



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

**STANOVENÍ AUTENTICITY RŮZNÝCH TYPŮ
POTRAVINÁŘSKÝCH PRODUKTŮ S OVOCNOU
SLOŽKOU POMOCÍ MOLEKULÁRNÍCH A
INSTRUMENTÁLNÍCH METOD**

ANALYSIS OF AUTHENTICITY OF SOME FOOD PRODUCTS WITH FRUIT COMPONENT BY
MOLECULAR AND INSTRUMENTAL TECHNIQUES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Michal Pecháček

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1717/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Bc. Michal Pecháček**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

Název diplomové práce:

Stanovení autenticity různých typů potravinářských produktů s ovocnou složkou pomocí molekulárních a instrumentálních metod

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) rešerše – možnosti stanovení autenticity ovocné složky v potravinách pomocí molekulárně biologických a instrumentálních technik
- 2) optimalizace extrakce DNA a molekulárních metod na bázi multiplex PCR k simultánnímu stanovení ovocných druhů v potravinách
- 3) optimalizace stanovení charakteristických obsahových složek ovoce pomocí HPLC/PDA
- 4) vliv různých typů potravinové matrice na výsledek stanovení autenticity potravin s ovocnou složkou pomocí molekulárních a instrumentálních technik

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

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

Bc. Michal Pecháček
student

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Diplomová práce byla zaměřena na stanovení autenticity různých typů potravinářských produktů s ovocnou složkou pomocí molekulárních a instrumentálních technik. Práce byla rozdělena na teoretickou a praktickou část.

Teoretická část práce byla zaměřena na falšování potravin, metody stanovení autenticity potravin, analyzované druhy nebo technologie výrob jednotlivých potravinářských produktů, které byly v rámci práce analyzovány. Tato část byla rovněž zaměřena na molekulární a instrumentální techniky, které jsou v současnosti využívány právě pro stanovení autenticity potravin.

Praktická část diplomové práce byla rozdělena na molekulární a instrumentální část. V rámci molekulární části byla provedena izolace DNA s využitím izolačního kitu EliGene Plant DNA Isolation kit. Největší problém v případě izolace představovaly inhibiční látky, jako jsou polysacharidy. Proto byla v rámci izolace zařazena metoda s využitím inkubace s pektinázou. Vyizolovaná DNA byla následně podrobena PCR, u vzniklých PCR produktů byla pro ITS2 primery, sloužící pro důkaz rostlinné DNA provedena analýza křivek tání. V případě druhově specifických primerů BAS1 a Pa3LTP se kterými bylo pracováno v rámci diplomové práce byly tyto specifické produkty podrobeny vysokorozlišovací analýze křivek tání HRM. U HRM byly sledovány zejména teploty tání specifických produktů, ta byla stanovena na 78,4 °C pro specifický produkt primerů BAS1 a na 86,43 °C pro specifický produkt primerů Pa3LTP. Závěrem byly specifické produkty PCR podrobeny gelové elektroforéze na agarózovém gelu. V případě ITS2 primerů, které sloužily pro ověření amplifikovatelnosti rostlinné DNA, byl detekován band o velikosti 500 bp, v případě druhově specifických primerů BAS1 a Pa3LTP pak byly detekovány bandy o velikosti 100-150 bp. V rámci instrumentální části práce pak byla provedena HPLC/PDA analýza fenolických látek. Jako nejvhodnější postup byl pro analýzu fenolických látek zvolen postup s přečištěním pomocí ethanolu bez zakoncentrování.

V závěru práce byly porovnány jednotlivé metody mezi sebou. Zároveň byl sledován vliv matrice na celkové stanovení autenticity potravin.

Zatímco molekulární techniky by bylo možné využít pro stanovení autenticity potravin tak, že by byla stanovena přítomnost druhové DNA, instrumentální techniky by byly spíše vhodnější pro odhalení falšování potravin a pro detekci specifických látek.

KLÍČOVÁ SLOVA

Autenticita potravin, falšování potravin, qPCR-HRM, HPLC/PDA, meruňka, broskev

ABSTRACT

This master's thesis was focused on determining the authenticity of some food products with fruit component by molecular and instrumental techniques. The thesis was divided into theoretical and practical part.

