

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2017

Bc. Lucie Ráčková



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 NANO- A MIKRO ČÁSTIC PŘI IZOLACI DNA Z VYBRANÝCH DRUHŮ POTRAVIN

THE APPLICATION OF MAGNETIC NANO- AND MICROPARTICLES FOR THE ISOLATION OF DNA FROM
SELECTED FOODS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Lucie Ráčková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Aleš Kovařík, CSc.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1060/2016
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Lucie Ráčková**
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 nano- a mikro částic při izolaci DNA z vybraných druhů potravin

Zadání diplomové práce:

1. Vyhledání a kritické zpracování dostupné literatury k dané problematice.
2. Izolace DNA z vybraných potravin rostlinného původu.
3. Ověření kvality izolované DNA.
4. Zpracování získaných experimentálních výsledků.
5. Vyhodnocení experimentů formou diskuse.

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

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

Bc. Lucie Ráčková
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

V práci byla ověřována mikrometoda izolace rostlinné DNA z vybraných druhů zeleniny (cibule, brokolice) a potravinových výrobků v kvalitě vhodné pro konvenční polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Mikrometoda umožňuje izolaci DNA pomocí magnetických nosičů z hrubých lysátů buněk, získaných přímou homogenizací rostlinných tkání. Byly porovnávány různé způsoby zpracování homogenátů. Homogenizace probíhala v lyzačním pufru s obsahem cetyltrimethylamoniumbromidu (CTAB). Byl testován vliv organických extrakčních činidel chloroform-oktanolu a isopropanolu. Z homogenátů byla DNA purifikována reverzibilní adsorpcí na magnetické částice. Byly testovány celkem čtyři různé typy magnetických částic. U izolovaných DNA bylo provedeno spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty. Amplifikovatelnost DNA byla ověřena pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Byly použity dvě sady specifických primerů pro rostlinnou ribosomální DNA (rDNA). Produkty PCR dlouhé 700 a 220 bp byly detegovány agarózovou gelovou elektroforézou. Byly prokázány rozdíly ve výtěžku a kvalitě DNA v závislosti na způsobu zpracování homogenátů a použitých magnetických nosičích. Navržený postup s dvěma nosiči byl testován pro izolaci DNA z potravinových výrobků obsahujících rostlinný materiál (rostlinné pomazánky). DNA se amplifikovala v PCR. Mikrometoda je vhodná pro DNA analýzu potravin.

ABSTRACT

In thesis was verified micromethod for isolation of plant DNA from different vegetable (onion and broccoli) and plant food products in quality for application in polymerase chain reaction (PCR). The micromethod allows isolation DNA using magnetic particles from crude lysates of cells obtained by direct homogenization of plant tissues. Various methods of processing homogenates were compared. Homogenization was performed by lysis buffer containing cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). The effect of the organic extraction agents was tested (chloroform-octanol and isopropanol). DNA was purified from homogenates by reversible adsorption on magnetic particles (four different types of magnetic particles were tested). The quality of isolated DNA was verified by UV spectrophotometry. The amplifiability of DNA was tested by polymerase chain reaction (PCR). Specific primers for plant ribosomal DNA (rDNA) were used. PCR products of length 700 and 220 bp were detected by agarose gel electrophoresis. Differences in yield and quality of DNA were depended on the homogenate processing and magnetic particles used. The proposed procedure with two magnetic particles was tested for the isolation DNA from plant food products (spreads). DNA was amplified in PCR. Micromethod is suitable for DNA analysis of foods.

KLÍČOVÁ SLOVA

Izolace rostlinné DNA, potravinové výrobky, mikrometoda, magnetické částice, PCR

KEYWORDS

Isolation of plant DNA, food products, micromethod, magnetic particles, PCR

RÁČKOVÁ, L. *Využití magnetických nano- a mikro částic při izolaci DNA z vybraných druhů potravin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 82 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Aleš Kovařík, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce panu RNDr. Aleši Kovaříkovi, CSc. a své konzultantce paní doc. RNDr. Aleně Španové CSc. za odborné vedení, připomínky a čas, který mi věnovala.

OBSAH

1	Úvod	10
2	Teoretická část	11
2.1	Autenticita potravin	11
2.1.1	Detekce druhů rostlin	11
2.1.2	Detekce zvířecí druhů v masných výrobcích	12
2.2	Izolace rostlinné DNA	12
2.3	Magnetické nosiče	13
2.3.1	Historie magnetických nosičů	13
2.3.2	Vlastnosti	14
2.3.3	Funkcionalizace	15
2.3.4	Příprava hydrofilních neporézních magnetických nosčů	15
2.3.5	Využití a výhody této techniky	16
2.3.6	Izolace DNA pomocí magnetických částic	16
2.4	Stanovení kvality DNA a výtěžků	16
2.4.1	Gelová Elektroforéza	17
2.4.1.1	Vizualizace gelu	17
2.4.2	Spektrofotometrické stanovení nukleových kyselin	18
2.4.3	Polymerázová řetězová reakce	18
2.4.3.1	Princip	18
2.4.3.2	Komponenty pro PCR	19
2.4.4	PCR inhibitory	20
2.4.5	PCR v reálném čase	21
3	Cíl práce	22
4	Experimentální část	23
4.1	Materiál	23
4.2	Chemikálie	23
4.2.1	Magnetické nosiče	24
4.2.2	Komponenty pro PCR	24
4.3	Přístroje a pomůcky	25
4.4	Roztoky	25
4.4.1	Roztoky pro izolaci a purifikaci rostlinné DNA	26
4.4.2	Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu a vizualizaci DNA	26

4.5	Metody.....	27
4.5.1	Zpracování vzorků zeleniny.....	27
4.5.2	Lýze buněk.....	27
4.5.2.1	Běžná homogenizace s lyzačním pufrům s CTAB (1).....	27
4.5.2.2	Přídavek chloroform-oktanolu (2)	27
4.5.2.3	Přídavek isopropanolu (3).....	27
4.5.3	Izolace DNA magnetickými částicemi	28
4.5.4	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA.....	28
4.5.5	Srážení DNA ethanolem	28
4.5.6	Testování zakoncentrování DNA pomocí nosiče	29
4.5.7	Amplifikace DNA metodou PCR	29
4.5.7.1	Příprava směsi pro PCR.....	29
4.5.7.2	Provedení PCR.....	30
4.5.7.3	Agarózová gelová elektroforéza DNA a produktů PCR.....	30
5	Výsledky.....	31
5.1	Příprava rostlinného materiálu pro analýzu.....	31
5.1.1	Homogenizace	31
5.2	Izolace rostlinné DNA magnetickým nosičem P(HEMA- <i>co</i> -GMA)	32
5.2.1	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA.....	32
5.2.2	Ověření kvality izolované DNA metodou PCR.....	34
5.2.2.1	PCR s primery 18S_for a 5,8S_rev.....	34
5.2.2.2	PCR s primery 26S_for a 26S_rev.....	36
5.2.3	Ověření intaktnosti DNA.....	37
5.3	Testování DNA po dlouhodobém uchovávání	37
5.3.1	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA.....	38
5.3.2	Ověření kvality DNA metodou PCR	39
5.3.2.1	PCR s primery 18S_for a 5,8S_rev.....	39
5.3.2.2	PCR s primery 26S_for a 26S_rev.....	41
5.4	Izolace rostlinné DNA z růžičky brokolice magnetickými nosiči.....	42
5.4.1	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA.....	42
5.4.2	Ověření kvality izolované DNA metodou PCR.....	44
5.4.2.1	PCR s primery 18S_for a 5,8S_rev.....	45
5.4.2.2	PCR s primery 26S_for a 26S_rev.....	46

5.5	Izolace rostlinné DNA z bulvy cibule magnetickými nosiči.....	47
5.5.1	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA.....	47
5.5.2	Ověření kvality izolované DNA metodou PCR.....	49
5.5.2.1	PCR s primery 18S_for a 5,8S_rev.....	50
5.5.2.2	PCR s primery 26S_for a 26S_rev.....	51
5.6	Izolace rostlinné DNA z cibulové natě magnetickými nosiči	52
5.6.1	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA.....	52
5.6.2	Ověření kvality izolované DNA metodou PCR.....	54
5.6.2.1	PCR s primery 18S_for a 5,8S_rev.....	54
5.6.2.2	PCR s primery 26S_for a 26S_rev.....	55
5.7	Izolace rostlinné DNA z potravinových výrobků.....	55
5.7.1	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA.....	56
5.7.2	Ověření kvality izolované DNA metodou PCR.....	58
5.7.2.1	PCR s primery 18S_for a 5,8S_rev.....	59
5.7.2.2	PCR s primery 26S_for a 26S_rev.....	61
5.8	Ověření intaktnosti DNA.....	63
5.8.1	Izolace DNA magnetickým nosičem P(HEMA-co-GMA).....	63
5.8.2	S využitím různých druhů nosičů	63
5.8.2.1	Gelová elektroforéza.....	65
5.9	Testování různých množství DNA v separačních směsích s 8% PEG.....	66
6	Diskuze	67
6.1	Příprava rostlinného materiálu pro analýzu.....	67
6.2	Izolace rostlinné DNA magnetickým nosičem P(HEMA-co-GMA)	67
6.3	Testování DNA po dlouhodobém uchovávání	68
6.4	Izolace rostlinné DNA z růžičky brokolice magnetickými nosiči.....	68
6.5	Izolace rostlinné DNA z bulvy cibule magnetickými nosiči.....	69
6.6	Izolace rostlinné DNA z cibulové natě magnetickými nosiči	69
6.7	Izolace rostlinné DNA z potravinových výrobků.....	70
6.8	Ověření intaktnosti DNA.....	70
6.9	Testování různých množství DNA v separačních směsích s 8% PEG.....	71
7	Závěr	72
8	Seznam použitých zdrojů	73
9	Seznam použitých zkratk	80

10 Přílohy	81
-------------------------	----

1 ÚVOD

V současné době je aktuální problematika autenticity potravin. Potraviny se falšují od doby, kdy začaly být vyráběny za účelem prodeje, tudíž jsou motivovány ekonomickými zisky. Nejčastěji dochází k falšování drahých potravin (lihovin, vín, koření) nebo velkoobjemově prodávaných potravin (mléčné a masné výrobky, oleje a ovocné šťávy) [1]. Proto je kontrolováno především přesné složení potravin (obsah cukru, tuku, vlhkost apod.) tedy kvalita, a bezpečnost potravin, tj. kontrola cizorodých látek (aditiv, reziduí pesticidů atd.) a mikrobiologických požadavků. Jedním ze způsobů analýzy falšování jsou metody založené na analýze DNA, které se používají k detekci určitých druhů nebo k detekci geneticky modifikovaných organismů v potravinách. Molekulárně diagnostické metody patří mezi rychlé, citlivé a specifické moderní techniky a jejím hlavním cílem je objevení nedeklarovaných složek v potravinách. Mezi nejznámější metody analýzy se řadí polymerázová řetězová reakce (PCR) a metody na ní založené. Tato metoda je založená na amplifikaci cílových specifických sekvencí DNA. Základním předpokladem použití PCR je izolace DNA v kvalitě vhodné pro PCR.

Izolace rostlinné DNA bývá komplikovaná, z důvodu obsahu celé řady různých metabolitů, jako jsou polyfenoly, polysacharidy či proteiny, které mohou inhibovat v polymerázové řetězové reakci (PCR). Izolace DNA pomocí magnetických částic, jejichž principem je adsorpce DNA na povrch magnetických částic, je moderním a rychlým způsobem.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Autenticita potravin

Během posledních deseti let roste poptávka po přesných a spolehlivých metodách pro identifikaci složek v potravinách. Za falšování můžeme považovat nesprávné označení potraviny, nedostatek informací o dané potravine, náhradu suroviny levnější složkou, umělé zlepšování vlastností potravin či nepravdivé označení původu potraviny [1, 2]. Konzumace produktů, které obsahují nedeklarované složky, mohou způsobit otravu nebo problémy např. alergie [3]. Je důležité, aby všechny suroviny při zpracování potravin splňovaly požadované normy nařízené legislativou. Kontrola obvykle začíná u dodavatelů potravinářských surovin, následuje kontrola vyrobených výrobků a končí kontrolou u prodejců [2, 4]. Cílem těchto studií je zabránění potravinových podvodů, které jsou nežádoucí pro spotřebitele, kontrolní orgány, ale i pro prodejce. Mezi nejznámější analytické metody zabývající se touto problematikou patří hmotnostní spektrometrie, chromatografické metody, spektroskopické metody a metody založené na analýze DNA [5].

DNA je v porovnání s jinými molekulami, jako je RNA, proteiny či sekundární metabolity, mnohem odolnější k průmyslovému zpracování, např. při vysokých teplotách a extrémním pH [6]. Čerstvé potraviny bez tepelného zpracování lze úspěšně analyzovat s použitím mnoha typů analytických nebo molekulárních analýz. Mnoho potravin je tepelně upraveno, a proto je izolace DNA v takových vzorcích z důvodu fragmentované DNA obtížnější [2]. Fragment DNA o malé velikosti, za předpokladu náhodného rozložení poškozených míst, má větší šanci být beze změny, a tedy být amplifikovatelný. Zpracované výrobky mají obvykle nižší obsah vody, než čerstvé produkty. Dále je pravděpodobný vyšší výskyt koncentrace sekundárních metabolitů, a to bez ohledu na zpracování [6].

2.1.1 Detekce druhů rostlin

Rostliny jsou základem lidské stravy a je možné je využívat v syrovém i zpracovaném stavu. Dále se používají jako krmivo pro zvířata, pro výrobu vláken, biopaliva, léčiva či parfémy [6].

Detekce botanického původu potravin vyžaduje izolaci DNA bez inhibitorů, v dostatečném množství a kvalitě. Extrakce DNA z potravinářských výrobků má několik problémů a omezení z důvodů obsahu velké škály sloučenin, včetně sacharidů, tuků a chemických látek. Tyto látky často způsobují inhibici PCR, což může vést k nesprávným výsledkům. Nejčastější postup izolace DNA se provádí pomocí lyzačního pufu s CTAB nebo pomocí fenol chloroformové extrakce [2].

V současnosti je také věnována velká pozornost detekci geneticky modifikovaných organismů, které jsou již v řadě zemí povoleny. Jedná se o sóju, kukuřici, bavlnu, řepku atd. Tyto rostliny (plodiny) mohou obsahovat geny, např. zabezpečující rezistenci vůči hmyzu, toleranci k herbicidům či abiotickým stresům. Dle legislativy EU musí být tyto produkty řádně označeny. Pro testování GMO je velice vhodnou metodou PCR v reálném čase [7].

Pokud je výrobek uváděn bez GMO nesmí překračovat limit 0,9 % náhodně kontaminujících GMO variet, které jsou povoleny v EU [8]. Vzhledem k tomu, že budoucí generace produktů GMO budou mít více než jeden vložený gen, je nutné najít vhodnou metodu ke stanovení, zda je materiál nad nebo pod prahovou hodnotou [7].

Pomocí metod založených na analýze DNA lze také detegovat alergeny pocházející nejen z rostlinných druhů. Dle legislativy EU je nezbytné uvádět seznam alergenů na každé potravine. Použití kvantitativní konkurenční PCR s primery specifickými pro chloroplast *trnL* genu umožňuje detegovat pšenici, ječmen a žito do bezpečných potravin pro celiaky [2, 9]. Analýza DNA umožňuje stanovení i kvantitativním způsobem i v případech, je-li jídlo z jednoho druhu nebo odrůdy smícháno s materiálem z jiných, levnějších druhů nebo odrůd [6].

2.1.2 Detekce zvířecí druhů v masných výrobcích

Techniky na bázi DNA se ukázaly být účinné i při identifikaci a kvantifikaci DNA nacházející se v široké škále mas a ryb, a to zejména proto, že umožňují rozpoznat každý druh jako jedinečný díky použití druhově specifických primerů, které se vážou k daným sekvencím. Další možností je použití univerzálních primerů, které se vážou na konvenční sekvence všech přítomných živočišných druhů ve vzorku masa. Po amplifikaci je nezbytné výsledné fragmenty DNA analyzovat postupy pro přesné určení přítomných druhů, pomocí polymorfismu délky restrikčních fragmentů (RFLP) nebo štěpením restrikčními endonukleázami. Tyto výsledky je ale nutné interpretovat obezřetně vzhledem k jejich různorodému obsahu tuků a tkání [6, 9].

2.2 Izolace rostlinné DNA

Izolace nukleové kyseliny je nezbytnou operací před biochemickými a diagnostickými postupy a zahrnuje 3 hlavní kroky: odstranění buněčné stěny nebo membrány, separaci DNA od všech jiných buněčných složek (nečistot a metabolických látek) a udržování integrity DNA v průběhu separace (tj. ochrana proti nukleázám a mechanickému poškození stříhem) [10, 11]. Mezi hlavní sloučeniny (kontaminanty), které mají nepříznivý vliv na izolaci rostlinné DNA, patří polysacharidy, RNA, proteiny, polyfenoly, třísloviny, silice, pektiny a alkaloidy. Volba nejvhodnějšího postupu pro izolaci DNA není triviální, protože každý vzorek má odlišné fyzikální a chemické vlastnosti [6, 11].

Správná manipulace a skladování rostlinné tkáně, jsou základními prvky pro úspěšnou izolaci rostlinné DNA. Nejvhodnější pro izolaci DNA je čerstvý rostlinný materiál, často je ale nutné použít vzorek zmrazený. Je nutné dbát na to, aby nedocházelo ani ke krátkodobému rozmrazení, protože zmrazováním vzorku dochází k rozrušování rostlinné tkáně, a tedy k degradaci DNA. Nukleázová aktivita zůstává zachována. Zmrazený vzorek lze skladovat při -18 °C pro krátkou úschovu nebo při -80 °C v kapalném dusíku pro dlouhodobější uchovávání. Vzorky uložené ve formě lyofilizované tkáně jsou mnohem lepší volbou, protože mohou být skladovány po dobu několika let s malou ztrátou kvality DNA [11, 12].

U některých rostlin např. dřevin s houževnatými listy bývá rozrušení buněčné stěny komplikované, z důvodu přítomnosti rigidního polysacharidu. Je nutno použití mechanických operací, jako je broušení či mletí. Správná homogenizace je nezbytná pro snížení viskozity u vzorků s vysokou molekulovou hmotností sacharidů [11].

Nejčastější postup izolace DNA se provádí pomocí lyzačního pufru s CTAB nebo pomocí fenol chloroformové extrakce. Použití fenolu pro oddělení buněčných molekul a nečistot z DNA je nebezpečné kvůli jeho toxicitě a pracné. Vhodným řešením při odstraňování kontaminantů může být použití komerčně dostupných extrakčních kitů, které poskytují velmi dobré kvalitativní i kvantitativní výsledky. Extrakční kity mají dobrou reprodukovatelnost a jsou rychlé. Jejich hlavní nevýhodou jsou vyšší náklady na analýzu [1, 13]. Některé kity jsou vyrobeny pro omezenou velikost vzorku (20 až 200 mg) [7]. Použití lyzačního pufru s cetyl triethyl amonium bromidem (CTAB) poskytuje rychlou a spolehlivou extrakci DNA z rostlin bohatých na polysacharidy a sekundární metabolity, které snižují výtěžek při extrakci DNA. Přítomnost polysacharidů ve vzorcích DNA se vyznačuje tvorbou vysoce viskózního roztoku, a může inhibovat enzymatickou aktivitu Taq polymerázy a enzymovou aktivitu restriktáz. Polyfenoly (flavonoidy, terpeny, taniny) kovalentně vázané na DNA lze rozpoznat na základě hnědého zbarvení, které vzniklo díky oxidované formě [11, 13]. Základní extrakční pufr s CTAB obsahuje CTAB, NaCl, EDTA, Tris-HCl [7]. Při izolaci pomocí CTAB bylo ověřeno, že přídavek čerstvého antioxidantu β -merkapt ethanolu k lyzačnímu pufru úspěšně odstraňuje polyfenoly. Použití vysoké koncentrace NaCl napomáhá odstranit polysacharidy [11, 13, 14]. Následné použití pevného, ve vodě rozpustného polymeru s vysokou molekulovou hmotností polyvinylpyrrolidonu (PVP), slouží k odstranění fenolů, chloroform-oktanol v poměru 24:1 je výhodný pro deproteinaci, odstranění chlorofylu, pigmentů i barviv, isopropanol se používá k zakoncentrování DNA [13, 14]. RNA lze odstranit srážením chloridem lithným nebo štěpením RNázou A. Proteiny se odstraňují za použití chemikálii např. SDS, dithiothreitolu (DTT), proteinázy K či β -merkapt ethanolu [11].

Finální koncentraci izolované DNA je možno zvýšit snížením objemu elučního roztoku [6]. Výsledky jsou ovlivňovány výběrem extrakční metody při izolaci, vyhodnocovací technikou DNA a PCR. Velkou roli hraje délka amplikonů, počet cyklů a přítomnost inhibitorů PCR. Detekci a kvantifikaci také ovlivňuje množství DNA použité v PCR [15]. Lze konstatovat, že je nutný vývoj standardizovaných protokolů a pracovních postupů.

2.3 Magnetické nosiče

2.3.1 Historie magnetických nosičů

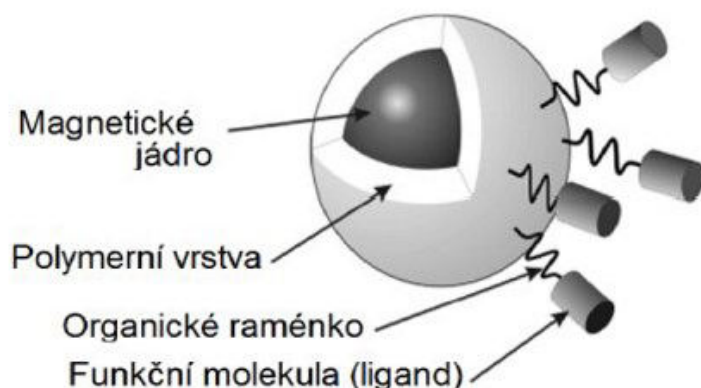
Adsorpce na magnetické nosiče je důležitou operací v bioseparacích a čištění DNA. Magnetické částice byly poprvé v biotechnologii použity v roce 1973 k imobilizaci enzymů P. J. Robinsonem. Ten ve své práci popsál použití magnetických nosičů oxidu železitého

pokrytého oxidem křemičitým nebo celulózou k imobilizaci dvou enzymů α -chymotrypsinu a β -galaktosidázy, pro využití v bioreaktorech [16].

2.3.2 Vlastnosti

Magnetické nosiče se skládají z magnetického jádra, jehož průměr je menší než 30 nm a polymerní vrstvy [17]. Schématický popis magnetických nosičů znázorňuje Obrázek 1 [18]. Magnetické jádro je tvořeno materiálem na bázi magnetických oxidů železa - magnetit Fe_3O_4 ($\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$) a maghemit $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Z důvodu navázání biologicky aktivních látek na nosič, se povrch jader pokrývá biokompatibilními polymery [19]. Může se jednat jak o přírodní sloučeniny - polyethylenimin, oxid křemičitý, kyselinu laurovou, kyselinu alginovou, tak o syntetické látky – polyethylenglykol (PEG) nebo polystyren (PS) [20,21]. Magnetické částice používané při purifikaci DNA mají superparamagnetické vlastnosti, tzn., že vykazují magnetické vlastnosti pouze v přítomnosti vnějšího magnetického pole. Obvykle nemají žádný zbytkový magnetismus, a tedy bez přítomnosti vnějšího magnetického pole se částice neshlukují. Magnetické částice se ze vzorku odstraňují pomocí magnetického separátoru [16]. Konvenční adsorbenty mají průměr v rozmezí od sub-mikronů do mikronů, a vyznačují se velkou vnitřní porézností, aby zajistily dostatečnou povrchovou plochu pro adsorpci. Omezení difúze v porézních částicích vede ke snížení adsorpční míry a volných míst pro navázání proteinů. Velice užitečné jsou adsorbenty s vysokou kapacitou a malým difúzním odporem pro adsorpci biomolekul. V poslední době se adsorpcím pomocí neporézních nanočástic zvyšuje pozornost, protože mají velmi malou velikost, velkou stabilitu a kapacitu vázat více adsorbátu na jejich povrchu. Magnetické částice mohou být snadno izolovány, a to i v přítomnosti koloidních nečistot [10].

Magnetické částice vykazují superparamagnetismus, když je velikost částic menší než 30 nm. Uvedené částice proto nemají zbytkový magnetismus. Byly zjištěny rozdíly při separaci po imobilizaci různých funkčních skupin na povrch magnetických částic, které se provádí nejen za účelem lepšího výtěžku ale i z důvodu zabránění agregace [10].



Obrázek 1: Schématické znázornění magnetického nosiče. Upraveno dle [18].

2.3.3 Funkcionalizace

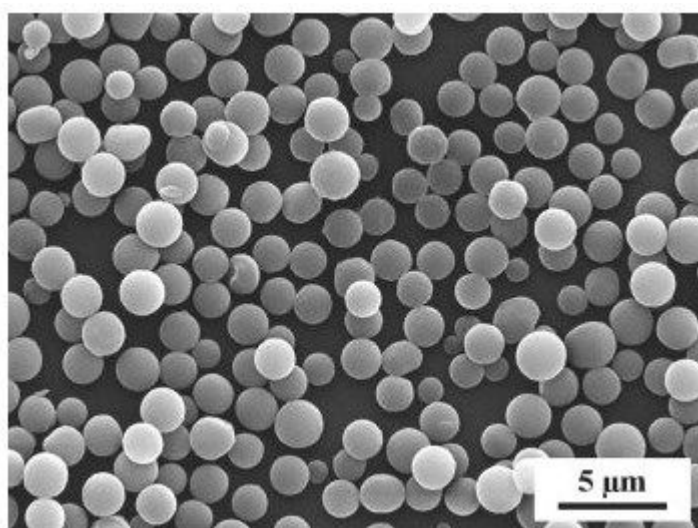
Funkcionalizované magnetické mikročástice či nanočástice slouží jako nosiče léčiv, hormonů, buněk, enzymů, nukleových kyselin, protilátek, proteinů, peptidů a diagnostických látek. Reakce biomolekul s magnetickými částicemi jsou závislé na jejich funkcionalizaci. Používá se kovalentní imobilizace [22]. Nejvyužívanější funkční skupiny (ligandy), které zajišťují reaktivitu s požadovaným analytem, jsou uvedeny v Tabulce 1 [18].

Tabulka 1: Přehled funkčních skupin. Převzato z [18]

Funkční skupina	Vzorec	Vlastnosti	Cílové biomolekuly
amino	-NH ₂	Pozitivně nabitě. Tvorba amidové vazby s -COOH.	proteiny, nukleové kyseliny
	-NHR		
	-NR ₂		
karboxylová	-COOH	Negativně nabitě. Tvorba amidové vazby s -NH ₂ a esterové s -OH.	proteiny
aldehydová	-CHO	Tvorba imidové vazby s -NH ₂ .	proteiny
thiolová	-SH	Tvorba disulfidických můstků (-S-S-) s dalšími -SH skupinami.	proteiny obsahující cystin

2.3.4 Příprava hydrofilních neporézních magnetických nosičů

Syntéza magnetických částic není univerzální, ale většina magnetických nosičů je komerčně dostupná. Na Obrázku 2 jsou zobrazeny magnetické částice P(HEMA-*co*-GMA) - poly(hydroxyethylmethakrylát-*co*-glycidylmethakrylát), které byly připraveny disperzní kopolymerizací polymerů HEMA a GMA ve směsi toluen-2-methylpropan-1-ol stabilizované acetát-butyrát celulosy (CAB). Reakce byla iniciována dibenzoylperoxidem (BPO) v přítomnosti magnetitu (Fe₃O₄) a kyselina olejové [23].



Obrázek 2: Elektronový mikrosnímek magnetických částic P(HEMA-*co*-GMA) [24]

2.3.5 Využití a výhody této techniky

Magnetické částice nachází v současné době uplatnění v mnoha vědních oborech, jako jsou biotechnologie, biochemie, biologie a taky lékařství [25]. Separace s použitím magnetických nosičů se používá ve formě mikro i nanočástic, a jejich využití je převážně pro separaci biologických molekul a buněk (např. buněčných suspenzí, homogenátů, fermentačních médií apod.) [16, 19, 25, 26]. Ve srovnání s běžnými postupy tato metoda má značné výhody, vzhledem k její rychlosti, stabilitě a jednoduchosti. Není zapotřebí používání filtrace ani centrifugace. Nepracuje se rovněž s organickými rozpouštědly, a tudíž další výhodou je nízká toxicita a bezpečnost. Výhodou je možnost proces automatizovat a provádět analýzy ve větším měřítku [17].

