [77] R. M. WADOWSKY, S. LAUS, T. LIBERT, S. J. STATES and G. D. EHRLICH, "Inhibition of PCR-based assay for Bordetella pertussis by using calcium alginate fiber and aluminum shaft components of a nasopharyngeal swab," *Journal of clinical microbiology*, vol. 32, no. 4, p. 1054–1057, 1994.
- [78] O. ROP, P. VALÁŠEK and I. HOZA, Teoretické principy konzervace potravin I Hlavní konzervářenské suroviny, 1. ed., Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005, p. 130.
- [79] J. VELÍŠEK, Chemie potravin II., 2. ed., Tábor: OSSIS, 2002, p. 320.
- [80] I. INGR, Základy konzervace, 3. ed., Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2007, p. 119.
- [81] M. DRDÁK, Technológia rastlinných neúdržných potravin, 1. ed., Bratislava: Alfa, 1989, p. 301.
- [82] S. SMOLEŇ, J. WIERZBIŃSKA, W. SADY, A. KOŁTON, A. WISZNIEWSKA and M. LISZKA-SKOCZYLAŚ, "Iodine biofortification with additional application of salicylic acid affects yield and selected parameters of chemical composition of tomato fruits (*Solanum lycopersicum* L.)," *Scientia Horticulturae*, vol. 188, no. 4, p. 89–96, 2015.
- [83] J. VELÍŠEK, Chemie potravin III, 2. ed., Tábor: OSSIS, 2002, p. 368.
- [84] Z. VODRÁŽKA, Biochemie, 2. ed., Praha: Academia, 1996.
- [85] D. K. a. k. ŠAPIRO, Ovoce a zelenina ve výživě člověka, Praha: SZN, 1988, p. 232.
- [86] V. SCHULZOVÁ, J. HAJŠLOVÁ and P. BOTKET, "Nové poznatky v oblasti hodnocení kvality produktů ekologického zemědělství," 31 01 2006. [Online]. Available: http://www.phytosanitary.org/projekty/2005/VVF_06_2005.pdf. [Accessed 29 03 2017].
- [87] E. PEKÁRKOVÁ, Pěstujeme rajčata, papriky a další plodové zeleniny, 1. ed., Praha: Grada Publishing, 2001, p. 72.

- [88] P. KADLEC, K. MELZOCH and M. VOLDŘICH, *Technologie potravin*, Ostrava: KEY Publishing, 2009.
- [89] T. Jos, "Tomato Paste Processing," 03 09 2014. [Online]. Available: <http://www.tomatojos.net/08-tomato-paste-processing/>. [Accessed 23 04 2017].
- [90] CFT, "Cold and Hot Break Tomato Paste Lines," [Online]. Available: http://www.cft-group.com/download_cold_break_tomato_line.pdf?h=887e1854aa2d004ddd4c49c1a2888b507a07c871. [Accessed 23 04 2017].
- [91] N. GRYSON, "Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 396, no. 6, pp. 2003-2022, 2010.
- [92] M. KHARAZMI, T. BAUER, W. P. HAMMES and C. HERTEL, "Effect of Food Processing on the Fate of DNA with Regard to Degradation and Transformation Capability in *Bacillus subtilis*," *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 26, no. 4, pp. 495-501, 2003.
- [93] F. DEBODE, E. JANSSEN and G. BERBEN, "Physical degradation of genomic DNA of soybean flours does not impair relative quantification of its transgenic content," *European Food Research and Technology*, vol. 226, no. 1-2, pp. 273-280, 2007.
- [94] C. HUPFER, C., H. HOTZEL, K. SACHSE and K. H. ENGEL, "Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction," *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung. A, Food research and technology*, vol. 206, no. 3, pp. 203-207, 1998.
- [95] H. L. KATCHER and I. SCHWARTZ, "A distinctive property of Tth DNA polymerase: enzymatic amplification in the presence of phenol," *BioTechniques*, vol. 16, no. 1, p. 84-92, 1994.
- [96] H. J. BURKARDT, "Standardization and quality control of PCR analyses," *Clinical chemistry and laboratory medicine*, vol. 38, no. 2, p. 87-91, 2000.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A ZNAČIEK

bp	páry bazí (z angl. base pairs)
CTAB	cetyl trimetylamónium bromid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	2'-deoxyribonukleotid-5'-trifosfát
dsDNA	dvojvláknová DNA (z angl. double-stranded DNA)
EDTA	etyléndiamíntetraoctová kyselina
EtBr	etídium bromid
HPS B-M-NH ₂	poly(styrén-co-divinylbenzén) – hypersieťované mikročastice
MPG	magnetické porézne sklo (z angl. magnetic porous glass)
P(HEMA-co-GMA)	poly(hydroxyethylmethakrylát-co-glycidylmethakrylát)
PCR	polymerázová reťazová reakcia (z angl. polymerase chain reaction)
PEG	polyetylénglykol
PLA	poly(mliečna) kyselina (z angl. polylactic acid)
PMMA	polymetylmetakrylát
PS	polystyrén
PVA	polyvinylalkohol
PVP	polyvinylpyrrolidón
RNA	ribonukleová kyselina
RT-PCR	spätná polymerázová reťazová reakcia (z angl. reverse transcription polymerase chain reaction)
SDS	dodecylsulfát sodný
SEM	skenovacia elektrónová mikroskopia (z angl. scanning electron microscopy)
ssDNA	jednovláknová DNA (z angl. single-stranded DNA)
TBE	tris-borát-EDTA
TE	tris-EDTA
TMA	tetrametyl amónium