The theoretical part of the work was focused on food adulteration, methods of determining the food authenticity, analysed types or technologies of production of individual food products, which were analysed in this work. This part was also focused on molecular and instrumental techniques, which are currently used to determine the food authenticity.

The practical part of the thesis was divided into molecular and instrumental part. Within the molecular part, DNA isolation was performed using the EliGene Plant DNA Isolation kit. Inhibitors such as polysaccharides seemed to be the biggest problem during the DNA isolation. Therefore, an isolation method using pectinase incubation was performed. The isolated DNA was subsequently subjected to PCR and the resulting PCR products were analysed by a melting curve analysis. This method was used for ITS2 primers, which were used for the plant DNA detection. In the case of species-specific primers BAS1 and Pa3LTP that were used for the peach and apricot detection, high resolution melting (HRM) analysis was performed. During HRM, the focus was on the melting temperature of the specific PCR products. The melting temperature of the BAS1 specific product was set at 78,4 °C and at 86,43 °C for the specific product of Pa3LTP primers. Finally, specific PCR products were subjected to agarose gel electrophoresis. In the case of ITS2 primers, which served to verify the amplifiability of plant DNA, a band of 500 bp was detected. In the case of species-specific primers BAS1 and Pa3LTP, bands from 100 to 150 bp were detected. In the instrumental part of this thesis the HPLC/PDA analysis of the phenolic compounds was performed. The most suitable procedure for the analysis of phenolic substances was the purification procedure using ethanol without further concentration

At the end of the work, the individual methods were compared with each other. At the same time, the influence of the matrix on the overall determination of food authenticity was monitored.

While molecular techniques could be used to determine the food authenticity by determining the presence of specific DNA, instrumental techniques would be more suitable for detecting food adulteration and detecting specific substances.

KEYWORDS

Food authenticity, food fraud, qPCR-HRM, HPLC/PDA, apricot, peach

PECHÁČEK, Michal. *Stanovení autenticity různých typů potravinářských produktů s ovocnou složkou pomocí molekulárních a instrumentálních metod*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139337>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. 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

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucí práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za vedení práce, odborné rady a také za možnost vypracování diplomové práce v dané oblasti. Dále bych rád poděkoval Ing. Lence Fialové za cenné rady a za čas, který se mnou strávila v laboratoři.

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Růžovité (<i>Rosaceae</i>).....	9
2.1.1	Slivoň (<i>Prunus</i>).....	9
2.2	Dětské příkrmy.....	9
2.2.1	Technologie výroby dětských příkrmů.....	10
2.3	Čaje.....	10
2.3.1	Technologie výroby čaje.....	11
2.4	Müsli tyčinky.....	11
2.5	Autenticita potravin.....	11
2.6	Falšování potravin.....	11
2.7	Analytické metody pro stanovení autenticity potravin.....	13
2.8	Analýza potravin založená na analýze genomu.....	14
2.8.1	PCR.....	15
2.8.2	Primery.....	16
2.8.3	Real-time PCR.....	16
2.8.4	Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM).....	16
2.8.5	Gelová elektroforéza.....	17
2.9	Analýza potravin založená na analýze metabolomu.....	18
2.9.1	Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí využívaná v metabolomice..	19
2.10	Problémy spojené se stanovením autenticity potravin.....	19
3	CÍL PRÁCE.....	20
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	21
4.1	Seznam použitých chemikálií.....	21
4.2	Seznam použitých pomůcek a přístrojů.....	21
4.3	Použité primery.....	22
4.4	Použitý rostlinný materiál.....	22
4.5	Komerční vzorky využité pro simultánní detekci broskve a meruňky.....	22
4.5.1	Seznam použitých komerčních vzorků pro stanovení specifity duplex PCR.....	24
4.6	Molekulárně-biologické analýzy.....	24
4.6.1	Příprava vzorků na izolaci DNA.....	24
4.6.2	Izolace DNA z meruňky a broskve.....	24