2.3.6 Izolace DNA pomocí magnetických částic

Na adsorpci DNA pomocí magnetických částic má vliv délka molekuly DNA, koncentrace použité soli, velikost částic, jejich povrchová úprava a hustota náboje. Hodnota pH roztoku DNA v adsorpčním procesu může mít vliv na velikost náboje a elektrostatické interakce mezi DNA a magnetickou částicí. Po přidání chloridu sodného, hořčnatého či vápenatého se zvyšuje iontová síla a urychluje se adsorpce. Dvojmocné kovy se vážou silněji na negativně nabitou DNA než jednomocné ionty při adsorpci, za předpokladu snižování elektrostatických odpuzivých sil [10]. Princip separace pomocí magnetických částic je znázorněn v několika krocích, uvedených na Obrázku 3. Nejprve se DNA naváže na magnetické částice v separační směsi. Poté jsou magnetické částice separovány magnetickým separátorem a propláchnuty, tím dojde k základnímu čištění a odstranění kontaminujících látek. Následně se DNA eluuje do TE pufru, a pomocí separátoru se magnetické částice vyjmou ze separační směsi [27]. DNA lze izolovat přímo z lyzátů buněk bez použití fenolové extrakce [20]. Velice účinným nově vyvinutým způsobem pro lepší adsorpci DNA na magnetické částice je použití polyethylenglykolu (PEG) a chloridu sodného. Při adsorpci vzniká kulovitě-spirálovitý tvar molekuly DNA a dochází k její kondenzaci [10, 28].



Obrázek 3: Schéma průběhu izolace magnetickými nosiči. Převzato z [27].

2.4 Stanovení kvality DNA a výtěžků

Pro posouzení kvality izolované DNA lze použít řady metod. Nejčastěji se používá agarózová gelová elektroforéza, UV spektrofotometrie, restrikční analýza a polymerázová řetězová reakce.

2.4.1 Gelová Elektroforéza

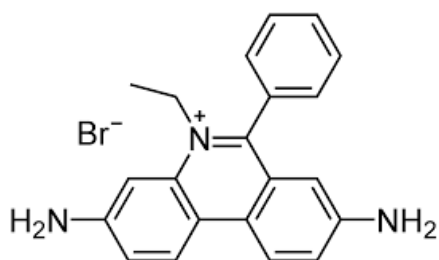
Principem této separační metody je pohyb záporně nabitých molekul DNA ve stejnosměrném elektrickém poli směrem k anodě. Elektroforéza v agarózovém gelu se používá nejen k identifikaci, ale i separaci či purifikaci fragmentů DNA [7, 29].

Agaróza je polysacharid, který se získává izolací z mořských řas. Jeho základní strukturní jednotka je složena z D-galaktózy a 3,6-anhydro-L-galaktózy. Agar tuhne při teplotě 45 – 48 °C a za zvýšené teploty je rozpustný ve vodě [30, 31]. Po rozpuštění vzniká hustý koloidní roztok, který se nalévá do ploché formy. Následně po vychladnutí vzniká vhodný gel pro elektroforézu. Náboj DNA je v neutrálním roztoku negativní, protože nukleové kyseliny obsahují záporně nabitě fosfátové skupiny. Pohyb DNA v elektrickém poli je od katody k anodě. Rychlost migrace DNA je přímo úměrná intenzitě elektrického pole a nepřímo úměrná logaritmu délky řetězce, tudíž krátké řetězce (s menší molekulovou hmotností) gelem migrují rychleji než dlouhé řetězce s vyšší molekulovou hmotností. Kromě elektrostatických sil se při dělení uplatňuje i síťový efekt, takže se rozdělí i fragmenty se stejným efektivním nábojem, ale s rozdílnou délkou resp. molekulovou hmotností [32, 33, 34].

Hlavní výhodou gelové elektroforézy je jednoduchost a reprodukovatelnost. Dělení fragmentů DNA s různými molekulovými hmotnostmi ovlivňuje zvolená koncentrace agarózového gelu. Vyšší koncentrace agarózy usnadňuje oddělení menších molekul DNA, zatímco nižší koncentrace agarózy umožňuje separaci větších molekul DNA. Tyto gely jsou vhodné pro separaci molekul nukleových kyselin v rozmezí od velikosti několika set bp až po cca 50 kb. Pro separaci genomové DNA se obvykle používá koncentrace agarózy 0,8 – 1% [7]. Agarózovou gelovou elektroforézou lze detegovat až 1 ng DNA [32, 33, 34].

2.4.1.1 Vizualizace gelu

Po skončení elektroforézy jsou rozdělené molekuly ve viditelném záření bezbarvé. Rozdělené fragmenty jsou vizualizovány fluorescenčními barvivami, která se vážou na molekulu DNA. Molekuly DNA jsou po obarvení viditelné na gelu v ultrafialovém světle jako proužky a jejich intenzita je úměrná koncentraci DNA. Velmi používaným barvivem je ethidiumbromid, jehož strukturní vzorec je na Obrázku 4. Další známá barviva jsou např. SYBR Green nebo GelRed [7]. Ethidiumbromid se vmezeřuje (interkaluje) mezi sousední páry bází v DNA a vytváří komplex, který po osvětlení ultrafialovým světlem červeně fluoreskuje [7, 34, 35]. Koncentrace DNA může být odhadnuta semikvantitativně použitím zředěné DNA o známé koncentraci (žebříčku). Následně jsou porovnány intenzity pruhů fragmentů standardu s intenzitou pásů vzorků neznámých koncentrací [7].



Obrázek 4: Strukturální vzorec ethidiumbromidu

2.4.2 Spektrofotometrické stanovení nukleových kyselin

Nejčastěji používanou technikou pro stanovení čistoty a koncentrace nukleových kyselin je spektrofotometrické stanovení v ultrafialové oblasti spektra. Heterocykly bází nukleových kyselin absorbují ultrafialové (UV) záření s maximem v okolí vlnové délky 260 nm [36]. Koncentraci nukleových kyselin lze vypočítat podle empirických vztahů, kdy pro nativní (dvouřetězcovou) DNA $A_{260\text{nm}} = 1,0$ odpovídá koncentraci $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Hodnota závisí na chemickém složení (zastoupení AT a GC párů bází) analyzované DNA. U denaturované (jednořetězcové) DNA je absorbance asi o 40 % vyšší než dvouřetězcové molekuly ($c = 30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). RNA absorbuje ve stejném rozsahu vlnových délek a $A_{260\text{nm}} = 1,0$ odpovídá koncentraci $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ [28].

Čistotu nukleových kyselin je možné stanovit z poměru absorbance při 260 a 280 nm. Poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ udává míru kontaminace izolované nukleové kyseliny proteiny, pokud je menší než 1,8 nebo RNA, je-li poměr větší jak 2,0. Pro čistý vzorek je vyhovující poměr 1,8-2,0. Poměr $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ udává míru znečištění nukleové kyseliny nízkomolekulárními látkami (polyfenoly). Pokud je tento poměr větší jak 2,0 můžeme hovořit o čisté DNA bez výskytu těchto látek [11, 13, 28, 32]. Správnost a přesnost kvantifikace DNA pomocí UV spektrofotometrie může být ovlivněna distribucí velikosti DNA v roztoku, poměrem ssDNA a dsDNA a přítomností dalších složek, které absorbují při 260 nm, jako je RNA a jednotlivé nukleotidy [7].

2.4.3 Polymerázová řetězová reakce

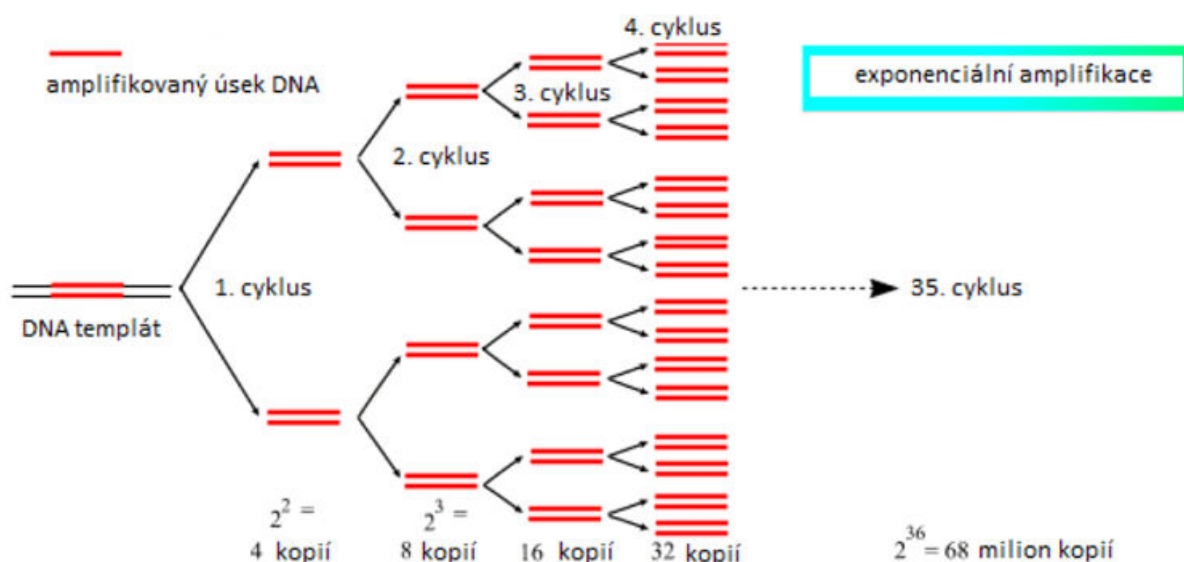
2.4.3.1 Princip

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je velice využívanou molekulárně diagnostickou metodou. Její použití je významné v detekci a identifikaci bakterií a virů v potravinách. Dále se tato metoda používá při detekci a identifikaci patogenů v různých klinických vzorcích, v prenatalní diagnostice, kriminalistice či genetice. PCR byla vyvinuta Kary Mullisem, kterému byla za ni v roce 1993 udělena Nobelova cena. Princip této metody je založen na amplifikaci nukleových kyselin *in vitro*. Podstatou je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců určitých úseků dvouřetězcové DNA ve směru $5' \rightarrow 3'$. K denaturované DNA se připojují primery, což jsou krátké oligonukleotidy, od kterých začíná syntéza nových řetězců DNA [28, 35]. Pomocí této reakce dojde k exponenciálnímu nárůstu až 10^9 kopií daného úseku DNA. Produkty reakce se nazývají amplikony a jejich velikost se pohybuje mezi sto až tisíci páry bází (bp) [28, 22, 35]. Velikost výsledných fragmentů je následně

ověřena agarózovou gelovou elektroforézou [2]. Princip reakce je znázorněn na Obrázku 5. PCR je proces, při němž se v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídají tři hlavní kroky, během kterých probíhají tři odlišné děje:

- Denaturace dvouřetězcových molekul DNA (94 °C), při které se rozdělí vodíkové můstky držící pohromadě dvoušroubovici DNA na dvě samostatná vlákna DNA,
- Připojení primerů (hybridizace) k odděleným řetězcům DNA (50 – 65 °C),
- Syntéza nových komplementárních řetězců DNA (elongace) (65 – 75 °C).

Tyto tři kroky se cyklicky opakují v přístroji, který se nazývá termocyklér. Většinou se provádí 25 až 35 cyklů, avšak optimální počet cyklů závisí na kvalitě použité polymerázy a na výchozí koncentraci templátové DNA [22]. PCR je katalyzována působením termostabilní DNA-polymerázy, která je izolovaná z termofilních mikroorganismů např. *Thermus aquaticus*, které žijí v horkých pramenech. Každá reakce je specifická a je nutné optimalizovat přesné reakční podmínky např.: teplotu, počet cyklů, dobu trvání jednotlivých fází atd. [35].



Obrázek 5: Princip PCR [37]

2.4.3.2 Komponenty pro PCR

Reakční směs pro PCR je obvykle v rozmezí objemů 25 až 100 μ l a skládá se z vody pro PCR, pufru pro PCR, směsi dNTP, primerů, DNA polymerázy a DNA templátu.

- **Voda pro PCR** se používá na doplnění PCR směsi do požadovaného objemu a musí být bez specifických iontů, organických látek a bakterií. Nejvhodnější je voda o odporu 18 m Ω nebo voda pro injekce ČSL 4 [28].
- **Pufir pro PCR** vytváří optimální pH prostředí pro DNA polymerázu. Kvůli správnému průběhu reakce je pufir dodáván stejným výrobcem jako polymeráza. Pufir obsahuje ionty Mg²⁺, které ovlivňují specifičnost i výtěžek PCR a udržují

enzymatickou aktivitu Taq DNA polymerázy. Běžný reakční pufr obsahuje 10 mM Tris-HCl (pH 8,3–8,8), 50 mM KCl a 1,5 mM MgCl₂ [28].

- **dNTP (2' -deoxynukleosid-5'-trifosfáty)** představují základní kameny pro výstavbu nového řetězce DNA. Běžná PCR reakce obsahuje ekvimolární množství každého nukleotidu dATP, dCTP, dGTP, dTTP. Koncentrace dNTP bývá 20–400 μM [28].
- **Primery** jsou uměle syntetizované oligonukleotidy o velikosti 10 až 30 nukleotidů. Hrají klíčovou roli při amplifikaci DNA matrice [38]. Dobře zvolené primery zaručují specifčnost, citlivost reakce a musí splňovat řadu kritérií. Pro reakci jsou potřeba dva primery, které označí místa, odkud se mají začít syntetizovat nová vlákna. PCR primery jsou obvykle navrženy pro mnoho aplikací pro amplifikaci jediné známé cílové sekvence a mohou být považovány za druhově specifické [6]. V produktech, které prošly procesem tepelné sterilizace nebo fyzikálním ošetřením, je obtížná spolehlivá amplifikace fragmentů nad 200 bp [6, 39]. Optimální koncentrace každého primeru ve směsi bývá 0,1–0,5 μM [28].
- **DNA-polymeráza** syntetizuje nový řetězec DNA od místa navázání primeru ve směru 5' → 3' podle sekvence nukleotidů v komplementárním řetězci templátu. Pro její účinnost jsou nezbytné Mg²⁺ ionty a vhodný počet cyklů reakce, protože při vysokém počtu cyklů se její účinnost snižuje [28].
- **DNA matrice (DNA templát)** je makromolekula DNA, podle které se komplementárně syntetizují nové řetězce DNA. Obsahuje cílová místa pro primery. Její kvalita ovlivňuje účinnost celé amplifikace. Je nutné, aby neobsahovala inhibitory. Obvyklá množství DNA ve směsi jsou 10 ng, 1 ng nebo 10 pg [28, 35].

2.4.4 PCR inhibitory

PCR je velice citlivou metodou a vyžaduje práci ve sterilním prostředí [28]. Inhibitory DNA jsou látky různé chemické povahy a jsou zodpovědné za snížení citlivosti nebo za falešně negativní výsledky. Mohou snížit účinnost nebo reprodukovatelnost PCR [7, 40]. Mechanismus působení inhibitorů PCR je různý a inhibitory mohou zasahovat v různých krocích PCR [40]. Inhibice může být spojená se srážením, denaturací DNA nebo schopnosti polymerázového enzymu vázat se na hořčíkové ionty. Inhibitory enzymů mohou pocházet buď z rostlinných tkání, nebo činidel použitých pro izolaci DNA. Přehled nejčastějších inhibitorů PCR a strategií, jak jim předejít je uveden v Tabulce 2. Existuje řada metod pro odstranění inhibitorů nebo pro redukci jejich efektů. Problém s inhibitory lze řešit vhodným výběrem metody pro zpracování a extrakci nukleových kyselin. Ředěním DNA se sníží koncentrace inhibitorů, a tím se zlepší účinnost PCR. Nicméně nižší koncentrací DNA se může snížit citlivost PCR [7].

Tabulka 2: Inhibitory PCR. Upraveno dle [7]

Inhibitory	Minimalizace inhibice
CTAB	Promýt 70 % ethanolem
EDTA	Snížit koncentraci EDTA nebo Tris-HCl
Ethanol	Vysušit buňky a resuspendovat
Tuky	Lipáza, hexan, chloroformová extrakce
Isopropanol	Vysušit buňky a resuspendovat
Fenol	Použití PVP, PVP / acetátu amonného
Polysacharidy	CTAB pufr a extrakce chloroformem
Proteiny	SDS, CTAB, proteináza K
SDS	Promýt 70 % ethanolem
Octan sodný	Promýt 70 % ethanolem
NaCl	Promýt 70 % ethanolem

Na polymerázové řetězové reakci je založeno velké množství metod. Pro mikrobiologické stanovení potravin existuje PCR v reálném čase, mnohonásobná PCR, hnízdová PCR, reverzně transkripční PCR nebo fingerprintové metody [28].

2.4.5 PCR v reálném čase

Metoda PCR v reálném čase je moderní technikou molekulární biologie, která byla vyvinuta v 90. letech a stala se klíčovou technologií pro vysokorychlostní testování a přesnou kvantifikaci DNA. PCR v reálném čase (qRT-PCR) je založena na sledování množství amplifikovaného produktu v každém cyklu v průběhu polymerázové řetězové reakce, které je možné sledovat pomocí třech různých metod. První možností je použití interkalačních barviv, které se vážou na molekulu DNA. U druhé metody je možné použít fluorescenčně značené sondy, které se vážou na střední část amplifikovaného produktu nebo ve třetím případě je možno využívat fluorescenčně značených primerů. Nejčastěji se využívá fluorescenční kyanidové barvivo SYBR Green, které se interkaluje do dvoušroubovice DNA. Množství amplikonu přítomného v reakční směsi je přímo úměrné intenzitě fluorescenčnímu signálu záření a je měřeno v každém cyklu PCR [35, 41, 42]. Tato technika je v porovnání s konvenční PCR přesnější, citlivější, specifická a rychlejší. Hlavní nevýhodou konvenční PCR oproti qRT-PCR je nutnost provádět identifikaci produktů PCR až po ukončení amplifikace např. agarózovou gelovou elektroforézou [43, 44].

Kvantifikace se provádí matematickou analýzou amplifikačních křivek vzniklých vynesemím naměřené fluorescence oproti pořadovému číslu příslušného cyklu. Ideálním tvarem amplifikační křivky, složené ze třech fází, je esovitě zakřivený tvar. První fází tzv. „background“, je fáze, kdy je amplikonu tak málo, že nedosahuje měřitelných hodnot. Druhou fází je exponenciální fáze, kdy množství produktu exponenciálně narůstá. Tato fáze trvá asi 4-8 cyklů a je důležitá pro analýzu. Rychlost růstu amplifikační křivky je přímo úměrná množství templátových molekul přítomných ve vzorku na počátku analýzy. Třetí fáze se nazývá fáze plató. Zde dochází k saturaci systému, přičemž množství amplifikovaného produktu a fluorescenčního signálu se již nemění [8, 35, 45].

3 CÍL PRÁCE

Cílem praktické části práce byla izolace rostlinné DNA v kvalitě vhodné pro PCR. Z vybraných druhů potravin (brokolice, cibulové bulvy a natě, rostlinné pomazánky a vajíčkové pomazánky) byla DNA izolována z hrubých lyzátů, získaných přímou homogenizací rostlinných tkání. Následně byla DNA purifikována reverzibilní adsorpcí na čtyři různé typy magnetických nosičů. U izolovaných vzorků DNA bylo provedeno spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty. Dále byla testována amplifikovatelnost DNA v PCR. Produkty PCR byly detegovány agarózovou gelovou elektroforézou.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

K izolaci rostlinné DNA byly použity růžičky brokolice (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*), cibule kuchyňská (*Allium cepa*) a zelená cibulová nať (*Allium cepa*). Vzorky byly zakoupeny v běžné komerční síti a skladovány v chladničce (4°C), mrazničce (-20°C) nebo při laboratorní teplotě. Dále byly použity potravinové výrobky – rostlinná pomazánka Francouzská (Obrázek 6) a domácí Vajíčková pomazánka, kde jako jediným zdrojem zeleniny byla cibule. Pro testování zakoncentrování DNA s použitím magnetických částic byla použita DNA z telecího brzlíku (Sigma – Aldrich, St. Louis, USA) (calf thymus DNA – TT DNA) o koncentraci 25 ng/ml. Purifikovaná DNA *Brassica oleracea* (10 ng/μl) byla získána od RNDr. A. Kovaříka, CSc. z Biofyzikálního ústavu AV ČR v.v.i, v Brně.



Obrázek 6: Francouzská pomazánka

4.2 Chemikálie

- Agarosa pro elektroforézu DNA (Serva, Heidelberg, SRN)
- Cetyl triethylamonium bromid (CTAB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethanol (Penta, Chrudim, ČR)
- Ethidiumbromid (EtBr) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Hydrogenuhličitan sodný (PENTA, Praha, ČR)
- Hydroxid sodný (PENTA, Praha, ČR)
- Chlorid sodný (PENTA, Praha, ČR)
- Chloroform (PENTA, Praha, ČR)

- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (PENTA, Praha, ČR)
- Isoamylalkohol (PENTA, Praha, ČR)
- Isopropanol (PENTA, Praha, ČR)
- β -merkптоethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Octan sodný (PENTA, Praha, ČR)
- Oktanol (PENTA, Praha, ČR)
- Polyethylenglykol 6000 (PEG 6000) (Sigma-Aldrich, St. Louis ,USA)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris-báze) (Amresco, Solon, USA)

Všechny chemikálie byly čistoty p.a. a pocházely z běžných komerčních zdrojů.

4.2.1 Magnetické nosiče

V práci byly použity následující magnetické nosiče:

- Magnetické mikročástice poly(2-hydroxyethyl methakrylát-*co*-glycidyl methakrylátu) - P(HEMA-*co*-GMA) o průměru 1,0 μm , koncentrace částic 2 mg/ml
- Magnetické mikročástice poly(2-hydroxyethyl methakrylát-*co*-glycidyl methakrylátu) pokryté – NH_2 skupinami - P(HEMA-*co*-GMA) NH_2 , (4,5 mM - NH_2/g), koncentrace částic 2 mg/ml
- Magnetické nanočástice oxidů železa pokryté poly(L.lysinem) – PPL o průměru 110 nm, koncentrace částic 0,1 mg/ml
- Magnetické nanočástice poly(glycidyl methakrylátu) PGMA ox pokryté karboxylovými skupinami (0,67 mM - COOH/g) o průměru 1,2 μm , koncentrace částic 2 mg/ml

Magnetické nosiče byly syntetizovány Ing. D. Horákem CSc. na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR, v.v.i. v Praze.

4.2.2 Komponenty pro PCR

- Voda pro PCR
- Reakční pufr kompletní pro Taq polymerasu (5 U/ μl), který obsahuje 750 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C), 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1% Tween 20, 25 mM MgCl_2 . (Top Bio, Praha ČR)
- Reakční pufr kompletní pro Taq polymerasu 1.1 (1 U/ μl)

- Oligonukleotidové primery 18S_for a 5,8S_rev; 26S_for a 26S_rev (GENERI BIOTECH, Hradec Králové ČR).
- dNTP směs (10 mM) (Top Bio, Praha ČR)
- Taq polymerasa (5 U/μl) (Top Bio, Praha ČR)
- Taq 1.1 DNA polymerasa (1 U/μl) (Top Bio, Praha ČR)

4.3 Přístroje a pomůcky

- Centrifuga MINI Spin 14 500 ot·min⁻¹ (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Centrifuga Spectrafuge Mini (Labnet Int., New Jersey, USA)
- Laboratorní váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New Jersey, USA)
- Magnetický separátor DynaMag (Invitrogen, Oslo, Norsko)
- Mikropipety Discovery HTL o objemu 10, 20, 200 a 1000 μl (PZ HTL, Varšava, Polsko)
- Mikrovlnná trouba SMW 2320 (Sencor, ČR)
- NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA)
- Termostat BT 120 (Praha, ČR)
- Thermal cycler DNA Engine (BIO-RAD Lab., USA)
- Thermocycler Minicycler™ (BIO-RAD Lab., USA)
- Transiluminátor TVR 3121 (Spectroline, Albany, USA)
- Zařízení pro elektroforézu Easy – Cast, model B1 a B3 (Owl Scientific, USA)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet Int., Woodbridge, USA)
- Eppendorfovy zkumavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Běžné laboratorní sklo, špičky z umělé hmoty
- Další laboratorní pomůcky (kopist, špachtle, skalpel, buničina)

4.4 Roztoky

Některé roztoky pro izolaci rostlinné DNA byly získány od RNDr. A. Kovaříka, CSc. z Biofyzikálního ústavu AV ČR v.v.i, v Brně. Roztoky pro purifikaci magnetickými nosiči

byly připraveny podle návodů k laboratorním cvičením Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie [28].

4.4.1 Roztoky pro izolaci a purifikaci rostlinné DNA

- Lyzační pufr s CTAB – navážka 1 g cetyl triethylamonium bromidu byla rozpuštěna 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 destilované vody. Těsně před použitím byl přidán 2-merkapt ethanol (1 μ l/1 ml pufru)
- 0,5 M EDTA (pH 8,0) – 186,1 g EDTA bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody za stálého míchání na magnetické míchačce. Pomocí NaOH bylo upraveno pH na hodnotu 8,0. Roztok byl doplněn do objemu 1 l destilovanou vodou, rozdělen do alikvotních podílů a sterilizován v autoklávu 20 minut při 121 °C
- 1M Tris-HCl (pH 7,8) – 12,1 g Tris-báze bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody. pH roztoku bylo upraveno pomocí koncentrované HCl na hodnotu 7,8. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 100 ml a sterilizován v autoklávu 20 minut při 121 °C.
- TE pufr pH 7,8 – roztok byl připraven sterilně ze zásobních roztoků 1M Tris-HCl (pH 7,8) a 0,5M EDTA (pH 8,0). Byl smíchán 1 ml Tris-HCl (pH 7,8), 200 μ l EDTA (pH 8,0) a 98,8 ml destilované vody.
- Směs chloroform-oktanol - chloroform a oktanol byl smíchán v poměru 24:1.
- 70% ethanol - 70 ml 96% ethanolu bylo smícháno s 26 ml destilované vody.
- Roztok chloridu sodného (5 M) - navážka 87,66 g NaCl byla rozpuštěna v 300 ml destilované vody.
- Roztok 40% polyethylenglykolu 6000 - navážka 40 g PEG 6000 byla rozpuštěna v 60 ml destilované vody. Objem byl doplněn do 100 ml destilovanou vodou.

4.4.2 Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu a vizualizaci DNA

- Agarózový gel (1,2%) – 0,6 g agarózy bylo rozvařeno v 50 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru.
- Agarózový gel (0,8%) – 0,4 g agarózy bylo rozvařeno v 50 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru.
- 0,5x TBE pufr – 54 g Tris-báze a 27,5 g kyseliny borité bylo rozpuštěno v 600 ml destilované vody. Poté bylo přidáno 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a doplněno destilovanou vodou do 1000 ml. Před použitím byl TBE pufr 10x zředěn na výslednou koncentraci.

- Nanášecí pufr Yellow load (6x koncentrovaný, obsahuje barvivo orange G), (Top-Bio, Praha, ČR) – roztok byl před použitím smíchán se vzorkem plazmidové DNA v poměru 1:5.
- DNA standard 100 bp žebříček (Malamité, Moravské prusy, ČR) - obsahuje fragmenty 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 a 1500 bp.
- Barvicí lázeň – 100 µl roztoku ethidiumbromidu (2,5 mg·ml⁻¹) bylo zředěno 500 ml destilované vody.

4.5 Metody

4.5.1 Zpracování vzorků zeleniny

Vzorky zeleniny (cibule, brokolice, zelené natě cibule) byly ořeny ethanolem, sterilním skalpelem nakrájeny na malé kousky a do 1,5 ml Eppendorfové zkumavky bylo odváženo 0,1 g rostlinného materiálu. Pro izolaci DNA magnetickými částicemi byly připraveny lyzáty buněk obsahující DNA různé čistoty.

4.5.2 Lýze buněk

4.5.2.1 Běžná homogenizace s lyzačním pufrem s CTAB (1)

K rostlinnému materiálu (0,1 g) bylo přidáno 500 µl lyzačního pufru CTAB a 1 µl merkptoethanolu (0,2%). Homogenizace byla důkladně prováděna za chladu ve vymražené kostce pomocí sterilního kopistu. Po homogenizaci byly vzorky inkubovány při 60 °C po dobu 30 min. Po inkubaci bylo přidáno dalších 500 µl lyzačního roztoku CTAB z důvodu velké viskozity. Směsi byly promíchány a centrifugovány při 14 500 ot/10 min. Pro separaci DNA byl odebrán supernatant. K izolaci DNA magnetickými částicemi ho bylo použito 100 µl.

4.5.2.2 Přídavek chloroform-oktanolu (2)

Dle kapitoly 4.5.2.1 bylo po inkubaci k 500 µl rostlinného materiálu v lyzačním roztoku CTAB přidáno 500 µl chloroform-oktanolu. Směsi byly promíchány a centrifugovány při 14 500 ot/10 min. Pro separaci DNA bylo odebráno 100 µl supernatantu.

4.5.2.3 Přídavek isopropanolu (3)

Postup byl stejný jako v kapitole 4.5.2.2. K maximálnímu množství odebraného supernatantu do čisté Eppendorfovy zkumavky bylo přidáno 0,6 objemu isopropanolu. Směs byla promíchána po dobu asi 5 minut a byla centrifugována při 14 500 ot/10 min. Supernatant byl odstraněn a k sedimentu DNA bylo přidáno 1000 µl 70% ethanolu. Po řádném promíchání pomocí vortexu byl vzorek DNA opět centrifugován (14 500 ot/10 min). Supernatant byl slít a Eppendorfova zkumavka se nechala vysušit v termostatu při 60 °C po dobu asi 5 minut. Do vysušené zkumavky s DNA bylo přidáno 120 µl TE pufru. K izolaci DNA magnetickými částicemi bylo použito 100 µl tohoto vzorku.

4.5.3 Izolace DNA magnetickými částicemi

K izolaci DNA byly použity různé druhy magnetických částic. Složení separační směsi pro izolaci DNA a pořadí přidávání složek je uvedeno v Tabulce 3.

Tabulka 3: Složení separační směsi

Pořadí	Komponenta	Objem (μl)
1.	5 M NaCl	400
2.	lyzát buněk (DNA)	100
3.	40% PEG 6000	400
4.	Magnetické částice	100

Po smíchání komponent byla směs inkubována při laboratorní teplotě po dobu 15 min. Po uplynutí doby inkubace byly zkumavky umístěny na 5 min do magnetického separátoru a magnetické nosiče byly odseparovány. V přítomnosti magnetického pásu byl supernatant opatrně odpipetován ze zkumavky. Magnetické nosiče s navázanou DNA bez přítomnosti magnetického pásu byly promyty 500 μl 70% ethanolu. Směs magnetických částic a ethanolu byla promíchána, a magnetické nosiče byly odseparovány za použití magnetického separátoru po dobu 1 min. Supernatant byl opatrně odpipetován ze zkumavky v přítomnosti magnetického pásu. Magnetické nosiče s navázanou DNA bez přítomnosti magnetického pásu byly znovu promyty 100 μl 70% ethanolu. Magnetické nosiče byly odseparovány za použití magnetického separátoru po dobu 1 min. DNA adsorbovaná na magnetických částicích byla eluována do 50 nebo 100 μl TE pufru při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny. Po eluci byly magnetické nosiče odseparovány pomocí magnetického separátoru po dobu 2 minut a eluát obsahující DNA byl odebrán do čisté zkumavky. DNA byla dále uchována při -20 °C.

4.5.4 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Měření koncentrace a čistoty izolované DNA bylo provedeno na přístroji NanoDrop 2000. Čočka přístroje byla očištěna tyčinkou s destilovanou vodou. Na čočku přístroje byly nanесeny 2 μl TE pufru (blank). Čočka byla opět očištěna. Poté bylo na čočku nanесeno 2 μl vzorku a provedeno měření. Po měření byla čočka očištěna 2x vodou (2x 2 μl). Vzorky byly před měřením řádně promíchány. Na spektrofotometru byla měřena absorbance v rozmezí vlnových délek 230 až 320 nm. Ze záznamu o měření byla odečtena koncentrace DNA (ng/μl), poměry absorbancí při vlnových délkách $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ a $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$.

4.5.5 Srážení DNA ethanolem

Vzhledem k nízké koncentraci DNA ve vzorcích (viz dále) byly pro zjištění její integrity pomocí gelové elektroforézy vzorky DNA brokolice, cibulové natě a cibule izolované magnetickými částicemi smíchány dohromady. Automatickou pipetou byl změřen objem DNA a ke každému vzorku byla přidána 1/20 objemu 3 M octanu sodného. Směs byla promíchána. Dále byl přidán 2,5 násobek objemu 96 % ethanolu vychlazeného na -20°C. Směs byla opět promíchána. DNA byla srážena při -20 °C po dobu 5 minut. Směs byla centrifugována při 14 500 ot/min po dobu 15 minut. Poté byl opatrně slit supernatant a sediment byl opláchnut 100 μl 70% ethanolu. Směs byla znovu centrifugována po dobu

10 minut při 14 500 otáčkách. Sediment byl krátce sušen v exsikátoru při 37 °C. DNA byla rozpuštěna ve 30 µl TE pufru a dále uchována při 4 °C. Takto izolovaná DNA byla použita pro spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA a gelovou elektroforézu DNA.

4.5.6 Testování zakoncentrování DNA pomocí nosiče

Bylo provedeno ověření možností zakoncentrování DNA pomocí magnetických nanočástic PLL. Jako modelová DNA byla použita DNA z telecího thymu. Složení separačních směsí s 8% PEG 6000 pro testování postupu je uvedeno v Tabulce 4. Bylo provedeno zakoncentrování podle postupu uvedeného v kapitole 4.5.6. DNA adsorbovaná na magnetických částicích byla za třepání eluována do 50 µl TE pufru o pH 8,0 při 60 °C po dobu 1 hodiny. Po eluci byly magnetické nosiče stočeny na nano po dobu 3 minut a odseparovány pomocí magnetického separátoru po dobu 2 minut. Eluát obsahující DNA byl odebrán do čisté zkumavky.

Tabulka 4: Složení separační směsi

Komponenta	Objem (µl)	Objem (µl)	Objem (µl)
2,5 M NaCl	400	200	100
TT DNA 25 ng/µl	300	150	75
40% PEG 6000	200	100	50
MČ PLL (0,1 mg/ml)	100	50	25
Celkem	1000	500	250

4.5.7 Amplifikace DNA metodou PCR

4.5.7.1 Příprava směsi pro PCR

Nejprve byly vzorky DNA zředěny 10x. Komponenty byly smíchány v pořadí a objemovém množství uvedeném v Tabulce 5. Jako negativní kontrola místo DNA matrice byla použita sterilní voda a jako pozitivní kontrola byla použita rostlinná DNA - *B.oleracea* 10 ng/µl.

Tabulka 5: Složení směsí pro PCR s různými DNA polymerázami polymerázy nejsou rozlišeny

Komponenta	Objem (µl)	Komponenta	Objem (µl)
H ₂ O pro PCR	17,1	H ₂ O pro PCR	16,5
10x Reakční pufr kompletní	2,5	10x Reakční pufr kompletní	2,5
Primer forward (10 pmol/µl)	1,0	Primer forward (10 pmol/µl)	1,0
Primer reverse (10 pmol/µl)	1,0	Primer reverse (10 pmol/µl)	1,0
Směs dNTP (10 mM)	1,0	Směs dNTP (10 mM)	1,0
DNA polymeráza (5 U/µl)	0,4	DNA polymeráza (1.1 U/µl)	1,0
Matrice DNA	2,0	Matrice DNA	2,0
Celkem	25,0	Celkem	25,0

Byly použity primery:

→ *Primery 18S_for a 5,8S_rev* [46]

Primer forward: **18S_for** 5'- GCG CTA CAC TGA TGT ATT CAA CGA G-3'

Primer reverse: **5,8S_rev** 5'- CGC AAC TTG CGT TCA AAG ACT CGA-3'

Byl amplifikován produkt PCR o délce 700bp.

→ *Primery 26S_for a 26S_rev* [47]

Primer forward: **26S_for** 5'- GAA TTC ACC CAA GTG TTG GGA T-3'

Primer reverse: **26S_rev** 5'- AGA GGC GTT CAG TCA TAA TC-3'

Byl amplifikován produkt PCR o délce 220 bp.

4.5.7.2 Provedení PCR

Všechny složky směsi pro PCR byly promíchány a vloženy do termocyklieru. Na vzorky byl položen červený plíšek a vše bylo zakryto vyhřívacím víčkem. Podmínky amplifikace jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 6: Podmínky amplifikace DNA v PCR

Krok	Teplota (°C)	Čas (s)	Opakování
1. Počáteční denaturace	95	300	1
2. Denaturace	95	40	35
3. Hybridizace primerů	57	40	
4. Syntéza DNA	72	80	
5. Poslední cyklus	72	600	1

4.5.7.3 Agarózová gelová elektroforéza DNA a produktů PCR

Byl připraven 1,2% agarózový gel (0,6 g agarózy v 50 ml 0,5x TBE pufru) případně 0,8% agarózový gel (0,4 g agarózy v 50 ml 0,5x TBE pufru). Suspenze byla pečlivě rozvařena v mikrovlnné troubě a byla ochlazena na teplotu asi 60 °C. Suspenze byla nalita do elektroforetické vaničky s hřebínkem a ponechána 0,5 – 1 hodinu tuhnout. Před nanášením vzorků na gel byl opatrně vyjmut hřebínek. Vzorky byly nanášeny do komůrek společně s nanášecím pufrům. Vždy bylo smícháno 25 µl produktu PCR s 5 µl nanášecího pufru (6x koncentrovaný). Do komůrky bylo nanášeno 20 µl směsi. Gel byl vložen do elektroforetické vaničky v takové orientaci, aby záporně nabitá DNA migrovala k anodě. Vanička s gelem byla opatrně převrstvena 0,5x TBE pufrům do výšky 2-3 mm nad gel a byl zapnut zdroj gelové elektroforézy (60 V – 3 hod). Separace byla ukončena v okamžiku, kdy bromfenolová modř obsažená v nanášecím pufru doputovala do 2/3 délky agarózového gelu. Po skončení elektroforézy byl gel obarven ethidium bromidem (0,5 µg·ml⁻¹) po dobu 0,5 - 1 hod. Gel byl opláchnut v destilované vodě, umístěn na transiluminátor a vyhodnocen v UV světle při vlnové délce $\lambda = 305$ nm. Byla provedena fotografická dokumentace pomocí digitálního fotoaparátu.

5 VÝSLEDKY

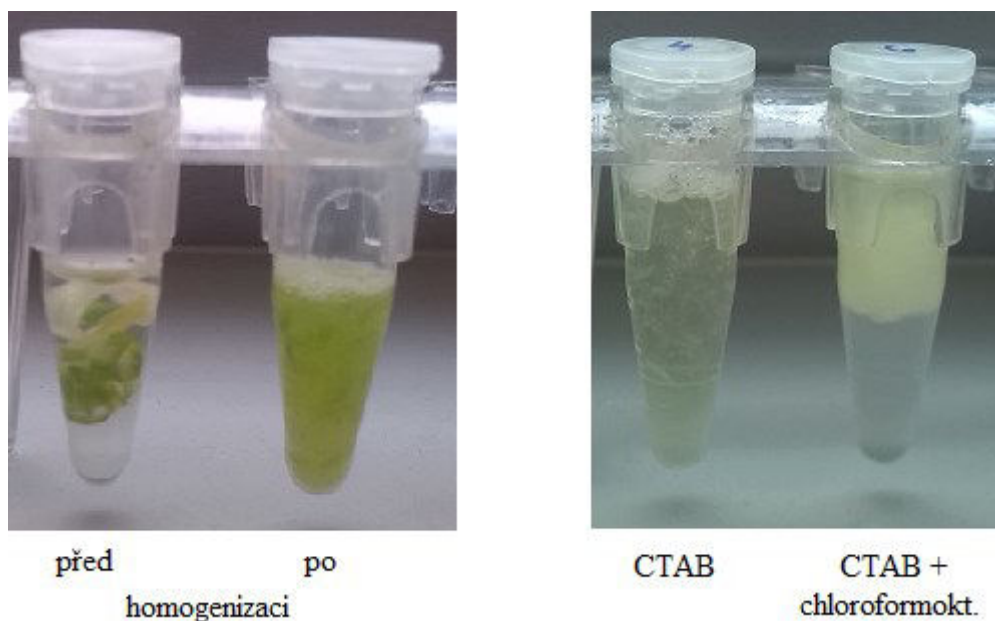
5.1 Příprava rostlinného materiálu pro analýzu

5.1.1 Homogenizace

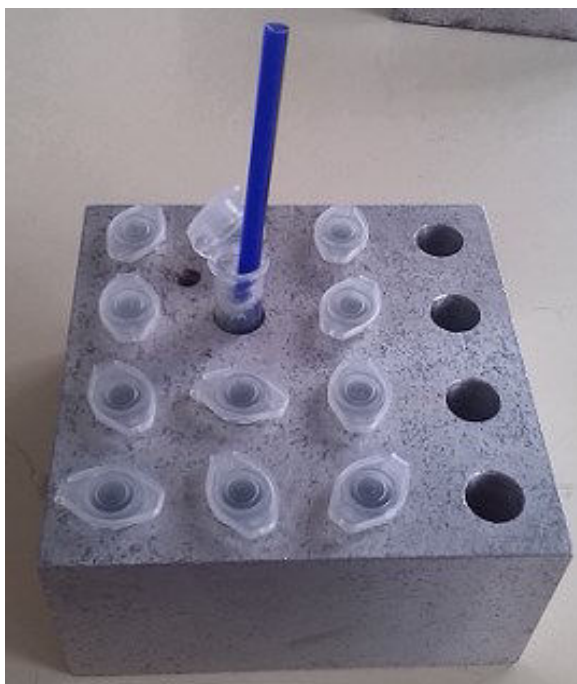
Rostlinná DNA byla izolována z 0,1 g rostlinného materiálu dle postupů uvedených v kapitolách 4.5.1 a 4.5.2. Zpracování vzorků zeleniny je znázorněno na Obrázku 7. Homogenizace v CTAB pufru (500 μ l) pomocí kopistu a přidavek směsi chloroform-oktanolu jsou vyobrazeny na Obrázku 8. Obrázek 9 znázorňuje homogenizaci rostlinného materiálu, v Eppendorfově zkumavce s lyzačním pufrém s CTAB, umístěné ve vymrazené kovové kostce, pomocí umělohmotného kopistu.



Obrázek 7: Zpracování vzorků zeleniny



Obrázek 8: Homogenizace rostlinného materiálu v CTAB pufru v mikrozkuhavce



Obrázek 9: Homogenizace rostlinného materiálu ve vymrazené kovové kostce s CTAB puforem v mikrozkuhavce pomocí kopistu

→ Uvedeným postupem byly připraveny lyzáty buněk z brokolice, cibule, zelené cibulové natě a pomazánek.

DNA byla izolována z různě připravených lyzátů buněk v CTAB bez přidavku chloroform-oktanolu (1), s přidavkem chloroform-oktanolu (2) a s přidavkem chloroform-oktanolu a isopropanolu (3).

5.2 Izolace rostlinné DNA magnetickým nosičem P(HEMA-co-GMA)

Z lyzátů buněk připravených výše uvedenými způsoby byla DNA izolována magnetickým nosičem P(HEMA-co-GMA) dle postupu uvedeného v kapitole 4.5.3. DNA byla eluována do 50 nebo 100 μ l TE pufru a analyzována spektrofotometricky a pomocí PCR.

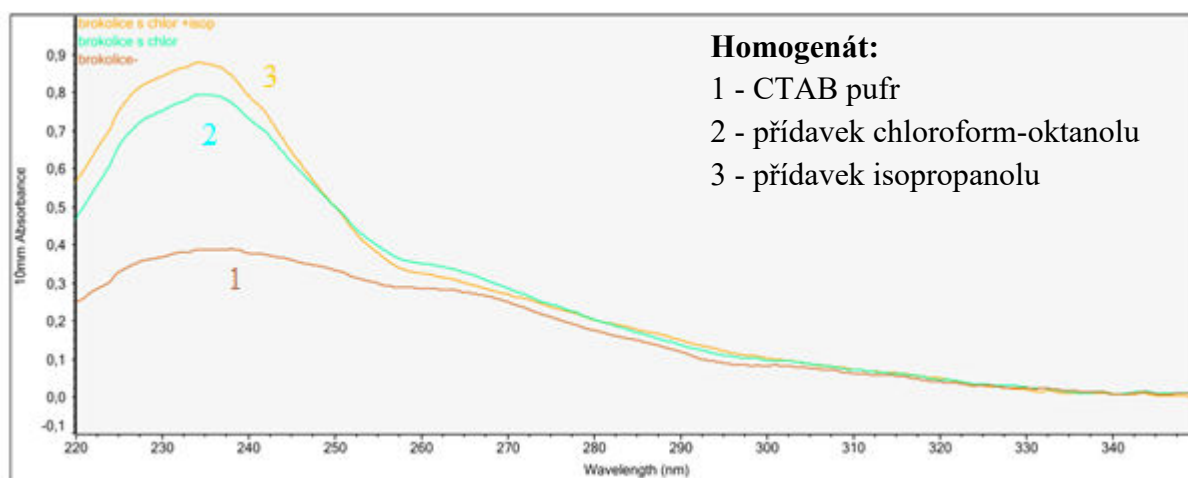
5.2.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty rostlinné DNA bylo provedeno dle postupu uvedeného v kapitole 4.5.4. Zároveň byla zaznamenána hodnota poměru absorbance při vlnových délkách $\lambda = 260$ nm a $\lambda = 280$ nm a celkové množství izolované DNA. Výsledky spektrofotometrického stanovení jsou uvedeny v Tabulce 7. Na Obrázku 10 – Obrázku 12 jsou graficky znázorněna absorpční spektra izolovaných DNA.

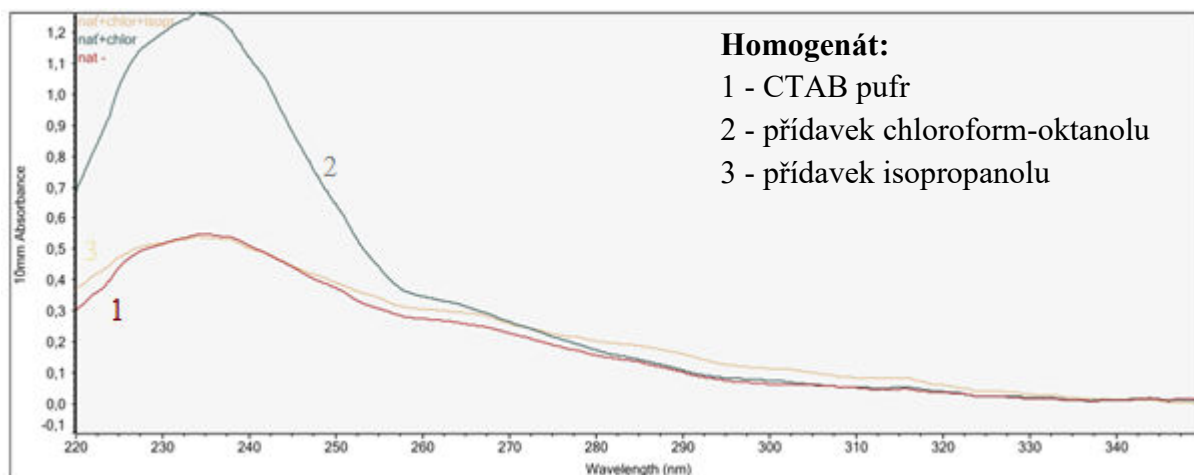
Tabulka 7: Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA izolované z různě připravených lyzátů buněk (100 μ l) magnetickými nosiči P(HEMA-co-GMA)

DNA	1	2	3	DNA (ředění 10x)	c (ng/ μ l)	m _{celk.} (ng)	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{260nm} / A _{280nm}	A _{260nm} / A _{230nm}
brokolice	+	-	-	-	13,9	1390	0,28	0,17	1,65	0,77
				+	5,1					
	+	+	-	-	17,2	1720	0,34	0,21	1,74	0,46
				+	1,5					
	+	+	+	-	15,9	1590	0,32	0,20	1,64	0,38
nař cibule				+	0,2					
	+	-	-	-	13,2	1320	0,26	0,15	1,80	0,52
				+	-	-				
	+	+	-	-	16,8	1680	0,34	0,16	2,07	0,28
				+	2,3					
cibule bulva	+	+	+	-	14,8	1480	0,30	0,19	1,53	0,58
				+	2,8					
	+	-	-	-	8,0	800	0,16	0,12	1,38	1,12
				+	3,9					
	+	+	-	-	13,0	1300	0,26	0,15	1,77	0,41
cibule bulva				+	0,5					
	+	+	+	-	11,1	1110	0,22	0,12	1,81	0,25
				+	1,0					

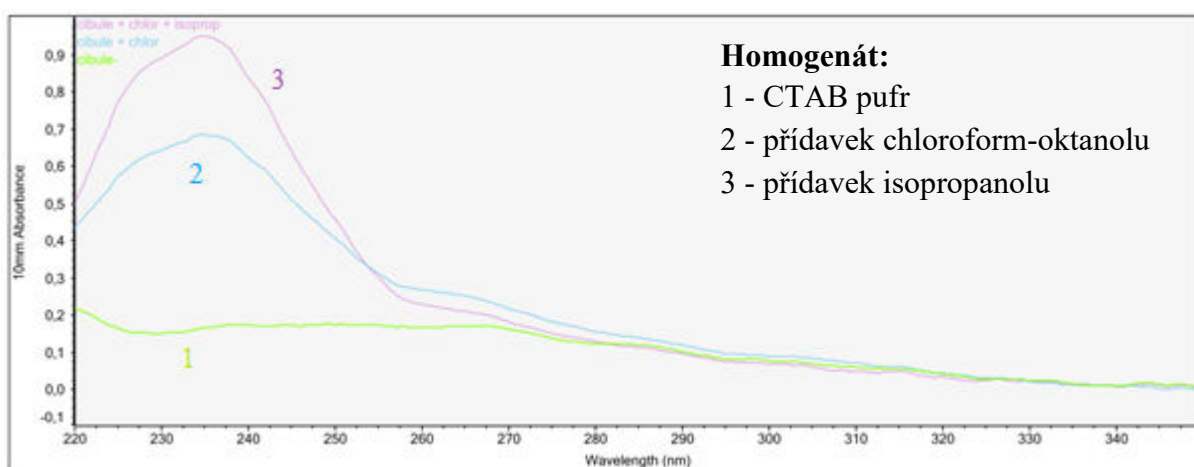
Homogenát: 1 - CTAB pufr, 2 - přídavek chloroform-oktanolu, 3 – přídavek isopropanolu



Obrázek 10: Absorpční spektra DNA izolované z brokolice



Obrázek 11: Absorpční spektra DNA izolované z cibulové natě



Obrázek 12: Absorpční spektra DNA izolované z cibule bulvy

→ Množství DNA izolované magnetickým nosičem P(HEMA-co-GMA) Kanada z 0,1 mg různě přečištěných homogenátů bylo přibližně stejné (asi 14 – 17 ng/μl u brokolice, 13 – 17 ng/μl u natě cibule, 8 – 13 ng/μl u bulvy cibule).

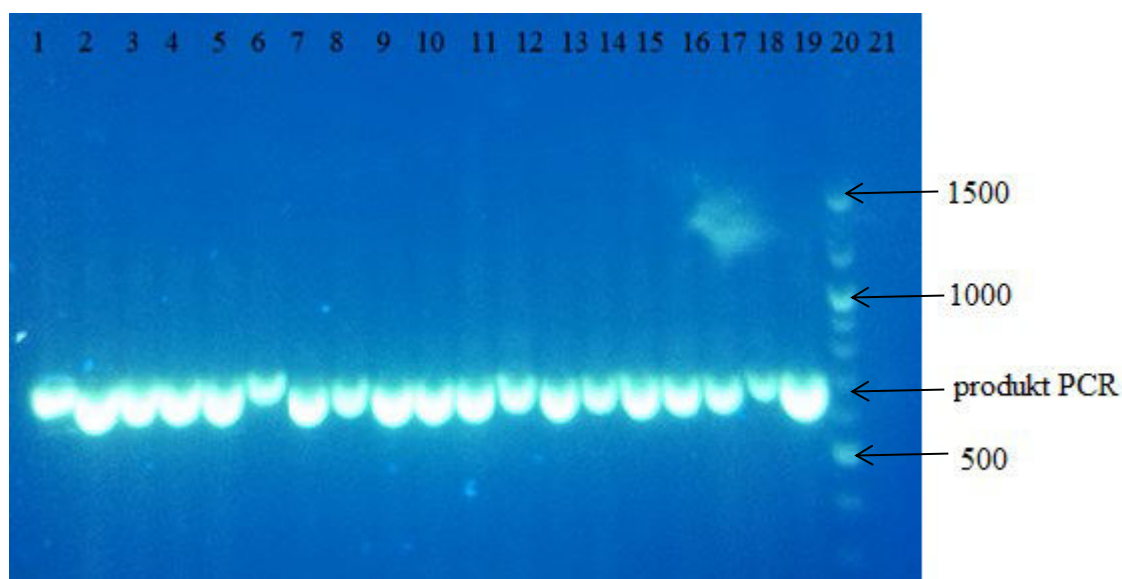
→ Spektra ukazují, že DNA ze všech rostlinných tkání je znečištěna polyfenolickými látkami.

5.2.2 Ověření kvality izolované DNA metodou PCR

DNA uvedené v Tabulce 7 (2 μl) byly použity jako DNA matrice v PCR. PCR byla provedena dle postupů uvedených v kapitole 4.5.7. Produkty PCR byly detegovány pomocí agarózové gelové elektroforézy na 1,2% agaróze.

5.2.2.1 PCR s primery 18S_for a 5,8S_rev

V PCR se amplifikují produkty PCR o délce 700 bp. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 13.



Běh	DNA	1	2	3	DNA (ng)/PCR směs	DNA (ředění 10x)	Detekce produktů PCR
1	brokolice	+	-	-	28	-	++
2					10	+	+++
3		+	+	-	34	-	+++
4					3	+	+++
5		+	+	+	32	-	+++
6					0,4	+	++
7	nať cibule	+	-	-	26	-	+++
8					0,5	+	++
9		+	+	-	34	-	+++
10					5	+	+++
11		+	+	+	30	-	+++
12				1	+	++	
13	cibule bulva	+	-	-	16	-	+++
14					7	+	++
15		+	+	-	26	-	+++
16					1	+	+++
17		+	+	+	22	-	+++
18					2	+	++
19	PK						+++
20	standard						100 bp žebříček
21	NK						-

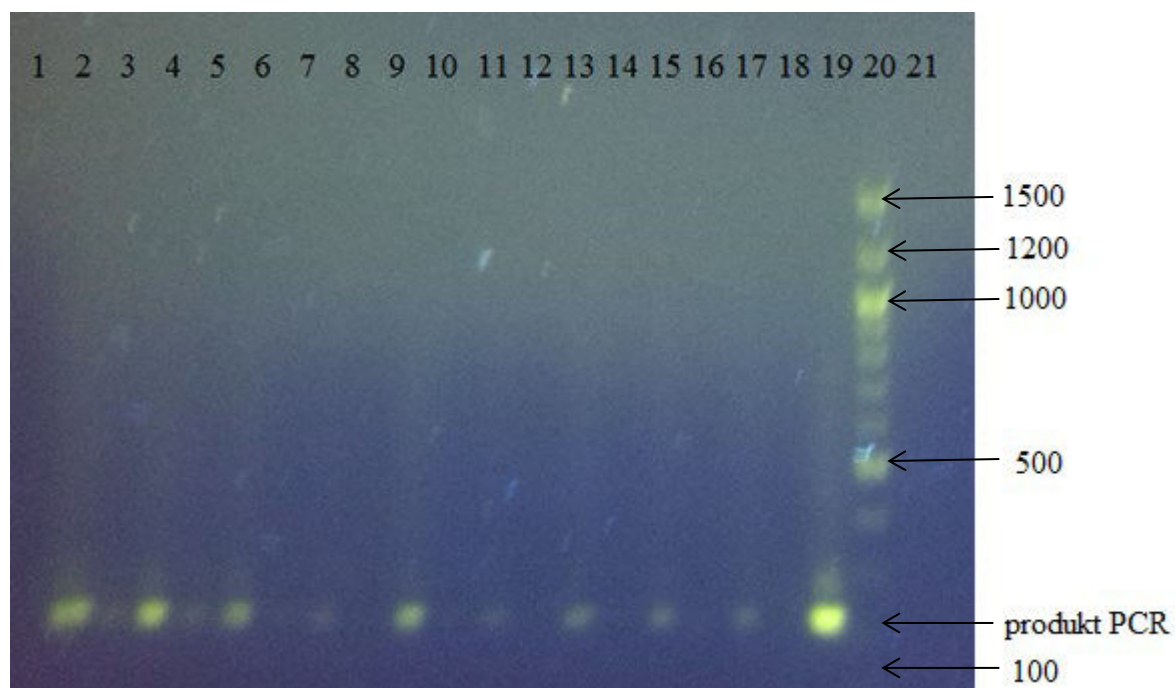
Obrázek 13: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR s využitím primerů 18S_for a 5,8S_rev

Homogenát: 1 - CTAB pufr, 2 - přidavek chloroform-oktanolu, 3 – přidavek isopropanolu
 +, ++, +++: detekce produktu PCR různé intenzity, NK – negativní kontrola
 PK – pozitivní kontrola – *B. oleracea* (10 ng/μl)

→ Produkty PCR vysoké intenzity byly detegovány po amplifikaci všech DNA (neředěných i ředěných). Nebyl pozorován vliv různého způsobu přípravy lyzátů buněk (1, 2, 3).