4.6.3	Izolace DNA z komerčních vzorků bez použití pektinázy.....	25
4.6.4	Izolace DNA z reálných vzorků s využitím pektinázy.....	25
4.6.5	Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace vyizolované DNA.....	26
4.6.6	Polymerázová řetězová reakce	26
4.6.7	Vysokorozlišovací analýza křivek tání (PCR-HRM).....	29
4.6.8	Gelová elektroforéza	29
4.7	Instrumentální část.....	30
4.7.1	Příprava vzorku	30
4.7.2	Extrakce fenolických látek	30
4.7.3	Přečištění extraktů	30
4.7.4	Zakoncentrování vzorků.....	30
4.7.5	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	31
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	32
5.1	Molekulární část	32
5.1.1	Izolace rostlinné DNA.....	32
5.1.2	Izolace DNA z komerčních výrobků.....	33
5.1.3	Ověření amplifikovatelnosti izolované DNA s využitím ITS2 primerů	35
5.1.4	Detekce DNA broskve pomocí specifických primerů (BAS1) s využitím singleplex PCR.....	41
5.1.5	Detekce DNA meruňky pomocí specifických primerů (Pa3LTP) s využitím singleplex PCR.....	45
5.1.6	Simultánní detekce DNA broskve a meruňky pomocí specifických primerů (BAS1, Pa3LTP) s využitím duplex PCR	50
5.1.7	Srovnání singleplex a duplex PCR pro simultánní detekci broskve a meruňky	59
5.2	Instrumentální část.....	62
5.2.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	62
6	ZÁVĚR.....	67
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	69
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	77
9	PŘÍLOHY	78

1 ÚVOD

Stanovení autenticity potravin je využíváno jako nástroj pro potvrzení kvality, ale také bezpečnosti potravin. Pomáhá při identifikaci znehodnocených potravin nebo také při identifikaci původu potraviny [1]. V posledních letech budí autenticita potravin značný zájem jak pro spotřebitele, tak pro výrobce, výzkum, ale také pro mezinárodní orgány [2].

Falšování potravin je definováno jako uvádění na trh takových potravin, u kterých je zjištěna vada týkající se charakteru nebo původu potraviny, a to včetně zásadního porušení právních předpisů, například požadavků na jakost potraviny. Nejčastějším falšováním potravin, se kterým se v současnosti setkáváme, je úmyslná modifikace produktu nebo jeho chybné označení s cílem oklamat spotřebitele [3].

Pro stanovení autenticity potravin lze v současnosti využít již celou řadu analytických metod. Jedná se nejčastěji o metody molekulární, imunochemické a instrumentální [4].

V rámci teoretické části této práce byly blíže prostudovány zejména metody založené na analýze genomu a metabolomu. Při analýze genomu se nejčastěji využívá analýza DNA dané matrice. Tato analýza často zahrnuje polymerázovou řetězovou reakci [5], dále pak vysokorozlišovací analýzu křivek tání [6] a pro detekci PCR produktů nejčastěji využívá gelovou elektroforézu [7]. Při analýze metabolomu jsou pak nejčastěji používanými metodami kapalinová a plynová chromatografie nebo kapilární elektroforéza a často se tyto metody pojí se statistickým zpracováním dat s využitím analýzy hlavních komponent [8].

Praktická část práce byla rozdělena na molekulární a instrumentální část. V rámci molekulární části práce byla provedena izolace DNA, ověřena amplifikovatelnost vyizolované DNA a následně provedena PCR s využitím druhově specifických primerů. V rámci molekulární části práce byla provedena jak singleplex, tak duplex PCR a tyto metody byly porovnány. Instrumentální část práce pak byla zaměřena na extrakci a analýzu fenolických látek.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Růžovité (*Rosaceae*)

Růžovité (*Rosaceae*) jsou čeledí zahrnující asi 4 828 druhů z celkem 91 rodů. Většina rostlin této čeledi je pěstována pro své plody, mohou však být pěstovány také jako okrasné rostliny [9]. Rostliny patřící do této čeledi představují bohatý zdroj cenných látek, jako jsou fenolické látky nebo vitamíny [10].