5.2.2.2 PCR s primery 26S_for a 26S_rev

V PCR se amplifikují produkty PCR o délce 220 bp. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 14.



Běh	DNA	1	2	3	DNA (ng)/PCR směs	DNA (ředění 10x)	Detekce produktů PCR
1	brokolice	+	-	-	28	-	++
2					10	+	+
3		+	+	-	34	-	++
4					3	+	+
5		+	+	+	32	-	++
6					0,4	+	-
7	nať cibule	+	-	-	26	-	+
8					0,5	+	-
9		+	+	-	34	-	++
10					5	+	-
11		+	+	+	30	-	+
12				1	+	-	
13	cibule bulva	+	-	-	16	-	+
14					7	+	-
15		+	+	-	26	-	+
16					1	+	-
17		+	+	+	22	-	+
18				2	+	-	
19	PK						++
20	standard						
21	NK						-

Obrázek 14: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR s využitím primerů 26S_for a 26S_rev

Homogenát: 1 - CTAB pufr, 2 - přídavek chloroform-oktanolu, 3 – přídavek isopropanolu
 +, ++, +++: detekce produktu PCR různé intenzity, NK – negativní kontrola
 PK – pozitivní kontrola – *B. oleracea* (10 ng/μl)

→ Produkty PCR byly detegovány u neřaděných DNA u všech amplifikovaných DNA. Slabé produkty PCR byly detegovány po amplifikaci 10x zředěné DNA izolované jen z brokolice. Detekce PCR produktů byla v závislosti na množství DNA ve směsích pro PCR.

5.2.3 Ověření intaktnosti DNA

Pomocí agarózové gelové elektroforézy na 0,8% agaróze byla ověřena přítomnost izolované rostlinné DNA. Na gel bylo nanášeno 20 μl DNA. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 15.



Běh	DNA	1	2	3	DNA (ng)	Detekce DNA
1	λ DNA				500	+++
2	λ DNA				100	++
3	brokolice	+	-	-	280	+
4		+	+	-	340	+
5		+	+	+	320	-
6	nať cibule	+	-	-	260	-
7		+	+	-	340	+
8		+	+	+	300	-
9	cibule bulva	+	-	-	160	-
10		+	+	-	260	-
11		+	+	+	220	-

Obrázek 15: Izolovaná rostlinná DNA na 0,8% agaróze

Homogenát: 1 - CTAB pufr, 2 - přídavek chloroform-oktanolu, 3 – přídavek isopropanolu

→ Byla detegována kontrolní DNA fága lambda o různých koncentracích (velice intenzivní pásy), DNA izolovaná z brokolice (slabý pás) a DNA izolovaná z cibulové natě (slabý pás). DNA v ostatních vzorcích nebyla vizualizována.

5.3 Testování DNA po dlouhodobém uchovávání

Izolovaná rostlinná DNA, při jejíž izolaci byly použity magnetické mikročástice P(HEMA-co-GMA) (2 mg/ml), byla uchována po dobu 5 měsíců při -20 °C. Následně bylo u

vzorků provedeno spektrofotometrické stanovení koncentrace. Poté byla testována pomocí PCR amplifikovatelnost DNA. Produkty PCR byly detegovány následnou agarózovou gelovou elektroforézou. Výsledné hodnoty na počátku experimentu před dlouhodobým skladováním jsou uvedeny v kapitole 5.2.

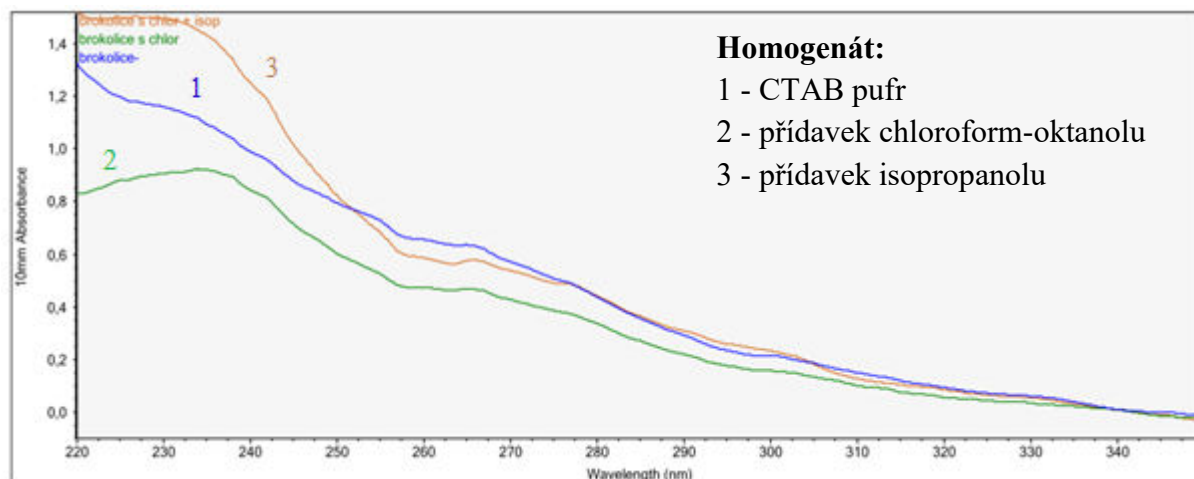
5.3.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Dle postupu uvedeného v kapitole 4.5.4 bylo provedeno spektrofotometrické stanovení. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 8. Na Obrázku 16 – Obrázku 18 jsou graficky znázorněna absorpční spektra DNA izolované z brokolice a cibule.

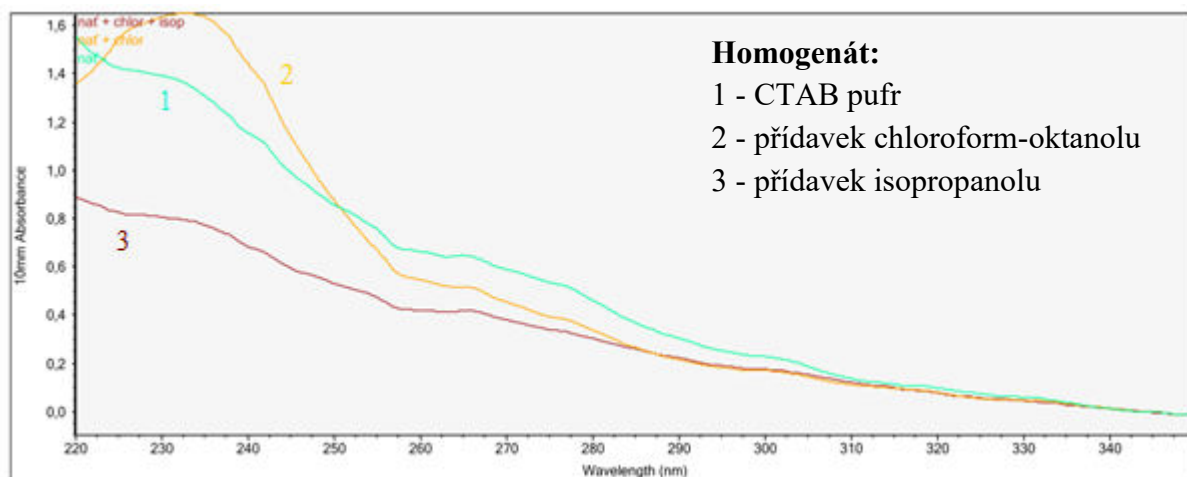
Tabulka 8: Spektrofotometrické stanovení koncentrace rostlinné DNA izolované magnetickými nosiči P(HEMA-co-GMA) ze 100 mg homogenátů

DNA	1	2	3	DNA (ředění 10x)	c (ng/μl)	m _{celk.} (ng)	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{260nm} / A _{280nm}	A _{260nm} / A _{230nm}
brokolice	+	-	-	-	32,3	3230	0,65	0,43	1,50	0,56
				+	7,9					
	+	+	-	-	23,1	2310	0,46	0,33	1,41	0,52
				+	6,2					
	+	+	+	-	28,1	2810	0,58	0,43	1,33	0,39
			+	9,5						
nař cibule	+	-	-	-	32,6	3260	0,65	0,45	1,45	0,47
				+	6,5					
	+	+	-	-	26,7	2670	0,54	0,33	1,64	0,33
				+	8,3					
	+	+	+	-	20,4	2040	0,41	0,29	1,40	0,51
			+	5,4						
cibule bulva	+	-	-	-	14,1	1410	0,28	0,23	1,25	0,65
				+	10,8					
	+	+	-	-	23,3	2330	0,47	0,32	1,46	0,40
				+	3,6					
	+	+	+	-	32,9	3290	0,66	0,48	1,36	0,37
			+	27,5						

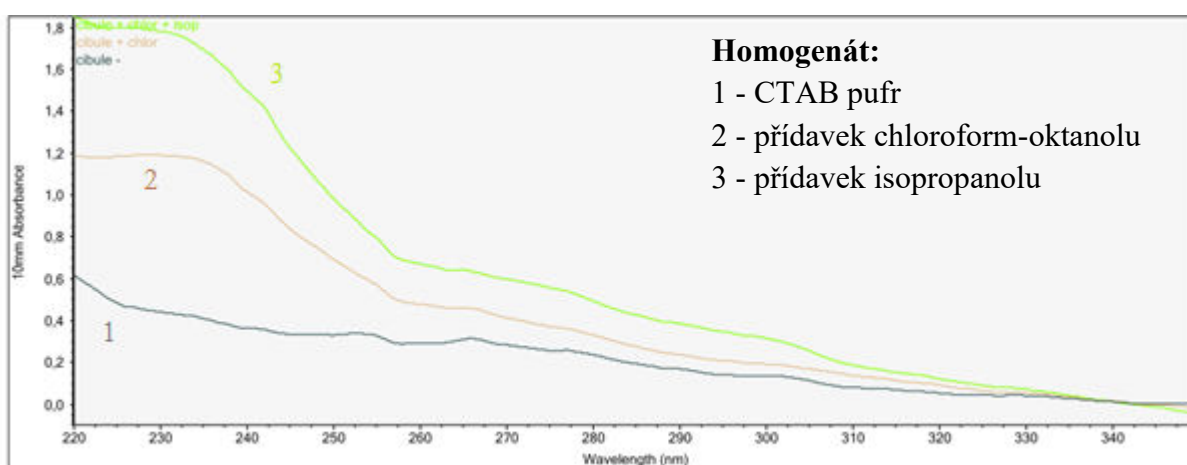
Homogenát: 1 - CTAB pufr, 2 - přídavek chloroform-oktanolu, 3 – přídavek isopropanolu



Obrázek 16: Absorpční spektra DNA izolované z brokolice



Obrázek 17: Absorpční spektra DNA izolované z cibulové natě



Obrázek 18: Absorpční spektra DNA izolované z cibule

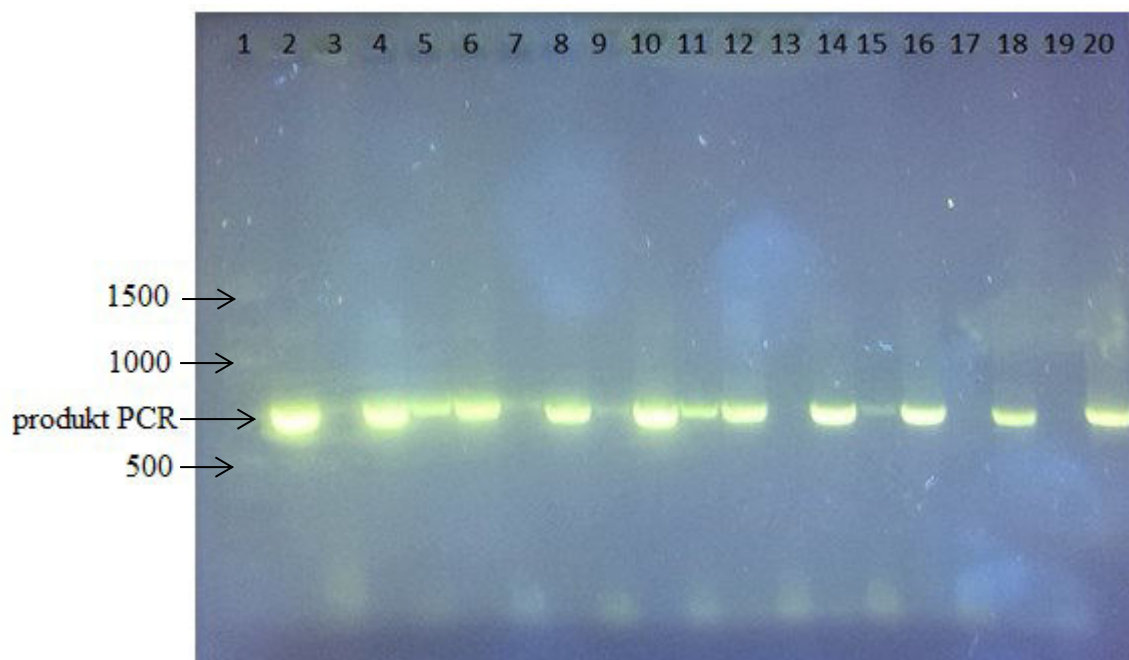
→ Po dlouhodobém uchování DNA (5 měsíců) bylo zjištěno, že její množství přibýlo zřejmě z důvodu dokonalejšího rozpuštění. DNA byla izolována magnetickými nosiči P(HEMA-co-GMA) v množství 14,1 – 32,9 ng/μl. Hodnoty A_{260}/A_{280} byly v rozmezí 1,25 až 1,64. Hodnoty $A_{260nm}/A_{230nm} < 1,2$. DNA byla znečištěna polyfenoly, což dokazují absorpční křivky.

5.3.2 Ověření kvality DNA metodou PCR

Vyizolované DNA uvedené v Tabulce 8 (2 μl) byly použity jako DNA matrice v PCR. PCR byla provedena dle postupů uvedených v kapitole 4.5.7. Produkty PCR byly detegovány pomocí agarózové gelové elektroforézy na 1,2% agaróze.

5.3.2.1 PCR s primery 18S_for a 5,8S_rev

V PCR se amplifikovaly produkty PCR o délce 700 bp. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 19.



Břh	DNA	1	2	3	DNA (ng)/PCR smřs	DNA (ředění 10x)	Detekce produktů PCR
1	standard	+					100 bp řebříček
2	brokolice	+	-	-	65	-	+++
3					16	+	+
4		+	+	-	46	-	++
5					12	+	+
6		+	+	+	58	-	++
7					19	+	+
8	nař cibule	+	-	-	65	-	++
9					13	+	+
10		+	+	-	53	-	+++
11					17	+	+
12		+	+	+	41	-	++
13				11	+	-	
14	cibule bulva	+	-	-	28	-	++
15					22	+	+
16		+	+	-	47	-	++
17					7	+	-
18		+	+	+	66	-	++
19					55	+	-
20	PK						++

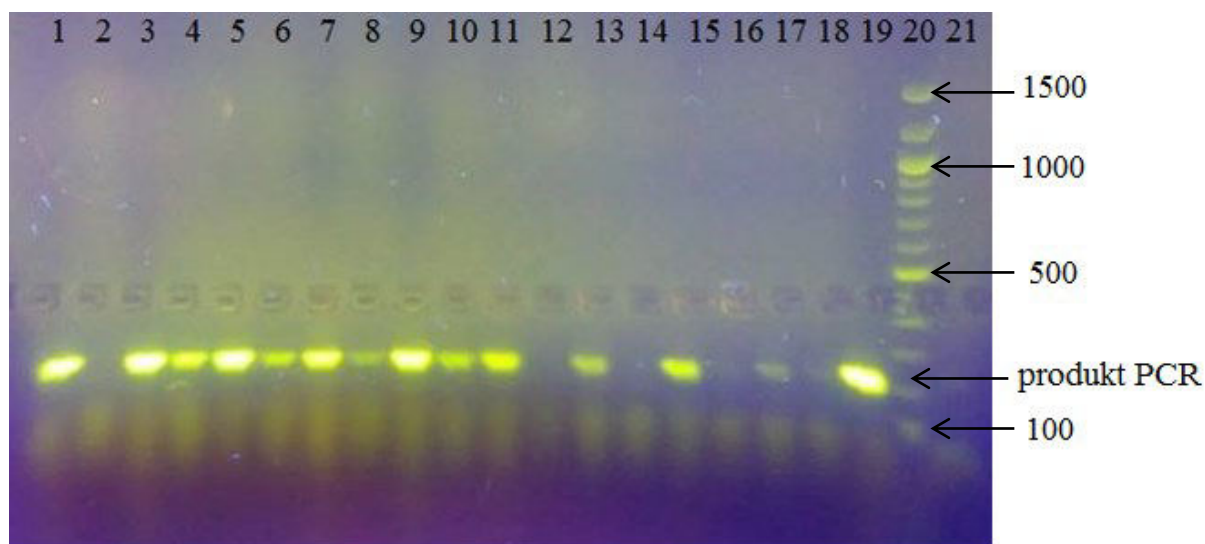
Obrázek 19: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR s využitím primerů 18S_for a 5,8S_rev

Homogenát: 1 - CTAB pufr, 2 - přídavek chloroform-oktanolu, 3 – přídavek isopropanolu
 +, ++, +++: detekce produktu PCR různé intenzity, NK – negativní kontrola
 PK – pozitivní kontrola – *B. oleracea* (10 ng/μl)

→ Dlouhodobé skladování nemělo vliv na amplifikovatelnost. Nebyla prokázána výrazná přítomnost inhibitorů PCR. Neamplifikovalo se pouze malé množství DNA (7 a 11 ng/PCR směs).

5.3.2.2 PCR s primery 26S_for a 26S_rev

V PCR se amplifikují produkty PCR o délce 220 bp. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 20.



Běh	DNA	1	2	3	DNA (ng)/PCR směs	DNA (ředění 10x)	Detekce produktů PCR
1	brokolice	+	-	-	65	-	+++
2					16	+	-
3		+	+	-	46	-	+++
4					12	+	++
5		+	+	+	58	-	+++
6					19	+	++
7	nať cibule	+	-	-	65	-	+++
8					13	+	++
9		+	+	-	53	-	+++
10					17	+	++
11		+	+	+	41	-	++
12				11	+	-	
13	cibule	+	-	-	28	-	++
14					22	+	-
15		+	+	-	47	-	+++
16					7	+	-
17		+	+	+	66	-	+
18					55	+	+
19	PK						+++
20	standard						100 bp žebříček
21	NK						-

Obrázek 20: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR s využitím primerů 26S_for a 26S_rev

Homogenát: 1 - CTAB pufr, 2 - přídavek chloroform-oktanolu, 3 – přídavek isopropanolu
 +, ++, +++: detekce produktu PCR různé intenzity, NK – negativní kontrola
 PK – pozitivní kontrola – *B. oleracea* (10 ng/μl)

→ Produkty PCR byly detegovány po amplifikaci DNA u všech neřaděných vzorků.
 U brokolice byla lepší amplifikovatelnost u DNA izolovaných z homogenátů s přídavkem, chloroform-oktanolu a isopropanolu. U cibule ani cibulové natě tento přídavek neměl žádný vliv.

5.4 Izolace rostlinné DNA z růžičky brokolice magnetickými nosiči

Dále bylo na vybraném vzorku provedeno srovnání magnetických částic P(HEMA-co-GMA) s dalšími magnetickými nosiči. DNA byla izolována testovanými magnetickými částicemi z lyzátů brokolice v CTAB pufru bez přídavku chloroform-oktanolu (1), s přídavkem chloroform-oktanolu (2) a s přídavkem chloroform-oktanolu a isopropanolu (3). DNA byla eluována do 50 μl TE pufru a analyzována spektrofotometricky a pomocí PCR.

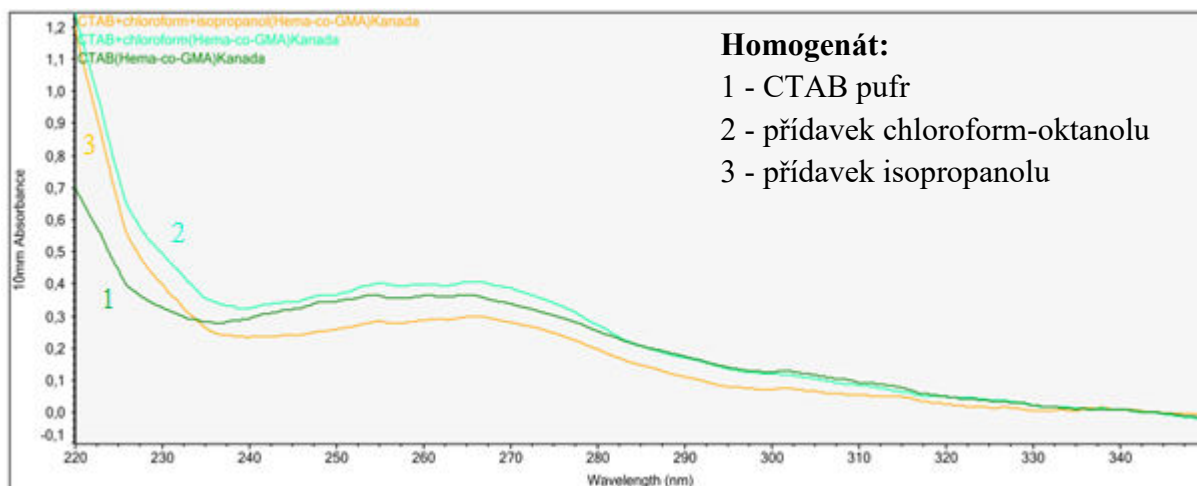
5.4.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Dle postupu uvedeného v kapitole 4.5.4 bylo provedeno spektrofotometrické stanovení. Souhrnné výsledky jsou uvedeny v Tabulce 9. Na Obrázku 21 – Obrázku 24 jsou graficky znázorněna absorpční spektra izolovaných DNA.

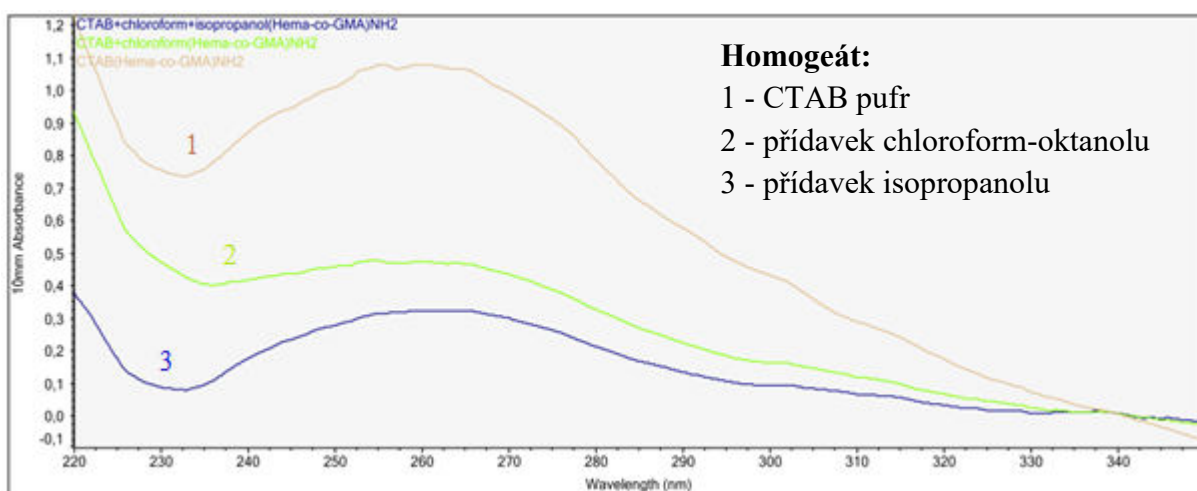
Tabulka 9: Spektrofotometrické stanovení koncentrace rostlinné DNA izolované z brokolice magnetickými nosiči ze 100 mg homogenátů s přídavkem 1, 2, 3

Magnetické částice	1	2	3	c (ng/μl)	m _{celk.} (ng)	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{260nm} /A _{280nm}	A _{260nm} /A _{230nm}
P(HEMA-co-GMA)	+	-	-	23,5	1174	0,47	0,32	1,46	1,66
	+	+	-	25,4	1270	0,51	0,35	1,45	1,14
	+	+	+	21,5	1075	0,43	0,30	1,44	1,60
P(HEMA-co-GMA) NH ₂	+	-	-	63,1	3155	1,26	0,92	1,37	0,93
	+	+	-	61,2	3060	1,23	0,91	1,35	1,19
	+	+	+	42,6	2130	0,85	0,60	1,43	1,74
PLL	+	-	-	15,1	755	0,30	0,18	1,65	1,47
	+	+	-	16,0	800	0,32	0,21	1,56	3,35
	+	+	+	7,5	375	0,15	0,12	1,25	-
PGMA ox	+	-	-	14,7	735	0,29	0,120	1,50	1,33
	+	+	-	15,6	780	0,31	0,25	1,25	0,90
	+	+	+	0,8	40	0,02	0,02	0,77	-

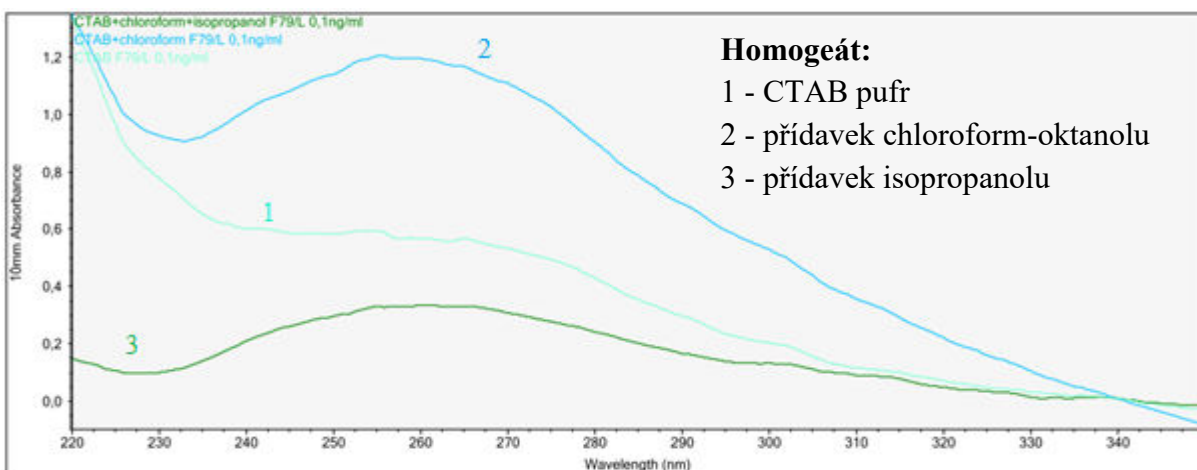
Homogenát: 1 - CTAB pufr, 2 - přídavek chloroform-oktanolu, 3 – přídavek isopropanolu



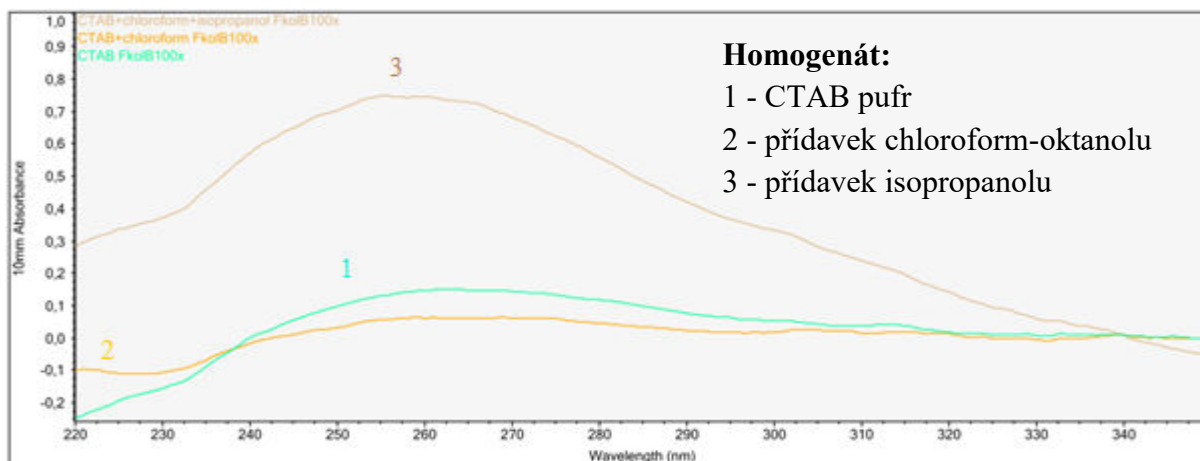
Obrázek 21: Absorpční spektra DNA izolované pomocí magnetického nosiče P(HEMA-co-GMA)



Obrázek 22: Absorpční spektra DNA izolované pomocí magnetického nosiče P(HEMA-co-GMA)NH₂



Obrázek 23: Absorpční spektra DNA izolované pomocí magnetického nosiče PLL



Obrázek 24: Absorpční spektra DNA izolované pomocí magnetického nosiče PGMA ox

→ Byly zjištěny rozdíly mezi nosiči v množství izolované DNA.

→ Nejvyšší množství DNA izolované z brokolice magnetickým nosičem P(HEMA-co-GMA) byla 25,4 ng, Množství DNA izolované pomocí magnetických mikročástic P(HEMA-co-GMA) NH₂ byla 63,1 ng, izolace pomocí nanočástic PLL byla 16,0 ng a pomocí PGMA ox byla 15,6 ng.

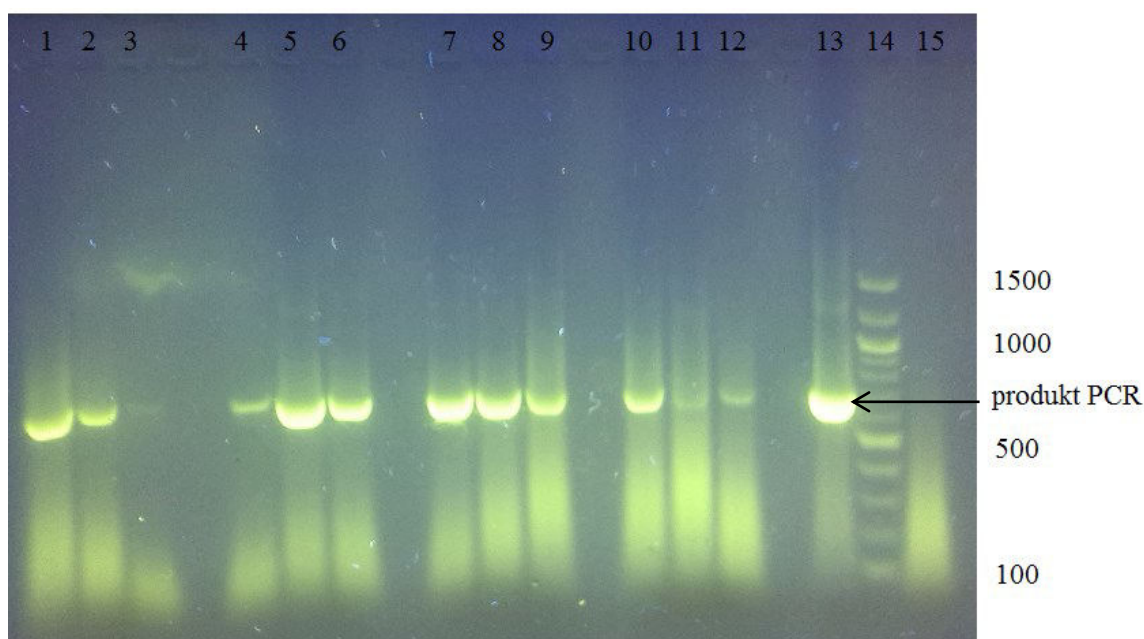
→ Nejvyšší hodnota poměru $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ byla 1,65 s použitím nosičů PLL.

5.4.2 Ověření kvality izolované DNA metodou PCR

Z DNA izolovaných z brokolice uvedených v Tabulce 9 byly připraveny směsi pro PCR s 2 μl DNA matrice a provedena PCR dle postupů uvedených v kapitole 4.5.7. Produkty PCR byly detegovány pomocí agarózové gelové elektroforézy na 1,2% agaróze.

5.4.2.1 PCR s primery 18S_for a 5,8S_rev

V PCR byly amplifikovány produkty PCR o délce 700 bp. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 25.



Běh	DNA	Magnetické částice	1	2	3	DNA (ng)/PCR směs	Detekce produktů PCR
1	brokolice	P(HEMA-co-GMA)	+	-	-	47	++
2			+	+	-	51	++
3			+	+	+	43	+
4		P(HEMA-co-GMA) NH ₂	+	-	-	126	+
5			+	+	-	122	+++
6			+	+	+	85	++
7		PLL	+	-	-	30	+++
8			+	+	-	32	+++
9			+	+	+	15	++
10		PGMA ox	+	-	-	29	++
11			+	+	-	31	+
12			+	+	+	2	+
13	PK					+++	
14	standard					100 bp žebříček	
15	NK					-	

Obrázek 25: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR s využitím primerů 18S_for a 5,8S_rev

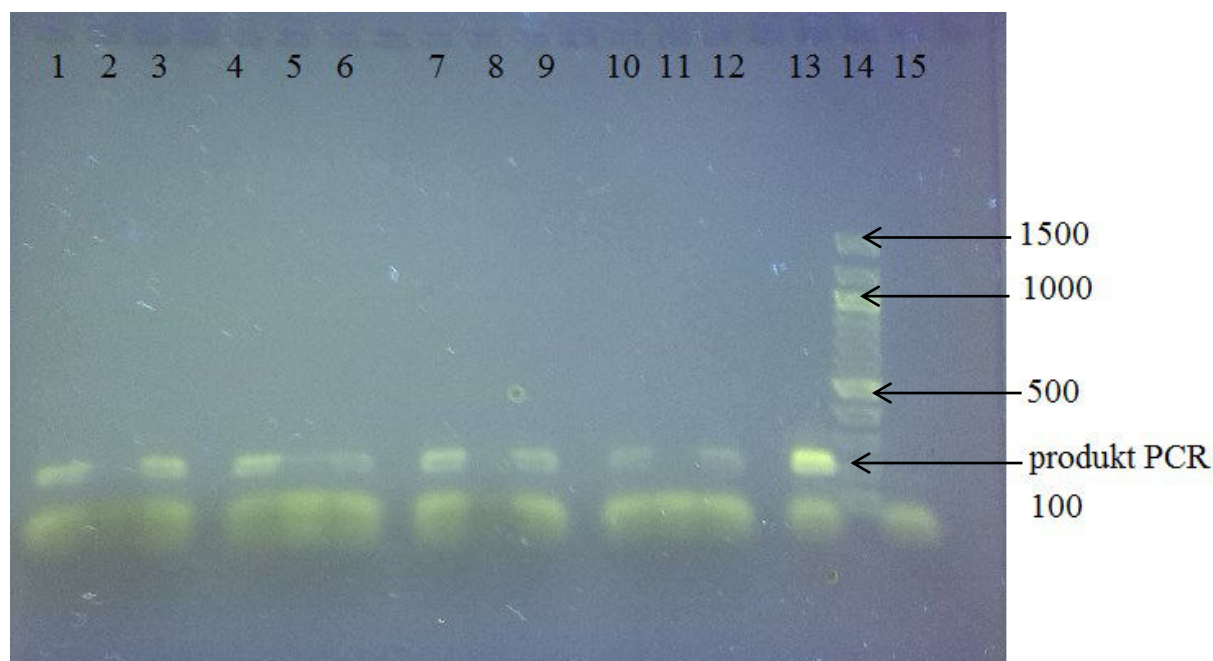
Homogenát: 1 - CTAB pufr, 2 - přídavek chloroform-oktanolu, 3 – přídavek isopropanolu
 +, ++, +++: detekce produktu PCR různé intenzity, NK – negativní kontrola
 PK – pozitivní kontrola – *B. oleracea* (10 ng/μl)

→ DNA byla amplifikována ve všech případech.

→ Intenzivnější produkty byly u PCR, v nichž se amplifikovala DNA izolována pomocí nosičů PLL a P(HEMA-co-GMA)NH₂.

5.4.2.2 PCR s primery 26S_for a 26S_rev

V PCR byly amplifikovány produkty PCR o délce 220 bp. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 26.



Běh	DNA	Magnetické částice	1	2	3	DNA (ng)/PCR směs	Detekce produktů PCR
1	brokolice	P(HEMA-co-GMA)	+	-	-	47	++
2			+	+	-	51	-
3			+	+	+	43	++
4		P(HEMA-co-GMA) NH ₂	+	-	-	126	++
5			+	+	-	122	+
6			+	+	+	85	++
7		PLL	+	-	-	30	++
8			+	+	-	32	-
9			+	+	+	15	++
10		PGMA ox	+	-	-	29	++
11			+	+	-	31	-
12			+	+	+	2	++
13	PK					+++	
14	standard					100 bp žebříček	
15	NK					-	

Obrázek 26: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR s využitím primerů 26S_for a 26S_rev

Homogenát: 1 - CTAB pufr, 2 - přídavek chloroform-oktanolu, 3 – přídavek isopropanolu
 +, ++, +++: detekce produktu PCR různé intenzity, NK – negativní kontrola
 PK – pozitivní kontrola – *B. oleracea* (10 ng/μl)

→ U PCR s využitím primerů 26S_for a 26S_rev nebyly detegovány produkty PCR u DNA vyizolované z homogenátů s přídavkem organického rozpouštědla chloroform-oktanolu.

5.5 Izolace rostlinné DNA z bulvy cibule magnetickými nosiči

DNA byla izolována z lyzátů bulvy cibule v CTAB pufru z homogenátů bez přidavku chloroform-oktanolu (1), s přidavkem chloroform-oktanolu (2) a s přidavkem chloroform-oktanolu a isopropanolu (3) pomocí čtyř druhů magnetických nosičů.

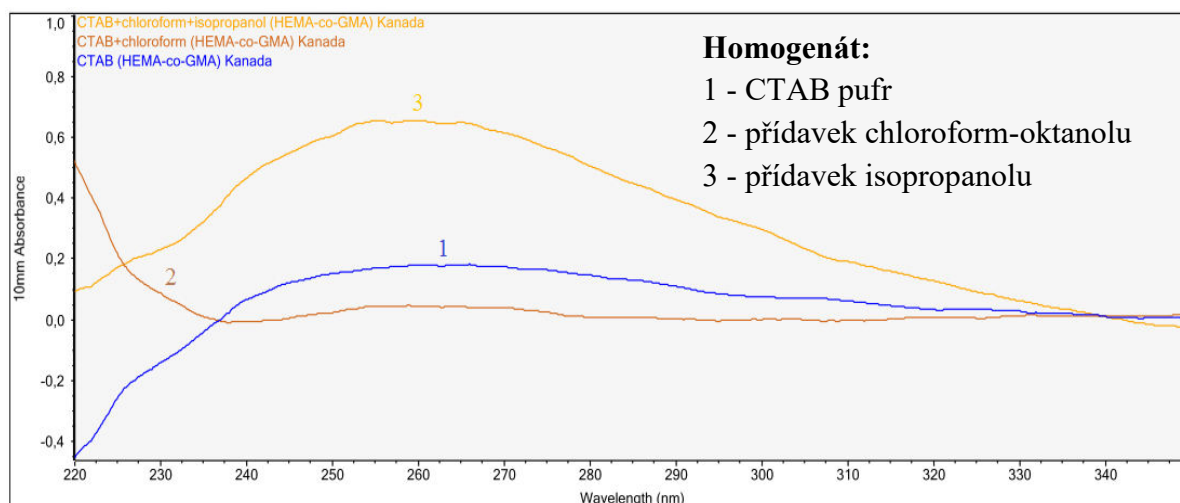
5.5.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Dle postupu uvedeného v kapitole 4.5.4 bylo provedeno spektrofotometrické stanovení. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 10. Na Obrázku 27 – Obrázku 30 jsou graficky znázorněna absorpční spektra izolovaných DNA.

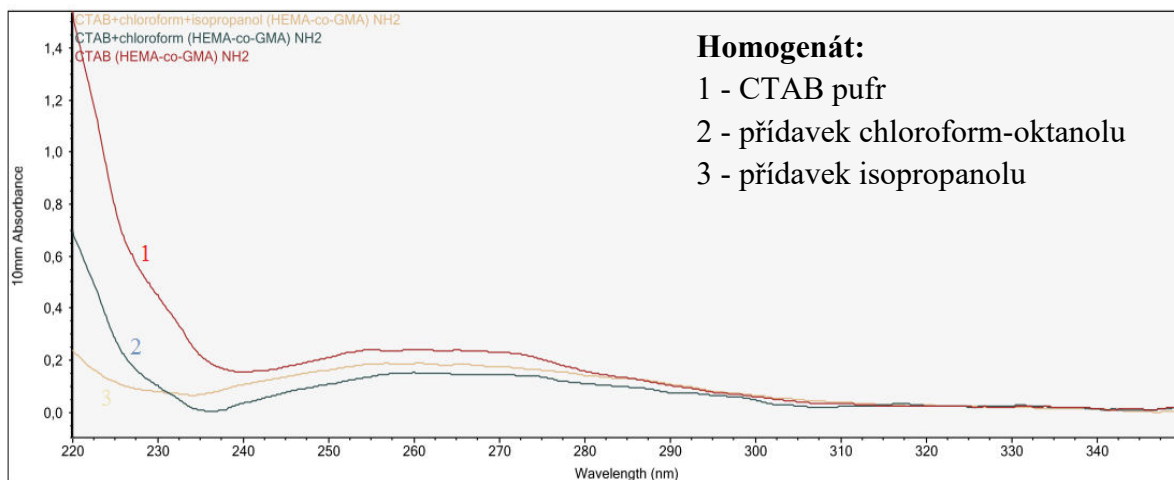
Tabulka 10: Spektrofotometrické stanovení koncentrace rostlinné DNA izolované z bulvy cibule magnetickými nosiči ze 100 mg homogenátů s přidavkem 1, 2, 3

Magnetické částice	1	2	3	c (ng/μl)	m _{celk.} (ng)	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{260nm} /A _{280nm}	A _{260nm} /A _{230nm}
P(HEMA-co-GMA)	+	-	-	8,4	420	0,17	0,14	1,23	-
	+	+	-	1,8	90	0,04	-	-	0,45
	+	+	+	32,3	1615	0,65	0,50	1,30	2,94
P(HEMA-co-GMA) NH ₂	+	-	-	11,3	565	0,23	0,15	1,55	0,51
	+	+	-	7,0	350	0,14	0,10	1,43	1,55
	+	+	+	8,8	440	0,18	0,13	1,35	2,62
PLL	+	-	-	6,7	335	0,14	0,08	1,60	1,04
	+	+	-	3,8	190	0,08	0,07	1,11	-
	+	+	+	0,8	40	0,02	0,01	3,06	-
PGMA ox	+	-	-	46	2300	0,92	0,68	1,35	1,52
	+	+	-	123	6150	2,46	1,83	1,34	1,48
	+	+	+	107,5	5375	2,15	1,62	1,33	1,68

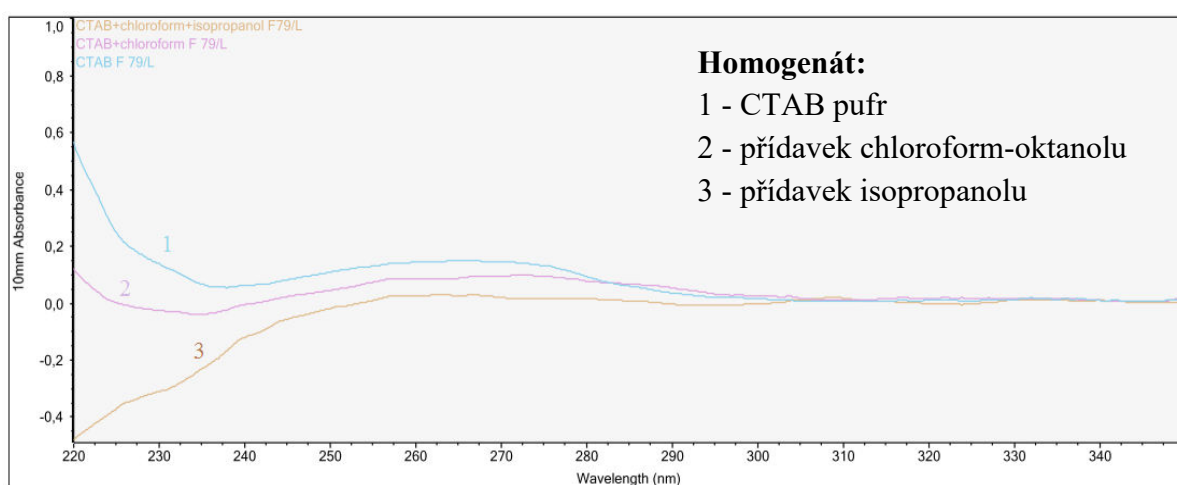
Homogenát: 1 - CTAB pufr, 2 - přidavek chloroform-oktanolu, 3 – přidavek isopropanolu



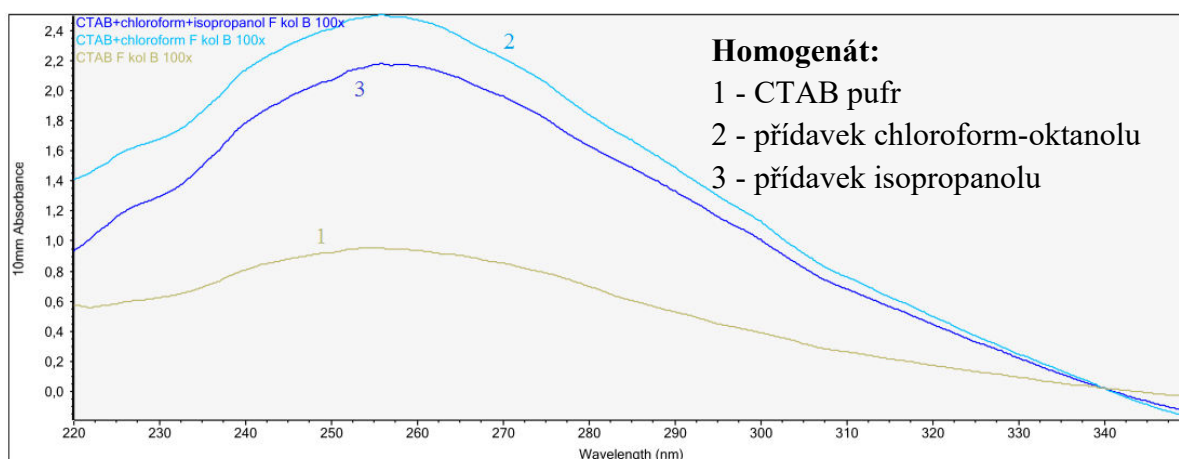
Obrázek 27: DNA izolované pomocí magnetického nosiče P(HEMA-co-GMA)



Obrázek 28: Absorpční spektra DNA izolované pomocí magnetického nosiče P(HEMA-co-GMA)NH₂



Obrázek 29: Absorpční spektra DNA izolované pomocí magnetického nosiče PLL



Obrázek 30: Absorpční spektra DNA izolované pomocí magnetického nosiče PGMA ox

→ Nejvyšší koncentrace DNA izolované z bulvy cibule byla magnetickým nosičem P(HEMA-co-GMA) jako 32,3 ng/μl, Množství DNA izolované pomocí magnetických mikročásteček P(HEMA-co-GMA) NH₂ byla 11,3 ng/μl, izolace pomocí nanočásteček PLL byla 6,7 ng/μl a pomocí PGMA ox byla 123 ng/μl.

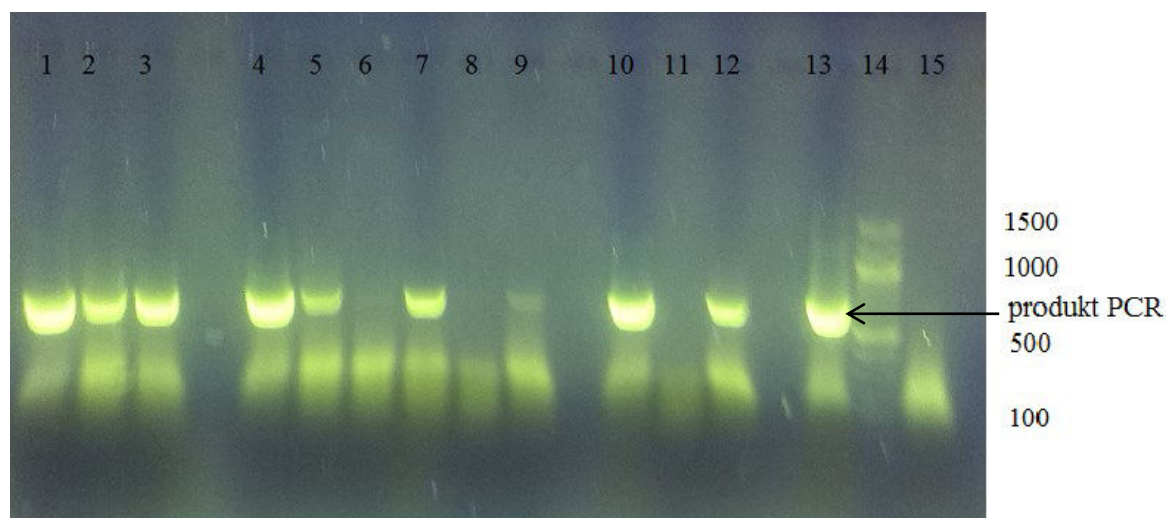
→ Nejvyšší hodnota poměru $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ byla 1,60 s použitím nosičů PLL.

5.5.2 Ověření kvality izolované DNA metodou PCR

Z DNA z bulvy cibule uvedených v Tabulce 10 byly připraveny směsi s 2 μl DNA matrice pro PCR a provedena PCR dle postupů uvedených v kapitole 4.5.7. Produkty PCR byly detegovány pomocí agarózové gelové elektroforézy na 1,2% agaróze.

5.5.2.1 PCR s primery 18S_for a 5,8S_rev

V PCR se amplifikovaly produkty PCR o délce 700 bp. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 31.



Běh	DNA	Magnetické částice	1	2	3	DNA (ng)/PCR směs	Detekce produktů PCR
1	bulva cibule	P(HEMA-co-GMA)	+	-	-	17	+++
2			+	+	-	4	+++
3			+	+	+	65	+++
4		P(HEMA-co-GMA) NH ₂	+	-	-	23	+++
5			+	+	-	14	++
6			+	+	+	18	-
7		PLL	+	-	-	13	++
8			+	+	-	8	-
9			+	+	+	2	+
10		PGMA ox	+	-	-	92	+++
11			+	+	-	246	-
12			+	+	+	215	++
13	PK					+++	
14	standard					100 bp žebříček	
15	NK					-	

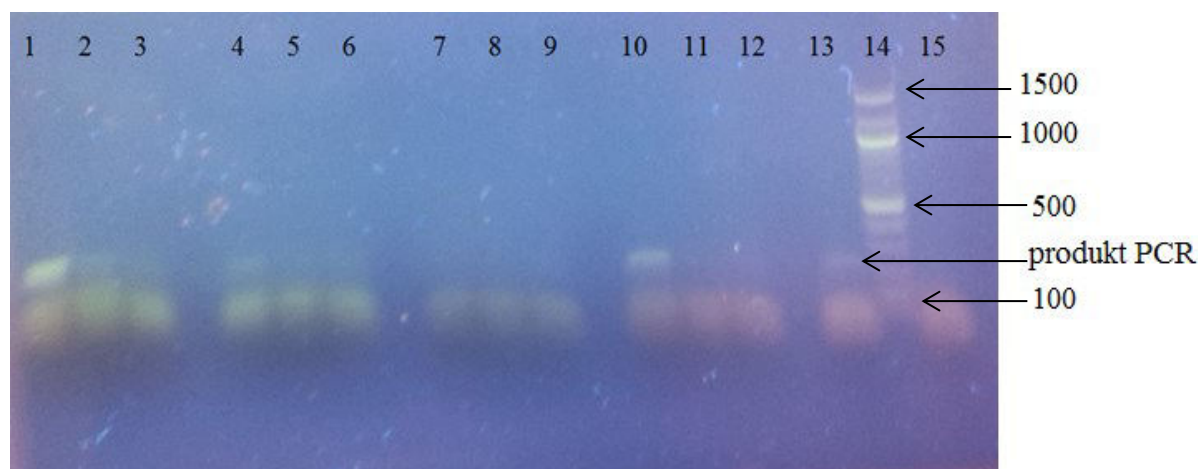
Obrázek 31: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR s využitím primerů 18S_for a 5,8S_rev

Homogenát: 1 - CTAB pufr, 2 - přídavek chloroform-oktanolu, 3 – přídavek isopropanolu
 +, ++, +++: detekce produktu PCR různé intenzity, NK – negativní kontrola
 PK – pozitivní kontrola – *B. oleracea* (10 ng/μl)

→ Většina produktů PCR byla detegována. PCR produkty velmi vysoké intenzity byly detegovány po amplifikaci DNA izolované s využitím mikročástic P(HEMA-co-GMA).

5.5.2.2 PCR s primery 26S_for a 26S_rev

V PCR byly amplifikovány produkty PCR o délce 220 bp. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 32.



Běh	DNA	Magnetické částice	1	2	3	DNA (ng)/PCR směs	Detekce produktů PCR
1	bulva cibule	P(HEMA-co-GMA)	+	-	-	17	++
2			+	+	-	4	+
3			+	+	+	65	+
4		P(HEMA-co-GMA) NH ₂	+	-	-	23	+
5			+	+	-	14	+
6			+	+	+	8	+
7		PLL	+	-	-	13	-
8			+	+	-	8	-
9			+	+	+	2	-
10		PGMA ox	+	-	-	92	++
11			+	+	-	246	-
12			+	+	+	215	-
13	PK					+	
14	standard					100 bp žebříček	
15	NK					-	

Obrázek 32: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR s využitím primerů 26S_for a 26S_rev

Homogenát: 1 - CTAB pufr, 2 - přídavek chloroform-oktanolu, 3 – přídavek isopropanolu
 +, ++, +++: detekce produktu PCR různé intenzity, NK – negativní kontrola
 PK – pozitivní kontrola – *B. oleracea* (10 ng/μl)

→ Ve většině případů nebyly detegovány produkty PCR. Slabé produkty PCR lze pozorovat po amplifikaci DNA izolovaných s využitím nosičů P(HEMA-co-GMA), P(HEMA-co-GMA) NH₂ a PGMA ox.

→ DNA se amplifikovala za vzniku slabých produktů PCR (s výjimkou DNA izolované částicemi PLL).

5.6 Izolace rostlinné DNA z cibulové natě magnetickými nosiči

DNA byla izolována z lyzátů cibulové natě v CTAB pufru z homogenátů bez přidavku chloroform-oktanolu (1), s přidavkem chloroform-oktanolu (2) a s přidavkem chloroform-oktanolu a isopropanolu (3) pomocí čtyř druhů magnetických nosičů.