2.1.1 Slivoň (*Prunus*)

Rod Slivoň (*Prunus*) zahrnuje asi 200 druhů rostlin, zejména ovocných plodin, jako jsou meruňka obecná, broskvoň obecná, slivoň švestka, mandloň obecná aj. Tento rod je rozšířen zejména v mírném pásu na severní polokouli a v subtropických a tropických lesech v Asii, Africe, Jižní Americe nebo Austrálii [11].

2.1.1.1 Meruňka obecná (*Prunus armeniaca*)

Meruňka obecná je ovocný strom z čeledi Růžovitých. Plodem jsou peckovice s oranžovým oplodím. Plody meruňky jsou považovány za jedny z nejlahodnějších ovocných druhů. Mohou být konzumovány čerstvé, sušené, konzervované, ve formě džemů, tyčinek nebo jako pyré [12]. Meruňky jsou v lidové medicíně využívány při podráždění pokožky, očních nebo vaginálních infekcích [13]. Široká aplikace je spojena se složením a obsahem aktivních látek, obsažených v meruňkách. Mezi tyto látky patří vitamín C a K, β -karoten, niacin, thiamin, různé organické kyseliny, fenoly, těkavé sloučeniny, estery nebo terpenoidy. Významnými jsou také fenolické látky, flavonoidy, glykosidy nebo kovové ionty [14]. Významnými fenolickými látkami, které jsou v meruňkách obsaženy ve vyšším množství jsou kyselina hydroxyskořicová, kyselina kávová, kyselina p-kumarová nebo kyselina ferulová [12].

2.1.1.2 Broskvoň obecná (*Prunus persica*)

Broskvoň obecná je strom z čeledi Růžovitých s peckovitým plodem. Plody broskvoně obsahují různé fenolické látky, díky čemuž jejich konzumace poskytuje spoustu zdravotních benefitů, jako je například prevence chronických onemocnění a podpora funkce imunitního systému [15]. Broskve představují významný zdroj různých bioaktivních látek jako jsou fenolické sloučeniny (např. flavonoidy nebo anthokyany) nebo antioxidanty [16]. Významnými látkami broskve, které by mohly být potenciálně využity pro metabolomické stanovení autenticity potravin, jsou kyanidin-3-glukosid, kyanidin-3-rutinosid, kaempferol-3-glukosid aj. [16], [17].

2.2 Dětské příkrmy

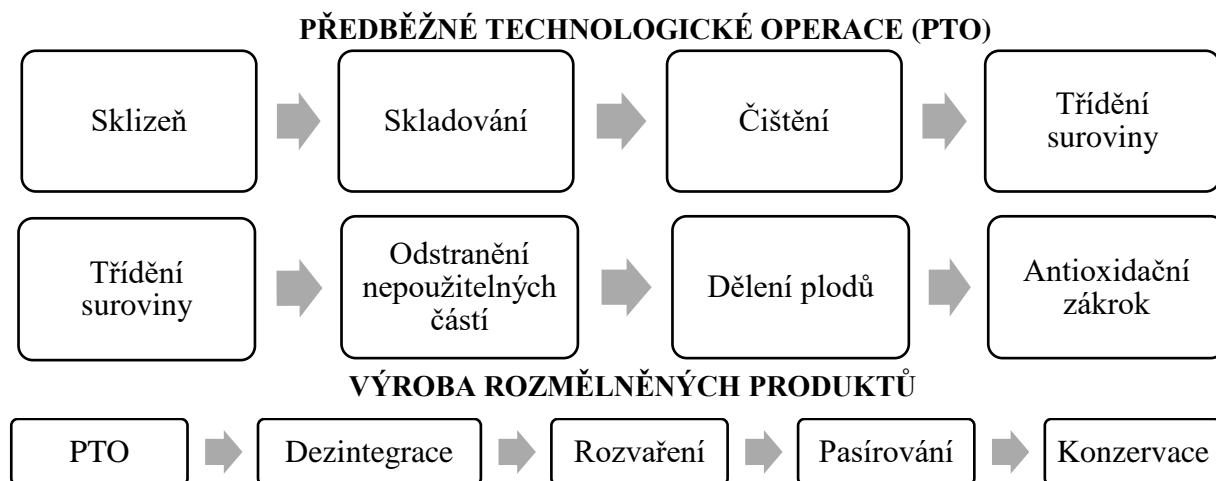
V současné době se dětské výživy obsahující ovocnou či zeleninovou složku stávají čím dál tím více populárními. Kromě ovocné složky představují hlavní složku dětských výživ cukry, organické kyseliny a zahuš'ovadla. V posledních letech se objevilo několik prací zabývajících se právě autenticitou dětských výživ, nejčastěji byl v rámci těchto analýz odhalen nedeklarovaný obsah cukru, záměna ovoce v dětské výživě anebo přídavek organických kyselin, které nebyly uvedeny na etiketě [18], [9]. Kromě ovocných dětských výživ lze také zmínit výživy mající