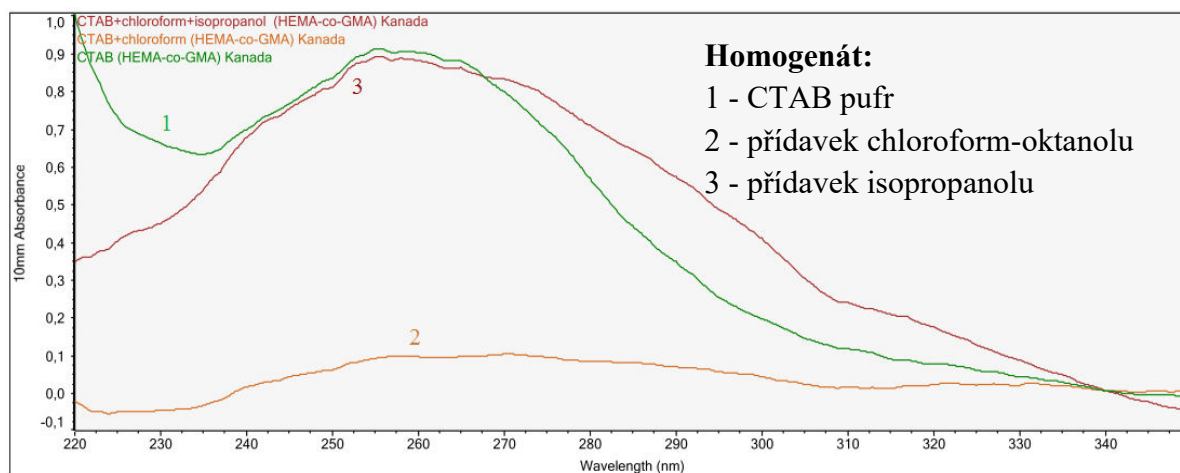
5.6.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Dle postupu uvedeného v kapitole 4.5.4 bylo provedeno spektrofotometrické stanovení. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 11. Na Obrázku 33 – Obrázku 36 jsou graficky znázorněna absorpční spektra izolovaných DNA.

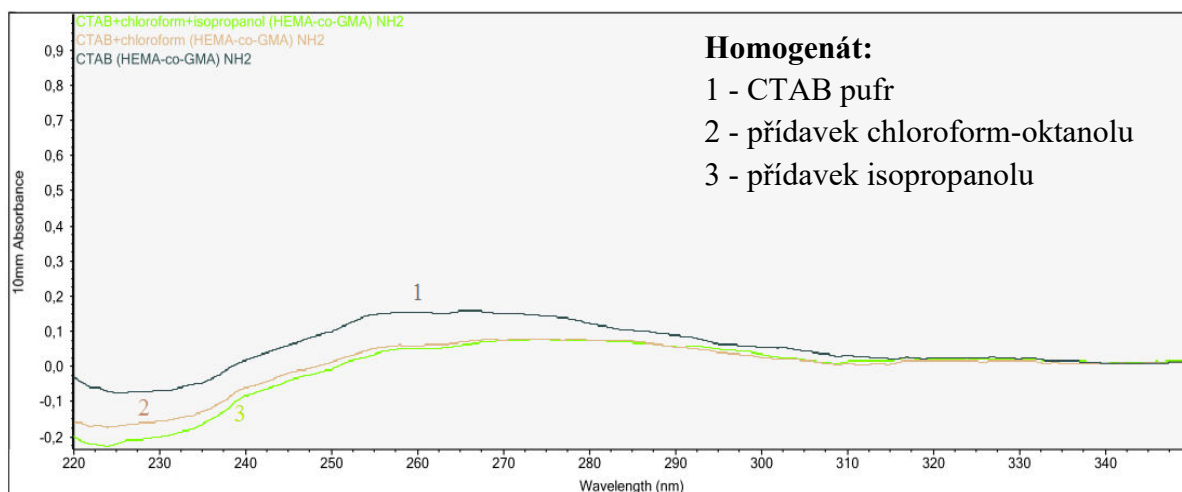
Tabulka 11: Spektrofotometrické stanovení koncentrace rostlinné DNA izolované z cibulové natě magnetickými nosiči ze 100 mg homogenátů s přidavkem 1, 2, 3

Magnetické částice	1	2	3	c (ng/μl)	m _{celk.} (ng)	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{260nm} /A _{280nm}	A _{260nm} /A _{230nm}
P(HEMA-co-GMA)	+	-	-	44,9	2245	0,90	0,56	1,59	1,36
	+	+	-	4,5	225	0,09	0,08	1,17	-
	+	+	+	43,9	2195	0,88	0,71	1,24	1,97
P(HEMA-co-GMA) NH ₂	+	-	-	7,3	365	0,15	0,11	1,28	-
	+	+	-	2,5	125	0,05	0,07	0,75	-
	+	+	+	2,0	100	0,04	0,06	0,64	-
PLL	+	-	-	14,3	715	0,29	0,19	1,52	1,13
	+	+	-	3,1	155	0,06	0,03	1,94	-
	+	+	+	0,5	25	0,01	0,01	0,76	-
PGMA ox	+	-	-	109,7	5485	2,19	1,60	1,37	1,30
	+	+	-	127,7	6385	2,55	1,94	1,32	1,46
	+	+	+	125,5	6275	2,51	1,87	1,34	1,46

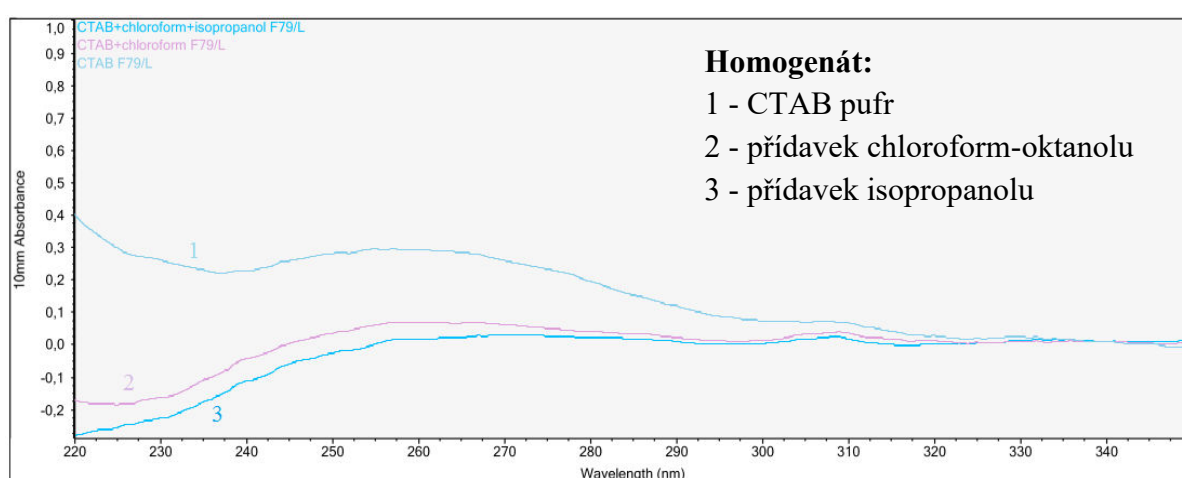
Homogenát: 1 - CTAB pufr, 2 - přidavek chloroform-oktanolu, 3 - přidavek isopropanolu



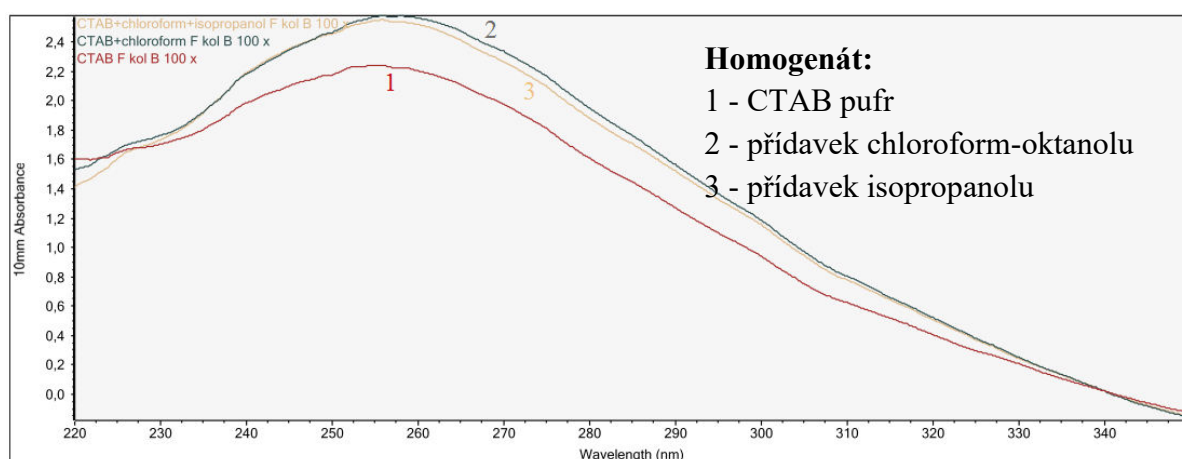
Obrázek 33: Absorpční spektra DNA izolované pomocí magnetického nosiče P(HEMA-co-GMA)



Obrázek 34: Absorpční spektra DNA izolované pomocí magnetického nosiče P(HEMA-co-GMA)NH₂



Obrázek 35: Absorpční spektra DNA izolované pomocí magnetického nosiče PLL



Obrázek 36: Absorpční spektra DNA izolované pomocí magnetického nosiče PGMA ox

→ Nejvyšší množství DNA izolované z cibulové natě bylo získáno magnetickými nanočásticemi PGMA ox z homogenitu připraveného s přidavkem chloroform-oktanolu jako 127,7 ng.

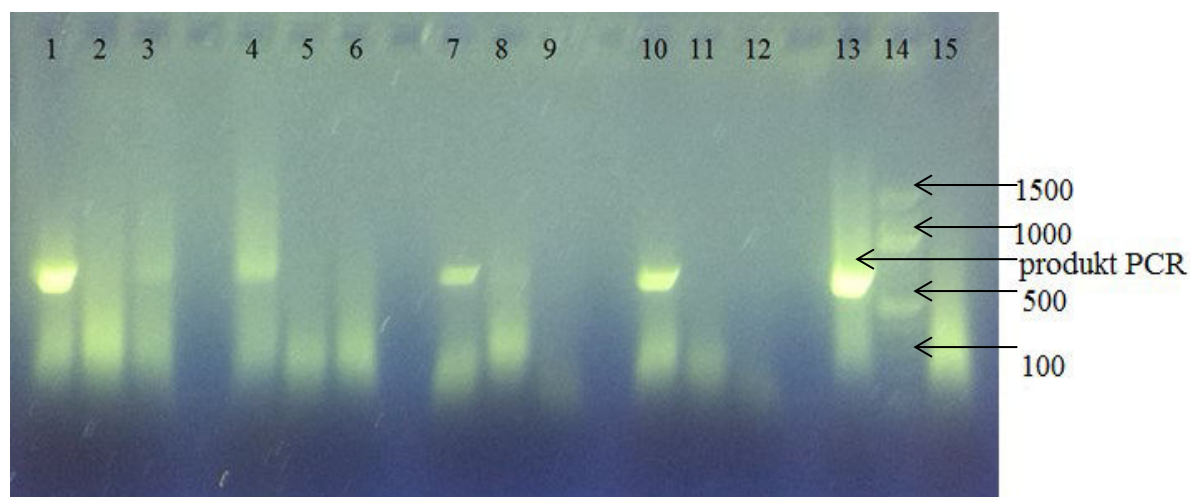
→ Nejvyšší hodnota poměru $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ byla 1,94 u DNA izolované s použitím nanočástic PLL pokrytých polylysinem PLL.

5.6.2 Ověření kvality izolované DNA metodou PCR

Z vyizolovaných DNA z brokolice uvedených v Tabulce 11 byly připraveny směsi s 2 µl DNA matrice pro PCR a provedena PCR dle postupů uvedených v kapitole 4.5.7. Produkty PCR byly detegovány pomocí agarózové gelové elektroforézy na 1,2% agaróze.

5.6.2.1 PCR s primery 18S_for a 5,8S_rev

V PCR byly amplifikovány produkty PCR o délce 700 bp. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 37.



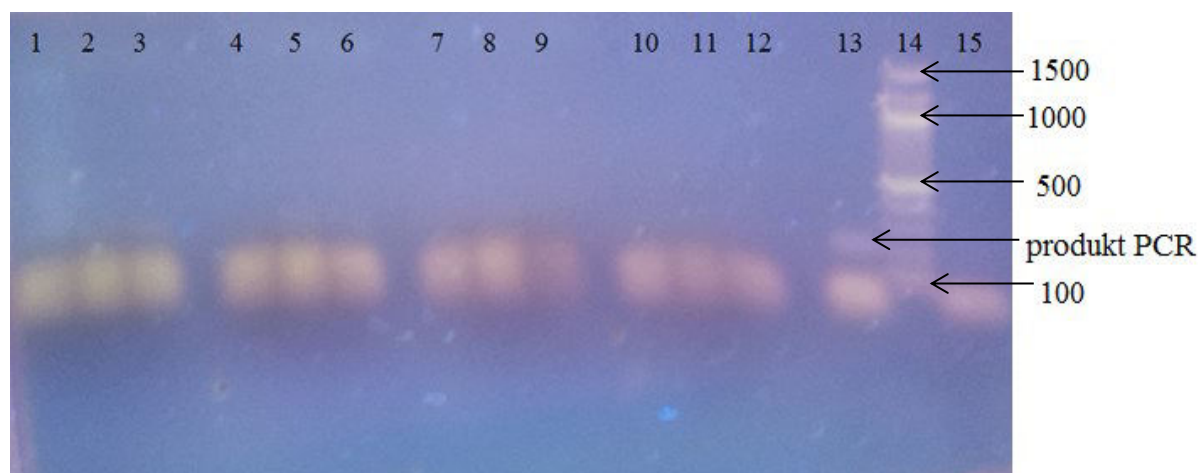
Běh	DNA	Magnetické částice	1	2	3	DNA (ng)/PCR směs	Detekce produktů PCR
1	cibulová nař	P(HEMA-co-GMA)	+	-	-	90	+++
2			+	+	-	9	-
3			+	+	+	88	++
4		P(HEMA-co-GMA) NH ₂	+	-	-	15	++
5			+	+	-	5	-
6			+	+	+	4	-
7		PLL	+	-	-	29	+++
8			+	+	-	6	+
9			+	+	+	1	-
10		PGMA ox	+	-	-	219	+++
11			+	+	-	255	-
12			+	+	+	251	-
13	PK					+++	
14	standard					100 bp žebříček	
15	NK					-	

Obrázek 37: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR s využitím primerů 18S_for a 5,8S_rev
 Homogenát: 1 - CTAB pufr, 2 - přidavek chloroform-oktanolu, 3 – přidavek isopropanolu
 +, ++, +++: detekce produktu PCR různé intenzity, NK – negativní kontrola
 PK – pozitivní kontrola – *B. oleracea* (10 ng/µl)

→ Byly detegovány produkty PCR po amplifikaci DNA izolované z homogenátů s lyzačním pufrům s CTAB (1).

5.6.2.2 PCR s primery 26S_for a 26S_rev

V PCR byly amplifikovány produkty PCR o délce 220 bp. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 38.



Běh	DNA	Magnetické částice	1	2	3	DNA (ng)/PCR směs	Detekce produktů PCR
1	cibulová nať	P(HEMA-co-GMA)	+	-	-	90	+
2			+	+	-	9	-
3			+	+	+	88	+
4		P(HEMA-co-GMA) NH ₂	+	-	-	15	-
5			+	+	-	5	+
6			+	+	+	4	-
7		PLL	+	-	-	29	-
8			+	+	-	6	-
9			+	+	+	1	-
10		PGMA ox	+	-	-	219	-
11			+	+	-	255	-
12			+	+	+	251	-
13	PK					++	
14	standard					100 bp žebříček	
15	NK					-	

Obrázek 38: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR s využitím primerů 26S_for a 26S_rev

Homogenát: 1 - CTAB pufr, 2 - přídavek chloroform-oktanolu, 3 – přídavek isopropanolu
 +, ++, +++: detekce produktu PCR různé intenzity, NK – negativní kontrola
 PK – pozitivní kontrola – *B. oleracea* (10 ng/μl)

→ Byly detegovány pouze produkty PCR izolovaných DNA po amplifikaci s využitím nosičů P(HEMA-co-GMA) a P(HEMA-co-GMA) NH₂.

5.7 Izolace rostlinné DNA z potravinových výrobků

Pro izolaci rostlinné DNA bylo odváženo 100 mg výrobků. DNA byla izolována z lyzátu v CTAB pufru bez přídavku chloroform-oktanolu (1), s přídavkem chloroform-oktanolu (2) a s přídavkem chloroform-oktanolu a isopropanolu (3). K izolaci DNA z výrobku

byly vybrány dva magnetické nosiče: PLL a PGMA ox. DNA byla eluována do 50 μ l TE pufru a analyzována spektrofotometricky a pomocí PCR.

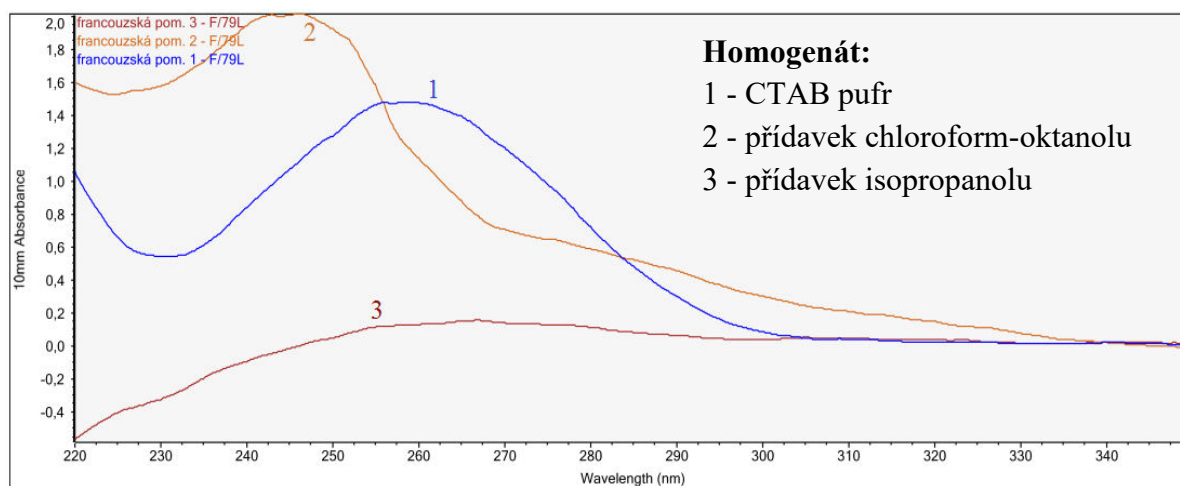
5.7.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Dle postupu uvedeného v kapitole 4.5.4 bylo provedeno spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 12. Na Obrázku 39 – Obrázku 42 jsou graficky znázorněna absorpční spektra izolovaných DNA.

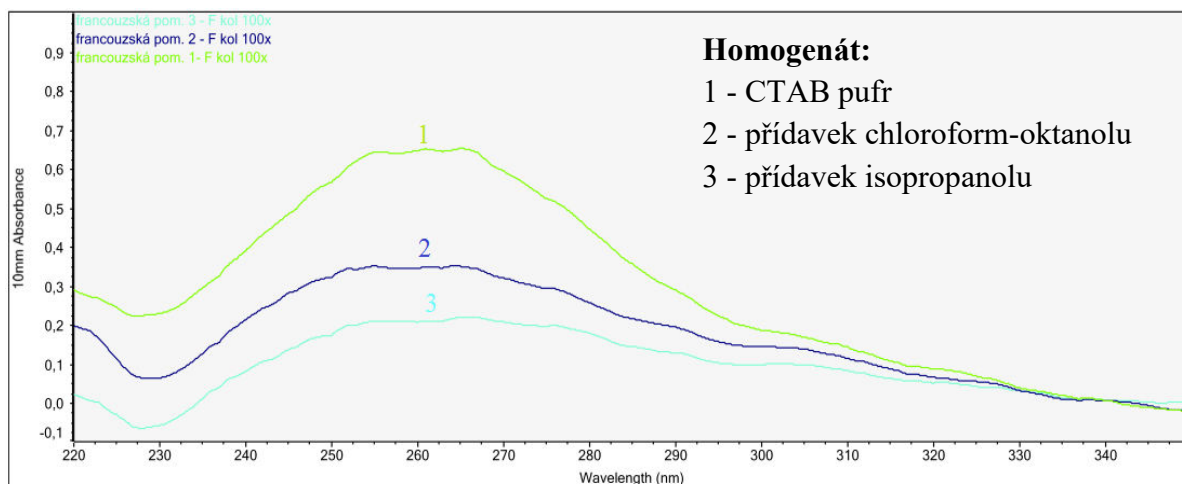
Tabulka 12: Spektrofotometrické stanovení koncentrace rostlinné DNA izolované z potravinových výrobků magnetickými nosiči ze 100 mg homogenátů s přídavkem 1, 2, 3

DNA	Mag. částice	1	2	3	c (ng/ μ l)	m _{celk.} (ng)	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{260nm} /A _{280nm}	A _{260nm} /A _{230nm}
Francouzská pomazánka	PLL	+	-	-	73,1	3655	1,46	0,71	2,07	2,78
		+	+	-	56,2	2810	1,12	0,57	1,96	0,72
		+	+	+	5,5	275	0,11	0,10	1,16	-
	PGMA ox	+	-	-	32,1	1605	0,64	0,44	1,45	2,88
		+	+	-	16,9	845	0,34	0,25	1,34	6,00
		+	+	+	10,1	505	0,20	0,17	1,16	-
Vajíčková pomazánka	PLL	+	-	-	25,2	1260	0,50	0,47	1,07	0,34
		+	+	-	27,5	1375	0,55	0,50	1,10	0,39
		+	+	+	3,0	150	0,06	0,12	0,50	1,74
	PGMA ox	+	-	-	32,8	1640	0,66	0,59	1,11	0,63
		+	+	-	29,5	1475	0,59	0,49	1,21	0,71
		+	+	+	18,0	900	0,36	0,29	1,26	1,61

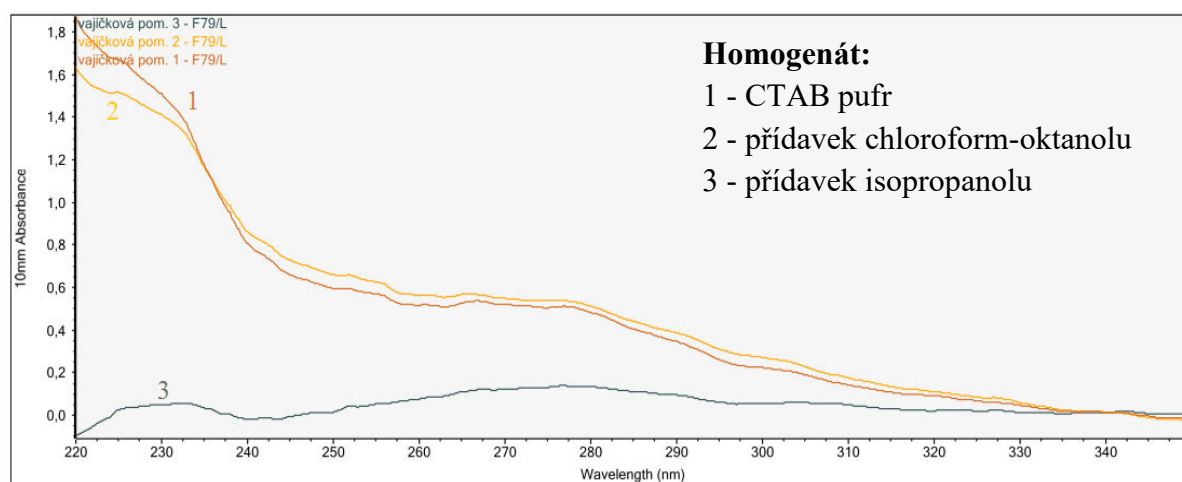
Homogenát: 1 - CTAB pufr, 2 - přídavek chloroform-oktanolu, 3 - přídavek isopropanolu



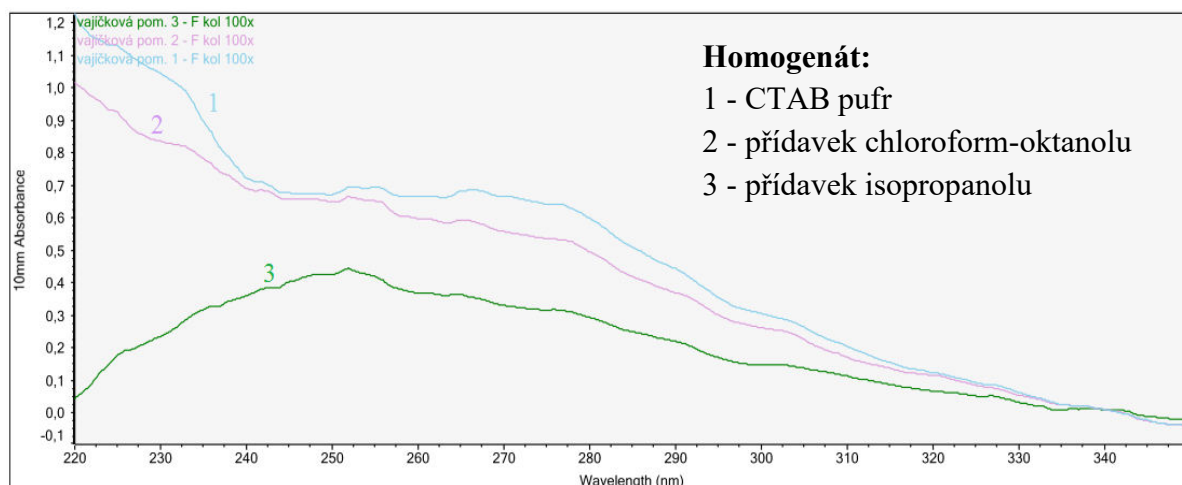
Obrázek 39: Absorpční spektra DNA izolované z Francouzské pomazánky pomocí magnetického nosiče PLL



Obrázek 40: Absorpční spektra DNA izolované z Francouzské pomazánky pomocí magnetického nosiče PGMA ox



Obrázek 41: Absorpční spektra DNA izolované z Vajíčkové pomazánky pomocí magnetického nosiče PLL



Obrázek 42: Absorpční spektra DNA izolované z Vajíčkové pomazánky pomocí magnetického nosiče PGMA ox

→ Vhodné nosiče pro izolaci DNA z Francouzské rostlinné pomazánky jsou PLL. Nejvyšší množství izolované DNA je 73,1 ng/μl. Izolovaná DNA dosahovala hodnot A_{260nm}/A_{280nm} 1,96.

→ Vhodnými magnetickými nosiči pro izolaci DNA z Vajíčkové pomazánky byly magnetické mikročástice PGMA ox, díky kterým se podařilo vyizolovat DNA o koncentraci 32,8 ng/μl. Poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 1,45.

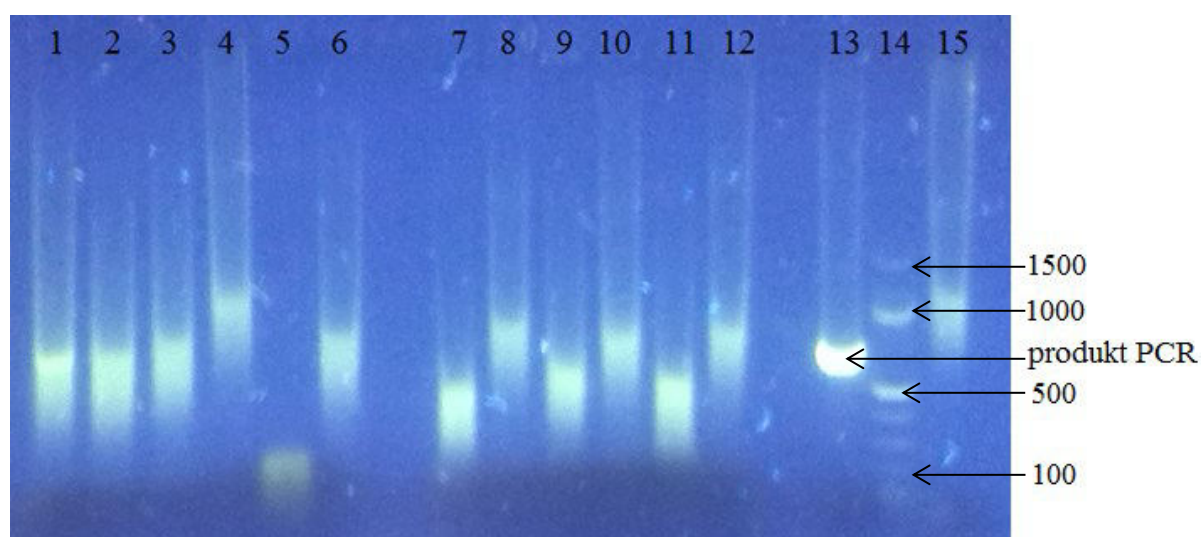
→ Byly zjištěny rozdíly mezi nosiči v množství i čistotě izolované DNA.

5.7.2 Ověření kvality izolované DNA metodou PCR

Z DNA izolovaných z potravinových výrobků uvedených v Tabulce 12, byly připraveny směsi s 2 μl DNA matrice pro PCR a provedena PCR dle postupů uvedených v kapitole 4.5.7. Produkty PCR byly detegovány pomocí agarózové gelové elektroforézy na 1,2% agaróze.

5.7.2.1 PCR s primery 18S_for a 5,8S_rev

V PCR byly amplifikovány produkty PCR o délce 700 bp. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 43 a Obrázku 44.

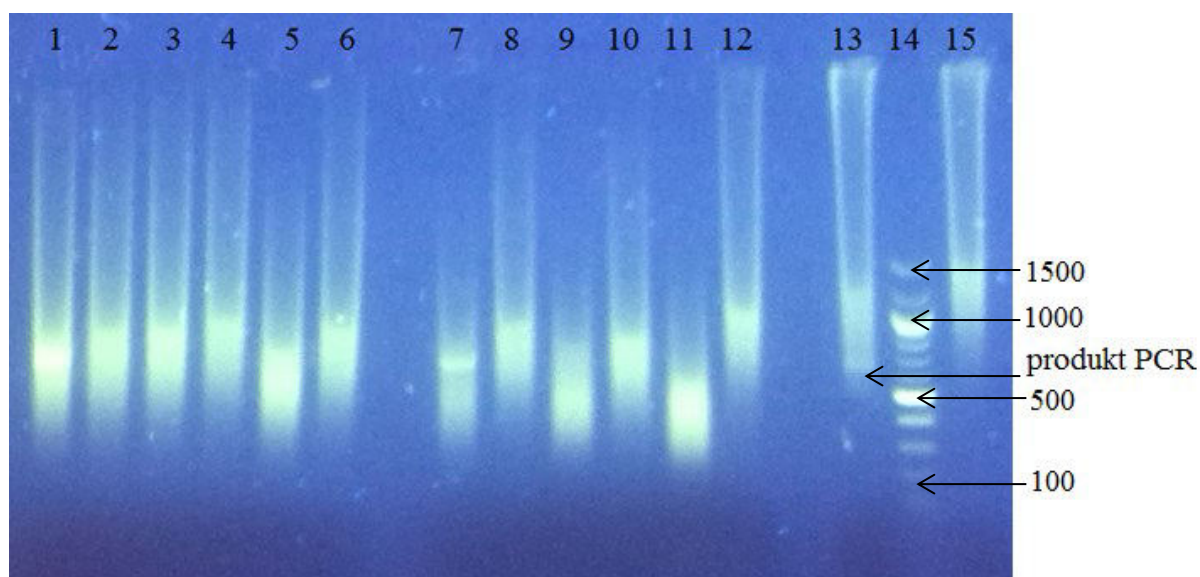


Běh	DNA	Ředění 10x	Magnetické částice	1	2	3	DNA (ng)/PCR směs	Detekce produktů PCR	
1	Francouzská pomazánka	-	PLL	+	-	-	146	+	
2		+							+
3		-		+	+	-	112		+
4		+							-
5		-		+	+	+	11		-
6		+							+
7		-	PGMA ox	+	-	-	64		-
8		+							+
9		-		+	+	-	34		-
10		+							+
11		-		+	+	+	20		-
12		+							++
13	PK							+++	
14	standard							100 bp žebříček	
15	NK							-	

Obrázek 43: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR amplifikovaných z Francouzské pomazánky s využitím primerů 18S_for a 5,8S_rev

Homogenát: 1 - CTAB pufr, 2 - přídavek chloroform-oktanolu, 3 – přídavek isopropanolu
 +, ++, +++: detekce produktu PCR různé intenzity, NK – negativní kontrola
 PK – pozitivní kontrola – *B. oleracea* (10 ng/μl)

→ Převážně byly detegovány produkty PCR po amplifikaci u 10x zředěných vzorků DNA.



Běh	DNA	Ředění 10x	Magnetické částice	1	2	3	DNA (ng)/PCR směs	Detekce produktů PCR
1	Vajíčková pomazánka	-	PLL	+	-	-	50	++
2		+		+	-	-		++
3		-		+	+	-	55	++
4		+		+	+	-		-
5		-		+	+	+	6	-
6		+		+	+	+		-
7		-	PGMA ox	+	-	-	66	+
8		+		+	-	-		-
9		-		+	+	-	59	++
10		+		+	+	-		-
11		-		+	+	+	36	++
12		+		+	+	+		-
13	PK						+	
14	standard						100 bp žebříček	
15	NK						-	

Obrázek 44: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR amplifikovaných z Vajíčkové pomazánky s využitím primerů 26S_for a 26S_rev

Homogenát: 1 - CTAB pufr, 2 - přídavek chloroform-oktanolu, 3 – přídavek isopropanolu
 +, ++, +++: detekce produktu PCR různé intenzity, NK – negativní kontrola
 PK – pozitivní kontrola – *B. oleracea* (10 ng/μl)

→ U Vajíčkové pomazánky byly detegovány produkty PCR po amplifikaci u neředěných vzorků DNA.

5.7.2.2 PCR s primery 26S_for a 26S_rev

V PCR byly amplifikovány produkty PCR o délce 220 bp. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 45 a Obrázku 46.



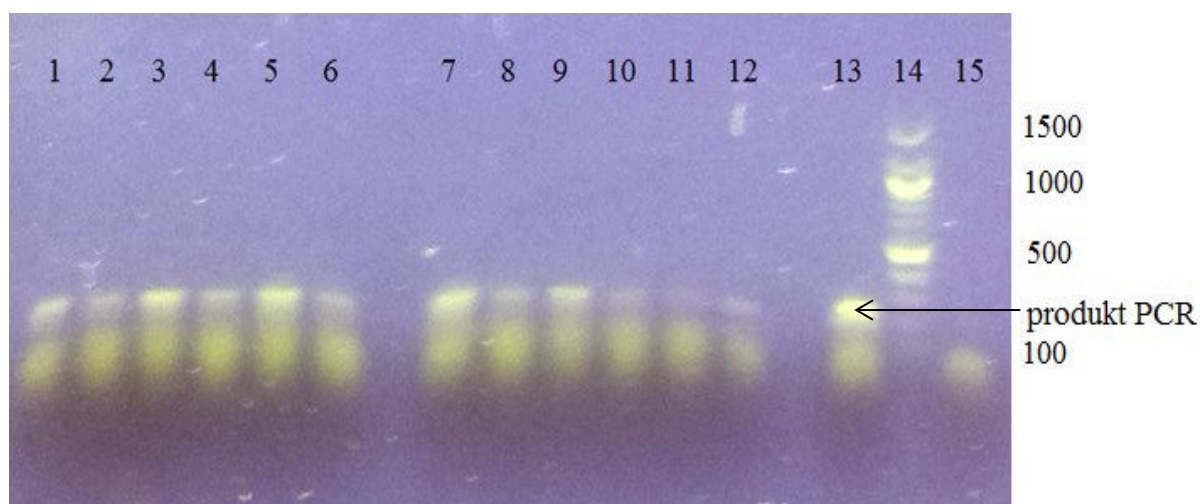
Běh	DNA	Ředění 10x	Magnetické částice	1	2	3	DNA (ng)/PCR směs	Detekce produktů PCR
1	Francouzská pomazánka	-	PLL	+	-	-	146	+++
2		+		+	-	-		++
3		-		+	+	-	112	++
4		+		+	+	-		++
5		-		+	+	+	11	++
6		+		+	+	+		++
7		-	PGMA ox	+	-	-	64	+++
8		+		+	-	-		+
9		-		+	+	-	34	+
10		+		+	+	-		+
11		-		+	+	+	20	++
12		+		+	+	+		-
13	PK						+++	
14	standard						100 bp žebříček	
15	NK						-	

Obrázek 45: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR amplifikovaných z Francouzské pomazánky s využitím primerů 26S_for a 26S_rev

Homogenát: 1 - CTAB pufr, 2 - přídavek chloroform-oktanolu, 3 – přídavek isopropanolu
 +, ++, +++: detekce produktu PCR různé intenzity, NK – negativní kontrola
 PK – pozitivní kontrola – *B. oleracea* (10 ng/μl)

→ Většina produktů byla detegována po amplifikaci neředěné a ředěné DNA.

→ Produkty PCR větší intenzity byly detegovány po amplifikaci DNA izolované nanočásticemi PLL v závislosti na množství DNA v PCR směsi.



Běh	DNA	Ředění 10x	Magnetické částice	1	2	3	DNA (ng)/PCR směs	Detekce produktů PCR
1	Vajíčková pomazánka	-	PLL	+	-	-	50	++
2		+		+	-	-		+
3		-		+	+	-	55	+++
4		+		+	+	-		++
5		-		+	+	+	6	+++
6		+		+	+	+		++
7		-	PGMA ox	+	-	-	66	+++
8		+		+	-	-		++
9		-		+	+	-	59	++
10		+		+	+	-		+
11		-		+	+	+	36	+
12		+		+	+	+		+
13	PK						+++	
14	standard						100 bp žebříček	
15	NK						-	

Obrázek 46: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR amplifikovaných z Vajíčkové pomazánky s využitím primerů 26S_for a 26S_rev

Homogenát: 1 - CTAB pufr, 2 - přídavek chloroform-oktanolu, 3 – přídavek isopropanolu
 +, ++, +++: detekce produktu PCR různé intenzity, NK – negativní kontrola
 PK – pozitivní kontrola – *B. oleracea* (10 ng/μl)

→ Po amplifikaci DNA izolované z Vajíčkové pomazánky byly detegovány produkty PCR.

→ Lze pozorovat rozdíly v intenzitě produktů PCR u 10x zředěných DNA, ve srovnání s neředěnou DNA v závislosti na různém množství DNA/PCR směs.

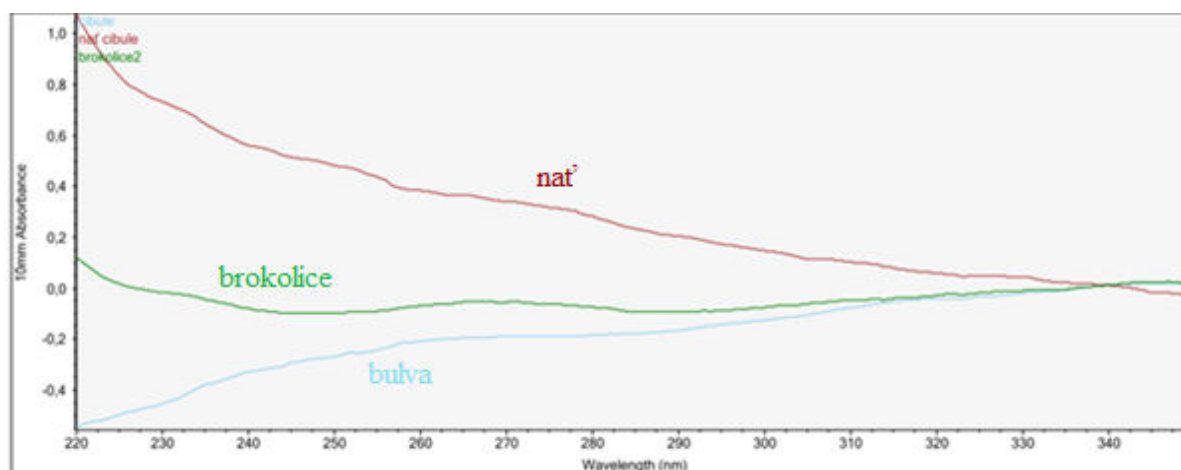
5.8 Ověření intaktnosti DNA

5.8.1 Izolace DNA magnetickým nosičem P(HEMA-co-GMA)

Dle postupu uvedeného v kapitole 4.5.4 byla kvalita přesrážené DNA prověřena spektrofotometricky. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 13. Na Obrázku 47 jsou graficky znázorněna absorpční spektra izolovaných DNA.

Tabulka 13: Spektrofotometrické stanovení koncentrace rostlinné DNA izolované magnetickými nosiči ze 100 mg lyzátu

DNA	c (ng/ μ l)	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{260nm} / A _{280nm}	A _{260nm} / A _{230nm}
brokolice	nízká koncentrace DNA	-	-	0,95	2,90
nať cibule	18,7	0,38	0,28	1,36	0,52
cibule bulva	nízká koncentrace DNA	-	-	1,13	0,47



Obrázek 47: Absorpční spektra přesrážené rostlinné DNA

→ Rostlinná DNA nebyla úspěšně přesrážena.

→ Koncentrace rostlinné DNA nemohla být vzhledem ke kvalitě změřeného spektra vyhodnocena.

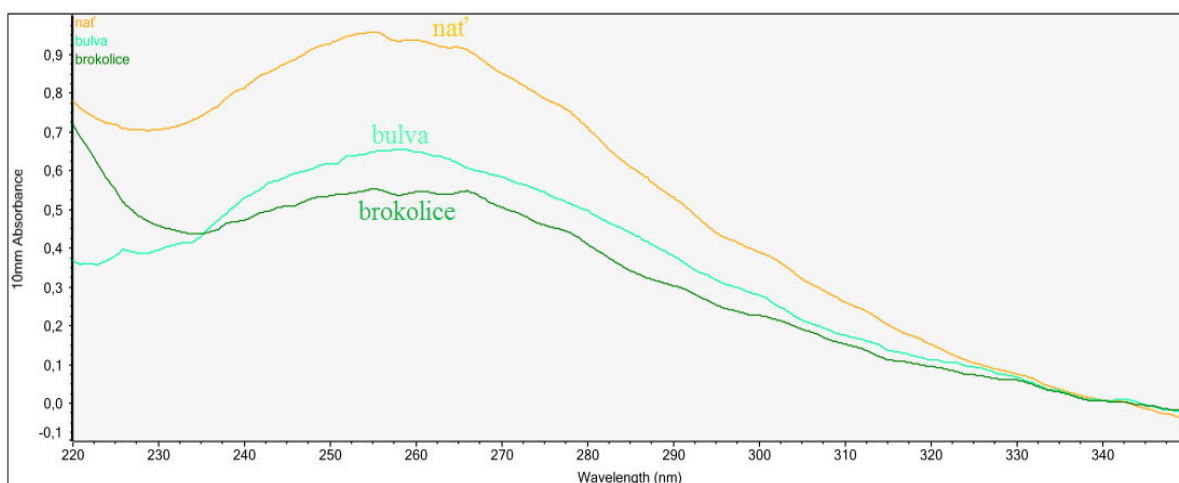
→ Gelová elektroforéza DNA nebyla prováděna.

5.8.2 S využitím různých druhů nosičů

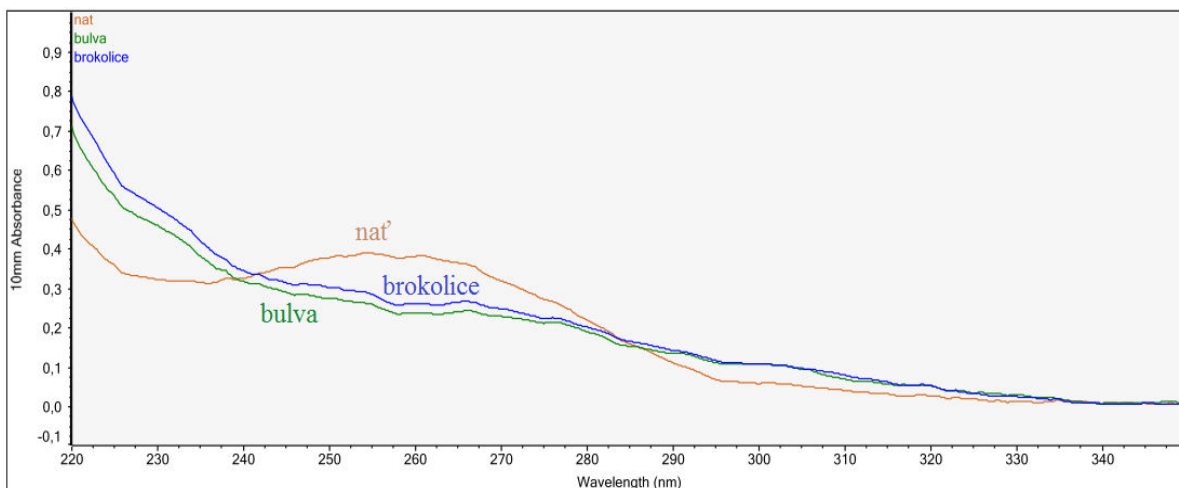
Dle postupu uvedeného v kapitole 4.5.4 byla kvalita přesrážené DNA ověřena spektrofotometricky. Pro ověření intaktnosti byla použita DNA z jednotlivých produktů izolovaná všemi magnetickými nosiči. Vzorke DNA vzhledem k nízké koncentraci DNA byly smíchány dohromady. Výsledky před srážením a po srážení DNA jsou uvedeny v Tabulce 14. Na Obrázku 48 a Obrázku 49 jsou graficky znázorněna absorpční spektra izolovaných DNA.

Tabulka 14: Spektrofotometrické stanovení koncentrace rostlinné DNA magnetickými nosiči ze 100 mg lyzátu

DNA	Stav	c (ng/μl)	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{260nm} /A _{280nm}	A _{260nm} /A _{230nm}
brokolice	před	26,9	0,54	0,41	1,33	1,19
cibule bulva		32,2	0,64	0,49	1,31	1,66
nať cibule		46,6	0,93	0,71	1,32	1,33
brokolice	po	12,7	0,25	0,20	1,30	0,51
cibule bulva		11,5	0,23	0,18	1,26	0,51
nať cibule		18,7	0,38	0,21	1,75	1,18



Obrázek 48: Absorpční spektra původní rostlinné DNA



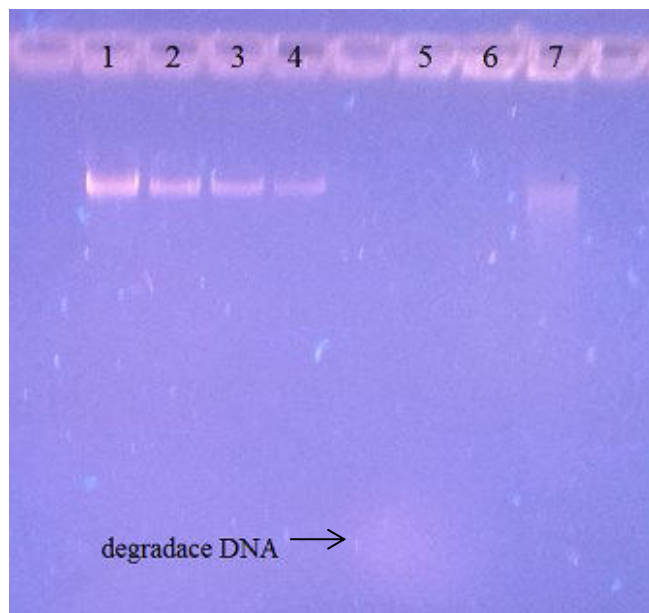
Obrázek 49: Absorpční spektra přesrážené rostlinné DNA

→ Rostlinná DNA nebyla úspěšně přesrážena.

→ Ze spektrofotometrického stanovení je patrné, že větší koncentrace DNA byly před srážením.

5.8.2.1 Gelová elektroforéza

Pomocí agarózové gelové elektroforézy na 0,8% agaróze byla ověřena přítomnost izolované rostlinné DNA. Na gel bylo nanášeno 20 μ l DNA. Jako standard bylo použito známé množství DNA fága λ . Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 50.



Běh	DNA	DNA (ng)	Detekce DNA
1	λ DNA	100	+
2	λ DNA	50	+
3	λ DNA	25	+
4	λ DNA	10	+
5	brokolice	254	-
6	bulva cibule	230	-
7	cibulová nat'	374	+

Obrázek 50: Izolovaná rostlinná DNA na 0,8% agaróze

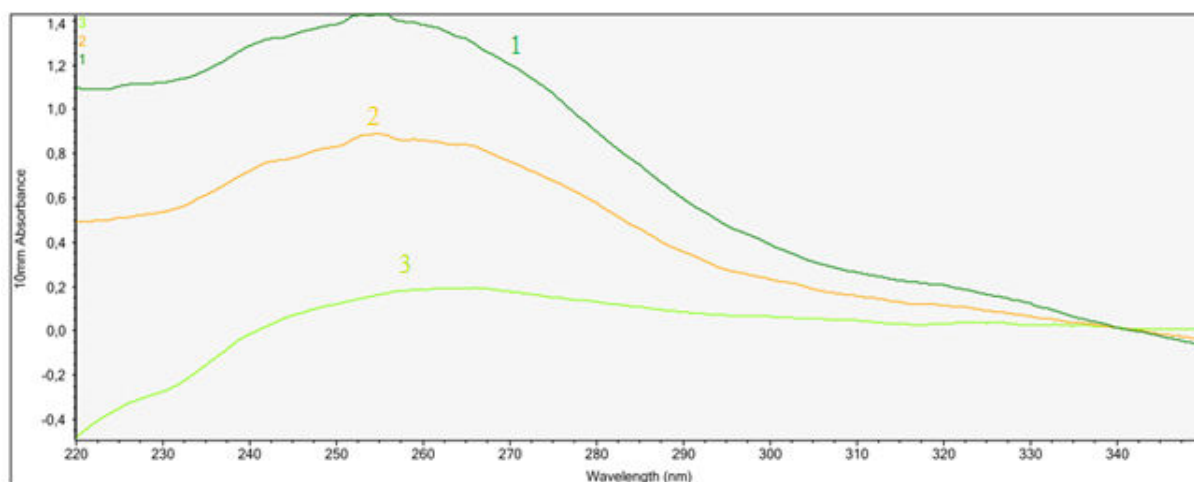
→ V relativně intaktní formě byla detegována DNA izolována z cibulové natě. Značná část DNA izolovaná z brokolice a bulvy cibule byla degradovaná a vizualizovaná jako nízkomolekulární DNA.

5.9 Testování různých množství DNA v separačních směsích s 8% PEG

Bylo provedeno ověření možnosti schopnosti zakoncentrování DNA pomocí magnetických nanočástic PLL o koncentraci 0,1 mg/ml. Podle postupu uvedeného v kapitole 4.5.6 bylo provedeno spektrofotometrické stanovení. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 15. Na Obrázku 51 jsou graficky znázorněna absorpční spektra izolovaných DNA.

Tabulka 15: Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA z telecího brzlíku zakoncentrovaná různými magnetickými nosiči

Mag. částice	Směs	Objem (μl) DNA TT (25 ng/ μl)	$m_{\text{celk. DNA}}$ (μl)	c (ng/ μl)	$m_{\text{celk.}}$ (ng)	Návratnost (%)	Zakoncentrováno
PLL	1	300	7500	68,7	6870	92	2,7x
	2	150	3750	42,5	4250	113	1,7x
	3	75	1875	8,6	860	46	0,3x



Obrázek 51: Absorpční spektra DNA telecího brzlíku

→ U první separační směsi s množstvím TT DNA 300 μl (objem separační směsi 1000 μl) a druhé separační směsi s množstvím TT DNA 150 μl (objem separační směsi 500 μl) došlo k zakoncentrování DNA.

6 DISKUZE

6.1 Příprava rostlinného materiálu pro analýzu

Z 0,1 g rostlinné tkáně byla metodou přímé homogenizace z homogenátů (lyzátů buněk) v roztoku s CTAB (1), CTAB s přídavkem chloroform-oktanolu (2) a s CTAB s přídavkem chloroform-oktanolu a isopropanolu (3) provedena izolace. Modifikovaná metoda s CTAB se využívá pro izolaci rostlinné DNA, která obsahuje velké množství polysacharidů, proteinů a polyfenolů [50]. U vzorků, ke kterým byl po homogenizaci přidán chloroform-oktanol, došlo k oddělení fází.

6.2 Izolace rostlinné DNA magnetickým nosičem P(HEMA-co-GMA)

DNA byla izolována z různě připravených lyzátů buněk (homogenátů) s použitím magnetického nosiče P(HEMA-co-GMA). Pro zjištění koncentrace a čistoty rostlinné DNA bylo provedeno měření absorbance na NanoDropu 2000 v rozmezí vlnových délek 230 – 320 nm. Pro čistou DNA (vhodnou pro další použití při amplifikaci) by poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ měl být 1,8 – 2,0. Pokud je poměr absorbancí nižší než 1,8, je zde znečištění proteiny, je-li poměr vyšší jak 2,0, DNA je znečištěna RNA [28]. Dalším ukazatelem čistoty DNA je poměr $A_{230\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$, který by měl být v rozmezí 1,8-2,2. Pokud se naměřená hodnota liší, DNA je znečištěna solemi, fenoly, polysacharidy nebo proteiny [51]. Dle získaných výsledků, uvedených v Tabulce 7 bylo zjištěno, že nejvyšší naměřená koncentrace DNA byla u brokolice z homogenátu připraveném v roztoku CTAB s přídavkem chloroform-oktanolu. Koncentrace byla 17,2 ng/μl. Poměr absorbancí při vlnových délkách $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ byl 1,74. Nejvyšší čistotu měla DNA izolovaná z cibulové natě, kde poměr absorbancí byl 1,8. Koncentrace tohoto vzorku DNA byla 13,2 ng/μl. Bylo zjištěno, že i u ostatních analyzovaných vzorků měl přídavek chloroform-oktanolu příznivý vliv. Absorpční spektra ukazují, že DNA izolovaná ze všech rostlinných tkání byla znečištěna proteiny či polyfenoly. Proteiny mají absorpční maximum při 280 nm a polyfenoly absorbují při 240-280 nm, tudíž hodnoty absorbancí a koncentrací mohou být vyšší díky těmto látek [48, 49]. Po amplifikaci byly ale produkty PCR ve většině případů detegovány. Při PCR, kde se amplifikovaly produkty o délce 700 bp (Obrázek 13) byly detegovány produkty PCR ve vysoké intenzitě, tudíž nebyl pozorován vliv různého způsobu přípravy lyzátů buněk (1, 2, 3). U PCR při použití specifických primerů pro amplifikaci produktů o délce 220 bp (Obrázek 14) došlo k amplifikaci všech produktů pouze u neředěné DNA. Po vyředění DNA bylo menší množství DNA izolované z natě a bulvy cibule nedostatečné. Dále bylo ve spodní části elektroforeogramu možné pozorovat intenzivní pásy, které představovaly dimery primerů. Samostatná DNA při ověření intaktnosti DNA byla degradovaná (Obrázek 15), a tudíž její značná část nebyla na gelu vizualizovaná. Tato degradace mohla mít rovněž vliv na amplifikaci DNA.

6.3 Testování DNA po dlouhodobém uchovávání

Chování DNA uchovávané po dobu 5 měsíců při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bylo testováno spektrofotometrickým stanovením a amplifikací metodou PCR. Z výsledků uvedených v Tabulce 8 vyplývá, že nejvyšší naměřená koncentrace DNA byla u DNA izolované z bulvy cibule po přidavku chloroform-oktanolu a isopropanolu. Koncentrace byla $32,9\text{ ng}/\mu\text{l}$ a poměr absorbancí při vlnových délkách $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ byl 1,36. Podobné výsledky poskytuje DNA izolována z brokolice a cibule pouze s využitím homogenátu s lyzačním roztokem CTAB. Žádný ze vzorků DNA nedosahoval poměru absorbancí hodnoty 1,8. Všechny vzorky byly znečištěny. Největší čistoty dosáhla DNA izolovaná ze zelené cibulové natě s přidavkem chloroform-oktanolu. U všech vzorků DNA došlo ke zvýšení koncentrace DNA, zřejmě díky dlouhodobému rozpouštění. Dlouhodobé skladování nemělo vliv na amplifikovatelnost. Produkty PCR ($28 - 66\text{ ng}/\text{PCR}$ směs) výrazné intenzity byly detegovány po amplifikaci DNA u všech neřaděných vzorků. Produkty PCR ($12 - 22\text{ ng}/\text{PCR}$ směs) nízké intenzity byly detegovány po amplifikaci 10x zředěných vzorků. U bulvy cibule, kde byla amplifikována 10x zředěná DNA ($7\text{ ng}/\text{PCR}$ směs) a natě cibule ($11\text{ ng}/\text{PCR}$ směs), nebyl produkt PCR detegován. Toto množství DNA ve směsi pro PCR nebylo za daných experimentálních podmínek dostatečné pro detekci produktů PCR agarózovou elektroforézou.

6.4 Izolace rostlinné DNA z růžičky brokolice magnetickými nosiči

DNA byla izolována z různě připravených lyzátů buněk (homogenátů) připravených z růžiček brokolice. Pro izolaci DNA byly použity magnetické mikročástice poly(2-hydroxyethyl methakrylát-*co*-glycidyl methakrylátu) - P(HEMA-*co*-GMA), poly(2-hydroxyethyl methakrylát-*co*-glycidyl methakrylátu) pokryté -NH_2 skupinami - P(HEMA-*co*-GMA) NH_2 , magnetické nanočástice oxidů železa pokryté poly(L.lysinem) - PLL a poly(glycidyl methakrylátu) - PGMA ox pokryté karboxylovými skupinami.

Pro zjištění koncentrace a čistoty rostlinné DNA bylo provedeno spektrofotometrické stanovení. Nejvyšší koncentrace DNA byla u DNA z brokolice izolované s využitím magnetických nosičů P(HEMA-*co*-GMA) NH_2 z homogenátu pouze roztoku CTAB. Koncentrace byla $63,1\text{ ng}/\mu\text{l}$. Poměr absorbancí při vlnových délkách $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ byl 1,37. Bylo zjištěno, že přidavek chloroform-oktanolu a isopropanolu nemá příznivý vliv na množství izolované DNA. Výtěžky jsou závislé také na zvolených magnetických nosičích. Absorpční spektra ukazují, že DNA izolována z brokolice byla znečištěna proteiny, polyfenoly, případně dalšími látkami [7].

U amplifikace DNA s využitím primerů 18S_for a 5,8_rev s předpokládaným produktem 700 bp (Obrázek 25) byly intenzivnější produkty PCR, při kterých byla použita DNA izolována pomocí nosičů PLL a P(HEMA-*co*-GMA) NH_2 . U PCR s využitím primerů 26S_for a 26S_rev pro produkty PCR o délce 220 bp (Obrázek 26) nebyly v některých případech produkty PCR detegovány, zejména při izolaci DNA z homogenátů, s přidavkem organického rozpouštědla chloroform-oktanolu. Souvisí to zřejmě s koextrakcí nežádoucích látek [2].

6.5 Izolace rostlinné DNA z bulvy cibule magnetickými nosiči

DNA byla izolována z různě připravených homogenátů/lyzátů buněk (1, 2, 3) z bulvy cibule. Byly použity magnetické mikročástice P(HEMA-*co*-GMA), P(HEMA-*co*-GMA) NH₂, PGMA ox a nanočástice PLL.

Pro zjištění čistoty a pro kvantifikaci rostlinné DNA bylo provedeno spektrofotometrické stanovení. Z výsledků uvedených v Tabulce 10 je patrné, že nejvyšší naměřená koncentrace DNA byla u DNA izolované s využitím magnetických nosičů PGMA ox z homogenátu s přidavkem chloroform-oktanolu. Koncentrace byla 123 ng/μl. Poměr absorbcí při vlnových délkách A_{260nm}/A_{280nm} nesplňoval v žádném z případů podmínku ohledně čistoty. Nejvíce se poměrům 1,8 – 2,0 blížily výsledky, při kterých byly u izolací použity magnetické nanočástice PLL. Nejvyšší čistotu představoval vzorek, s poměrem absorbcí 1,60. Bylo zjištěno, že výtěžky jsou závislé na zvolených magnetických nosičích a na přípravě homogenátu. Přídavek chloroform-oktanolu měl příznivý vliv pouze u částic PGMA ox a přídavek isopropanolu jen u nosiče P(HEMA-*co*-GMA). Absorpční spektra DNA ve většině případů ukazují, že DNA izolována z bulvy cibule byla znečištěna dalšími látkami. Tyto látky můžou a nemusí ovlivňovat průběh PCR [32].

Při PCR s využitím specifických primerů pro amplifikaci produktů PCR o délce 700 bp (Obrázek 31) byly detegovány produkty PCR. PCR produkty vysoké intenzity byly detegovány po amplifikaci DNA izolované mikročásticemi P(HEMA-*co*-GMA), tudíž nebyl pozorován vliv různého způsobu přípravy homogenátů /lyzátů buněk (1, 2, 3). U PCR, při použití specifických primerů pro amplifikaci produktů o délce 220 bp (Obrázek 32), rovněž došlo k amplifikaci DNA. Slabé produkty PCR byly detegovány po amplifikaci DNA izolované s použitím nosičů P(HEMA-*co*-GMA), P(HEMA-*co*-GMA) NH₂ a PGMA ox z homogenátů v CTAB pufru. DNA izolovaná částicemi PLL se v PCR neamplifikovala. DNA bylo malé množství, případně byla znečištěna proteiny či polyfenoly, které s PCR interferovaly [46].

6.6 Izolace rostlinné DNA z cibulové natě magnetickými nosiči

DNA byla izolována z různých homogenátů/lyzátů buněk (1, 2, 3), připravených z cibulové natě. Byly použity magnetické mikročástice P(HEMA-*co*-GMA), P(HEMA-*co*-GMA) NH₂, PGMA ox a magnetické nanočástice PLL.

Koncentrace a čistota rostlinné DNA byla stanovena spektrofotometricky. Nejvyšší naměřená koncentrace DNA 127,7 ng/μl byla u DNA cibulové natě izolované pomocí magnetických nosičů PGMA ox z homogenitu s přidavkem chloroform-oktanolu. Bylo zjištěno, že přídavek chloroform-oktanolu a isopropanolu měl příznivý vliv pouze u nosičů PGMA ox. Výtěžky DNA byly závislé na použitých magnetických nosičích. Absorpční spektra ukazují, že DNA izolována z cibulové natě byla znečištěna proteiny a polyfenoly.

U amplifikace záleželo zřejmě na množství izolované DNA. Při použití specifických primerů 26S_for a 26S_rev pro amplifikaci předpokládaných produktů o délce 220 bp (Obrázek 38), nedošlo k amplifikaci produktů, když bylo ve směsích PCR méně množství

DNA. Byly detegovány pouze produkty PCR po amplifikaci s využitím nosičů P(HEMA-*co*-GMA) a P(HEMA-*co*-GMA) NH₂.

6.7 Izolace rostlinné DNA z potravinových výrobků

Pro izolaci DNA ze dvou pomazánek obsahujících cibuli byly vybrány magnetické nosiče PGMA ox, kterými při izolaci DNA z bulvy cibule bylo izolováno největší množství DNA. Pro porovnání byly vybrány i nosiče PLL, při jejím použití byla zjištěna největší čistota vyizolované DNA. DNA byla izolována z homogenitu/lyzátů buněk (1, 2, 3), připravených z Francouzské rostlinné pomazánky a Vajíčkové domácí pomazánky.

Pro zjištění čistoty a množství vyizolované rostlinné DNA bylo provedeno spektrofotometrické stanovení. Z Tabulky 12 je patrné, že nejvyšší koncentrace DNA izolované z Francouzské pomazánky byla z homogenátů v CTAB pufru s využitím magnetických nosičů PLL. Zároveň takto izolovaná DNA s těmito nosiči měla poměr absorbancí $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 1,96 – 2,07 tj. největší čistotu DNA. Magnetické částice PLL jsou menší, a tudíž mají větší povrch umožňující navázání velké množství ligandů [19]. U Vajíčkové pomazánky byla nejvyšší naměřená koncentrace DNA s použitím nanočástic PGMA ox z homogenátu s CTAB. Bylo zjištěno, že výtěžky DNA jsou závislé na zvolených magnetických nosičích. Na kvantifikaci přísad chloroform-oktanolu a isopropanolu k homogenátu neměl vliv. Absorpční spektra potvrzují znečištění nežádoucími látkami.

Následně po izolaci byla provedena amplifikace DNA metodou PCR. Po skončení PCR s využitím specifických primerů pro amplifikaci produktů PCR o délce 700 bp byla provedena detekce produktů PCR pomocí agaróзовé gelové elektroforézy. DNA na gelu byla po skončení obarvena interkalačním činidlem. PCR produkty po amplifikaci DNA izolované z Francouzské pomazánky (Obrázek 43) byly převážně detegovány po amplifikaci 10x zředěných vzorků. U Vajíčkové pomazánky (Obrázek 44) byly PCR produkty detegovány po amplifikaci neředěných vzorků DNA. U PCR, při použití specifických primerů pro amplifikaci produktů o délce 220 bp byly detegovány intenzivní produkty PCR. Na Obrázku 45 jsou vyobrazeny produkty PCR z DNA Francouzské pomazánky. Většina produktů byla detegována. Lepší amplifikovatelnost byla u DNA izolované použitím nanočástic PLL. U Vajíčkové pomazánky (Obrázek 46) byly detegovány všechny produkty PCR po amplifikaci neředěné a ředění DNA. Zřejmě to souvisí s degradací DNA – kratší produkty PCR (220 bp) se lépe amplifikují. Lze pozorovat rozdíly v 10x zředěných vzorcích, které byly vizualizovány pomocí méně intenzivních bendů.

6.8 Ověření intaktnosti DNA

Touto metodou se DNA purifikuje a zakoncentruje. Ke zvýšení její koncentrace dojde po rozpuštění přesrážené DNA v menším množství pufru [6, 28]. Cílem bylo ověřit intaktnost izolované DNA pomocí gelové elektroforézy na agaróze. Vzhledem k nízké koncentraci DNA byla DNA zakoncentrována přesrážením. Izolované vzorky DNA stejného typu zeleniny byly smíchány dohromady a přesráženy ethanolem. Po přesrážení byla změřena koncentrace a

čistota DNA. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 14. Z výsledků je patrné, že DNA nebyla úspěšně zakoncentrována. Následně byla provedena elektroforéza DNA. Detegována jako relativně intaktní byla pouze DNA izolována z cibulové natě (374 ng/běh). Značná část DNA izolována z brokolice a bulvy cibule byla zřejmě z důvodu přítomnosti látek koextrahovaných s DNA degradována a byla vizualizována jako pás DNA o nízké molekulární hmotnosti.

6.9 Testování různých množství DNA v separačních směsích s 8% PEG

Bylo provedeno ověření zakoncentrování kontrolní DNA telecího thymu pomocí nanočástic PLL. Do separační směsi bylo použito různé množství DNA. DNA byla eluována do stejného objemu TE pufru. Pro zjištění koncentrace izolované DNA z telecího thymu bylo provedeno spektrofotometrické stanovení. Bylo ukázáno, že tímto způsobem lze DNA 2-3krát zakoncentrovat až s 100% návratností.

7 ZÁVĚR

V experimentální části práce byla testována mikrometoda izolace rostlinné DNA ze vzorku cibule, brokolice a z potravinových výrobků v kvalitě vhodné pro konvenční PCR. Tato rychlá mikrometoda umožňuje izolaci DNA pomocí magnetických nosičů z hrubých lyzátů buněk, získaných přímou homogenizací rostlinných tkání. Rostlinná DNA obsahuje celou řadu různých metabolitů, jako jsou polyfenoly, polysacharidy či proteiny, které mohou průběh PCR inhibovat. Bylo prokázáno, že izolovaná DNA je znečištěná různými látkami (proteiny, polyfenoly), ale byla izolovaná v kvalitě vhodné pro PCR. Metodu je nutné optimalizovat pro další typy výrobků.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] ČÍŽKOVÁ, Helena, Rudolf ŠEVČÍK, Aleš RAJCHL, Jan PIVOŇKA a Michal VOLDŘICH. TRENDY V AUTENTICITĚ POTRAVIN A V PŘÍSTUPECH K DETEKCI FALŠOVÁNÍ. *Chemické listy* [online]. 2012, vol. 106, issue 10, s. 903-910 [cit. 2017-04-20]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemickelisty.cz/docs/full/2012_10_903-910.pdf
- [2] MADESIS, Panagiotis, Ioannis GANOPOULOS, Ioannis SAKARIDIS, Anagnostis ARGIRIOU a Athanasios TSAFTARIS. Advances of DNA-based methods for tracing the botanical origin of food products. *Food Research International* [online]. 2014, (60), 163-172 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.10.042. ISSN 09639969. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996913005905>
- [3] ASENSIO, Luis, Isabel GONZÁLEZ, Teresa GARCÍA a Rosario MARTÍN. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control* [online]. 2008, 19(1), 1-8 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2007.02.010. ISSN 09567135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713507000448>
- [4] ARLEO, M., F. RUIBAL, J. PEREYRA, E. MIQUEL, M. FERNÁNDEZ a C. MARTÍNEZ. A DNA-based approach to discriminate between quince and apple in quince jams. *International Food Research Journal* [online]. 2012, 19(4), 1471-1477 [cit. 2017-04-23]. Dostupné z: [http://www.ifrj.upm.edu.my/19%20\(04\)%202012/26%20IFRJ%2019%20\(04\)%20012%20Martinez%20\(008\).pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/19%20(04)%202012/26%20IFRJ%2019%20(04)%20012%20Martinez%20(008).pdf)
- [5] CONSONNI, R., K. ASTRAKA, L.R. CAGLIANI, N. NENADIS, E. PETRAKIS a M. POLISSIOU. Authenticity of Food. *Encyclopedia of Food and Health* [online]. Elsevier, 2016, , 285-293 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00048-9. ISBN 9780123849533. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123849472000489>
- [6] CORRADO, Giandomenico. Advances in DNA typing in the agro-food supply chain. *Trends in Food Science* [online]. 2016, 52, 80-89 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1016/j.tifs.2016.04.003. ISSN 09242244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224415300972>
- [7] DEMEKE, Tigst a G. Ronald JENKINS. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2010, 396(6), 1977-1990 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1007/s00216-009-3150-9. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-009-3150-9>

- [8] LOGAN, Julie, Kirstin EDWARDS a Nick SAUNDERS. Real-time PCR: current technology and applications. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2009. ISBN 978-1-904455-39-4.
- [9] IWOBI, Azuka, Ingrid HUBER a Ulrich BUSCH. The Application of PCR-Based Methods in Food Control Agencies – A Review. Polymerase Chain Reaction [online]. InTech, 2012 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.5772/38658. ISBN 978-953-51-0612-8. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/polymerase-chain-reaction/the-application-of-pcr-based-methods-in-food-control-agencies-a-review>
- [10] SAHOO, Soubhagya Laxmi a Chi-Hsien LIU. Adsorption behaviors of DNA by modified magnetic nanoparticles: Effect of spacer and salt. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects [online]. 2015, 482, 184-194 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2015.05.010. ISSN 09277757. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775715004203>
- [11] VARMA, Astha, Harish PADH a Neeta SHRIVASTAVA. Plant genomic DNA isolation: An art or a science. Biotechnology Journal [online]. 2007, 2(3), 386-392 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1002/biot.200600195. ISSN 18606768. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/biot.200600195>
- [12] VINOD, K. K. Total genomic dna extraction quality check and quantitation. Presented in the training programme on “Classical and modern plant breeding techniques – A hands on training”. Centre for Advanced Studies on Genetics and Plant Breeding, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore. Nov 1-21, 2004.
- [13] SAHU, S. K., M. THANGARAJ a K. KATHIRESAN. DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. ISRN Molecular Biology. 2012, roč. 2012, s. 1-6. ISSN 2090-7907. DOI: 10.5402/2012/205049. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/isrn/mb/2012/205049/>
- [14] POREBSKI, Sue, L. Grant BAILEY a Bernard R. BAUM. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Molecular Biology Reporter [online]. 1997, 15(1), 8-15 [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.1007/BF02772108. ISSN 0735-9640. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02772108>
- [15] GRYSON, Nicolas. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. Analytical and Bioanalytical Chemistry [online]. 2010, 396(6), 2003-2022 [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.1007/s00216-009-3343-2. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-009-3343-2>

- [16] BRUCE, Ian J., James TAYLOR, Michael TODD, Martin J. DAVIES, Enrico BORIONI, Claudio SANGREGORIO a Tapas SEN. Synthesis, characterisation and application of silica-magnetite nanocomposites. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* [online]. 2004, 284, 145-160 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1016/j.jmmm.2004.06.032. ISSN 03048853. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304885304006973>
- [17] HORÁK, Daniel a Nataliya BENEDYK. Magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres prepared by dispersion polymerization in the presence of electrostatically stabilized ferrofluids. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* [online]. 2004, 42(22), 5827-5837 [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.1002/pola.20406. ISSN 0887624x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pola.20406>
- [18] MCBAIN, Stuart, Humphrey YIU a Jon DOBSON. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*. [online]. 2008, 3(2), 169-180, 169-180 s. [cit. 2017-04-22]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/23155654_Magnetic_Nanoparticles_for_Gen_and_Drug_Delivery
- [19] PEČOVÁ, Michaela., Ludmila ZAJONCOVÁ, Kateřina POLÁKOVÁ, Jan ČUDA, Mirka ŠAFARÍKOVÁ, Marek ŠEBELA a Ivo ŠAFARÍK. Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich v biochemii a biotechnologii. *Chemické Listy*. 2011, roč. 105, č. 7, s. 524-530.
- [20] RITTICH, B., A. ŠPANOVÁ, D. HORÁK, M.J. BENEŠ, L. KLESNILOVÁ, K. PETROVÁ a A. RYBNIKÁŘ. Isolation of microbial DNA by newly designed magnetic particles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2006, 52(2), 143-148 [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2006.04.012. ISSN 09277765. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776506001457>
- [21] CHIANG, Chen-Li, Ching-Shan SUNG, Ting-Feng WU, Chuh-Yean CHEN a Chiung-Yuen HSU. Application of superparamagnetic nanoparticles in purification of plasmid DNA from bacterial cells. *Journal of Chromatography B* [online]. 2005, 822(1-2), 54-60 [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2005.05.017. ISSN 15700232. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023205003612>
- [22] MCMURRY, John. *Organická chemie*. V Brně: VUTIUM, 2007. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN: 978-80-214-3291-8.

- [23] ŠPANOVÁ, Alena, Daniel HORÁK, Eva SOUDKOVÁ a Bohuslav RITTICH. Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres designed for polymerase chain reactions applications. *Journal of Chromatography B* [online]. 2004, 800(1-2), 27-32 [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2003.09.010. ISSN 15700232. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S157002320300727X>
- [24] HORÁK, Daniel, Nataliya SEMENYUK a František LEDNICKÝ. Effect of the reaction parameters on the particle size in the dispersion polymerization of 2-hydroxyethyl and glycidyl methacrylate in the presence of a ferrofluid. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* [online]. 2003, 41(12), 1848-1863 [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.1002/pola.10728. ISSN 0887624x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pola.10728>
- [25] SARKAR, Tapasree Roy a Joseph IRUDAYARAJ. Carboxyl-coated magnetic nanoparticles for mRNA isolation and extraction of supercoiled plasmid DNA. *Analytical Biochemistry* [online]. 2008, 379(1), 130-132 [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.1016/j.ab.2008.04.016. ISSN 00032697. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269708002261>
- [26] HORÁK, Daniel, Bohuslav RITTICH a Alena ŠPANOVÁ. Carboxyl-functionalized magnetic microparticle carrier for isolation and identification of DNA in dairy products. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* [online]. 2007, 311(1), 249-254 [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.1016/j.jmmm.2006.10.1157. ISSN 03048853. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304885306025418>
- [27] BERENSMEIER, Sonja. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2006, 73(3), 495-504 [cit. 2017-04-04]. DOI: 10.1007/s00253-006-0675-0. ISSN 01757598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-006-0675-0>
- [28] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010, 86 s. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [29] LEE, Pei Yun, John COSTUMBRADO, Chih-Yuan HSU a Yong Hoon KIM. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2012, (62), - [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.3791/3923. ISSN 1940-087x. Dostupné z: <http://www.jove.com/video/3923/>
- [30] KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*. 1. vyd. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2007, 218 s. ISBN 978-807-0134-504.

- [31] MICARD, D., M.L. SOBRIER, J.L. COUDERC a B. DASTUGUE. Purification of RNA-free plasmid DNA using alkaline extraction followed by ultrogel A2 column chromatography. *Analytical Biochemistry* [online]. 1985, 148(1), 121-126 [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.1016/0003-2697(85)90636-0. ISSN 00032697. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269785906360>
- [32] ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulární biologie: Díl čtvrtý. Rostlinné viry, priony, molekulární evoluce, vznik života, základní metody molekulární biologie, genové inženýrství, genová terapie*. 3. vyd. Brno: Stanislav Rosypal, 2000, s. 904 - 1200. ISBN 80-902-5624-4.
- [33] RUML, Tomáš, Michaela RUMLOVÁ a Václav PAČES. *Genové inženýrství*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002, 270 s. ISBN 80-708-0499-8.
- [34] ROBERTSON, J., A. M. ROSS a L. A. BURGOYNE. *DNA in forensic science: theory, techniques, and applications*. New York: Ellis Horwood, 1990. ISBN 978-074-5806-624.
- [35] ŠMARDA, Jan, Jiří DOŠKAŘ, Roman PANTŮČEK, Vladislava RŮŽIČKOVÁ a Jana KOPTÍKOVÁ. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 194 s. 1. vydání. ISBN 80-210-3841-1.
- [36] KEER, Jacquie T a Lyndsey BIRCH. *Essentials of nucleic acid analysis: a robust approach*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, c2008, xxiii, 248 p. ISBN 978-085-4043-675.
- [37] TRACHTOVÁ, Š. *Praktikum z molekulární biotechnologie: Teoretické podklady – úloha č. 2*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, ZS 2015–2016.
- [38] KŘÍŽOVÁ, Jana, Alena ŠPANOVÁ, Bohuslav RITTICH a Daniel HORÁK. Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres for genomic DNA isolation. *Journal of Chromatography A*. 2005, vol. 1064, issue 2, s. 247-253. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.12.014. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com>
- [39] CARAMANTE, Martina, Giandomenico CORRADO, Luigi Maria MONTI a Rosa RAO. Simple sequence repeats are able to trace tomato cultivars in tomato food chains. *Food Control* [online]. 2011, 22(3-4), 549-554 [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2010.10.002. ISSN 09567135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713510003348>
- [40] SCHRADER, C., A. SCHIELKE, L. ELLERBROEK a R. JOHNE. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2012, 113(5), 1014-1026 [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x. ISSN 13645072. Dostupné z : <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>

- [41] KUBISTA, Mikael, José Manuel ANDRADE, Martin BENGTSSON, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* [online]. 2006, 27(2-3), 95-125 [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.007. ISSN 00982997. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098299705000907>
- [42] ŞAKALAR, Ergün, M.Fatih ABASIYANIK, Emre BEKTIK a Annageldi TAYYROV. Effect of Heat Processing on DNA Quantification of Meat Species. *Journal of Food Science* [online]. 2012, 77(9), N40-N44 [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2012.02853.x. ISSN 00221147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2012.02853.x>
- [43] DUAN, Ye, Lihui WANG, Zhiqiang GAO, Huishan WANG, Hexiao ZHANG a Hao LI. An aptamer-based effective method for highly sensitive detection of chloramphenicol residues in animal-sourced food using real-time fluorescent quantitative PCR. *Talanta* [online]. 2017, 165, 671-676 [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.12.090. ISSN 00399140. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914016310414>
- [44] WILHELM, Jochen a Alfred PINGOUD. Real-Time Polymerase Chain Reaction. *ChemBioChem* [online]. 2003, 4(11), 1120-1128 [cit. 2017-04-24]. DOI: 10.1002/cbic.200300662. ISSN 14394227. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cbic.200300662>
- [45] GeneriBiotech [online, cit. duben 2017] <http://www.generi-biotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativni-real-time-pcr/>
- [46] KOVARIK, A. a spol. Rapid Concerted Evolution of Nuclear Ribosomal DNA in Two Tragopogon Allopolyploids of Recent and Recurrent Origin. *Genetics*. 2005, roč. 169, s. 931-944. DOI: 10.1534/genetics.104.032839. Dostupné z: <http://www.genetics.org/cgi/doi/10.1534/genetics.104.032839>
- [47] YOONG LIM, K., A. KOVARIK, R. MATYÁŠEK, M. BEZDĚK, C. P. LICHTENSTEIN a A. R. LEITCH. Gene conversion of ribosomal DNA in *Nicotiana tabacum* is associated with undermethylated, decondensed and probably active gene units. *Chromosoma*. 2000, roč. 109, č. 3, s. 161-172. ISSN 1432-0886. DOI: 10.1007/s004120050424. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s004120050424>
- [48] CUEVAS VALENZUELA, Jose, José Rodrigo VERGARA-SALINAS a José Ricardo PÉREZ-CORREA. *Advances in technologies for producing food-relevant polyphenols*. Taylor & Francis, 2017. ISBN 14-987-1497-8.

- [49] REZADOOST, Mohammad Hossein, Mojtaba KORDROSTAMI a Hassan Hassani KUMLEH. An efficient protocol for isolation of inhibitor-free nucleic acids even from recalcitrant plants. *3 Biotech* [online]. 2016, 6(1), - [cit. 2017-04-25]. DOI: 10.1007/s13205-016-0375-0. ISSN 2190-572x. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13205-016-0375-0>.
- [50] ZHANG, Lingling, Bo WANG, Lei PAN a Junhua PENG. Recycling Isolation of Plant DNA, A Novel Method. *Journal of Genetics and Genomics* [online]. 2013, 40(1), 45-54 [cit. 2017-04-26]. DOI: 10.1016/j.jgg.2012.10.001. ISSN 16738527. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S167385271200192>
- [51] OLSON, Nathan D a Jayne B MORROW. DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Research Notes* [online]. 2012, 5(1), 668- [cit. 2017-04-28]. DOI: 10.1186/1756-0500-5-668. ISSN 1756-0500. Dostupné z: <http://bmresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-5-668>

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

bp – páry bází

CTAB – Cetyl triethylamonium bromid

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

dNTP – 2'- deoxyribonukleotid- 5' - trifosfát

EDTA – etylendiamintetraoctová kyselina

PCR – polymerázová řetězová reakce

PEG – polyethylenglykol

P(HEMA-*co*-GMA) - poly(hydroxyethylmethakrylát-*co*-glycidylmethakrylát)

TBE – Tris-borát-EDTA

TE – Tris-EDTA

UV – Ultrafialové záření

10 PŘÍLOHY

Výsledky diplomové práce byly prezentovány na studentské odborné konferenci Chemie je život, konané dne 23. 3. 2017 v Brně, a publikovány ve sborníku prací.

RÁČKOVÁ, Lucie, Aleš KOVAŘÍK, Alena ŠPANOVÁ a Bohuslav RITTICH. *Využití magnetických částic při izolaci DNA z cibule a brokolice: Studentská odborná konference Chemie je život 2017*. Sborník konferenčních příspěvků. 224 s. ISBN 978-80-8105-360-3.

Využití magnetických částic při izolaci DNA z cibule a brokolice

Bc. Lucie Ráčková

RNDr. Aleš Kovařík, CSc., doc. RNDr. Alena Španová, CSc.,

doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická,

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

V současné době se řeší problémy autenticity potravin. Jedním ze způsobů analýzy falšování jsou metody založené na analýze DNA, které se používají k detekci určitých druhů. Izolace rostlinné DNA bývá komplikovaná, z důvodu obsahu celé řady různých metabolitů, jako jsou polyfenoly, polysacharidy či proteiny, které mohou inhibovat v polymerázové řetězové reakci (PCR).

V této práci byla ověřována mikrometoda izolace rostlinné DNA z cibule, brokolice a potravinového výrobku (francouzská rostlinná pomazánka) v kvalitě vhodné pro konvenční PCR. Mikrometoda umožňuje izolaci pomocí magnetických nosičů z hrubých lyzátů, získaných přímou homogenizací rostlinných tkání. Byly porovnávány různé způsoby homogenizace a zpracování homogenátů. Deproteinace probíhala v lyzačním pufru s obsahem cetyl trimetyl amonium bromidu (CTAB). Poté byl testován vliv organických extrakčních činidel na následné purifikační kroky: vzorky byly rozděleny na část bez přídavku chloroform-oktanolu, s přídavkem chloroform-oktanolu a s přídavkem chloroform-oktanolu a isopropanolu. Následně byla DNA purifikována reverzibilní adsorpcí na magnetické nosiče (testovány celkem čtyři různé typy matrice). U izolovaných vzorků DNA bylo provedeno spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty. Poté jsme testovali amplifikovatelnost DNA v reakci PCR. Byly použity specifické primery pro rostlinnou ribosomální DNA (rDNA). Podoblast ITS1 byla amplifikována primery 18S_for a 5,8S_rev poskytující specifický produkt délky 700 bp. Podoblast genu 26S rDNA byla amplifikována primery 26S_for a 26S_rev s předpokládanou velikostí produktu odpovídající 220 bp. Produkty PCR byly detekovány agarózovou gelovou elektroforézou pomocí fluorescenčního interkalátoru ethidium bromidu.

Byly prokázány rozdíly ve výtěžku a kvalitě DNA v závislosti na způsobu homogenizace, zpracování homogenátů a použitých magnetických nosičů. Navržený postup byl testován pro izolaci kvalitní amplifikovatelné DNA z potravinových produktů obsahující rostlinný materiál.

Klíčová slova: Izolace rostlinné DNA, mikrometoda, magnetické nosiče, PCR