zeleninový základ, ty jsou jednoduché pro trávení a nabízejí vysoký obsah nutričně prospěšných látek. Většina zeleninových dětských výživ se skládají zejména z brambor nebo mrkve [19].

Konzumenti vyžadují produkty vysoké kvality s přirozenou vůní a chutí, a rovněž oceňují čerstvé a minimálně opracované potraviny, a to zejména v případě ovoce a zeleniny [20]. Kvalita pyré je dána kvalitou samotného ovoce, dále pak použitím barviv, ochucovadel, těkavých látek, texturou nebo obsahem organických kyselin. Dalšími sledovanými znaky jsou obsah ovocné složky, pevnost, poměr endokarpu a mezokarpu, obsah dužiny nebo konzistence [21]. Ovocné pyré se využívá v různých produktech včetně marmelád, konzervách nebo smoothie nápojích a přináší s sebou značné benefity jako je například vysoký obsah antioxidantů. Barva ovoce představuje jeden z hlavních ukazatelů kvality, zejména pak v případě červeného bobulového ovoce [22]. V případě zeleninového pyré obsahující mrkev nebo rajčata můžeme hovořit o přirozeně dobrém zdroji karotenoidních látek. Pro analýzu těchto složek je pak nejčastěji využívána kapalinová chromatografie [20].

2.2.1 Technologie výroby dětských příkrmů

Z technologického hlediska se jedná o výrobu rozmělněného ovoce. Do skupiny výrobků z rozmělněného ovoce patří značná část jak konzervářské, tak i mrazářské produkce. Výrobky spadající do této kategorie se vzájemně odlišují zejména svou konzistencí, homogenitou nebo velikostí rozmělněných kusů ovoce. Dle konzistence rozlišujeme rozmělněné ovocné polotovary na dužniny, pulpy a protlaky. Dětské příkrmy lze z technologického hlediska zařadit mezi protlaky. Opomeneme-li předběžné technologické operace (sklizeň, skladování, čištění atd.) a výrobu dužniny, při výrobě protlaků je základní operací rozvaření, při kterém dochází například k inaktivaci enzymů. Rozvařený materiál se dále pasíruje a rozmělněný produkt se následně stabilizuje konzervací s využitím chemických konzervačních látek nebo pasterací [23].



Obrázek 1: Schéma technologie výroby dětských příkrmů

2.3 Čaje

Pojmem čaj lze označit zpracované výhonky, listy, pupeny a jemné části zdřevnatělých stonků stálezelených subtropických keřů nebo stromů čajovníku. Z hospodářského hlediska mají význam pouze variety druhu *Camellia sinensis*. Kromě běžných typů čaje (zelený, bílý aj.) se setkáváme s čajem bylinným nebo ovocným. Ovocným čajem se tedy rozumí čaj vyrobený

ze sušeného ovoce a částí sušených rostlin, kdy podíl sušeného ovoce je vyšší než 50 % hmotnosti [23].

2.3.1 Technologie výroby čaje

Základním technologickým postupem při výrobě ovocných čajů je sušení tříděné suroviny za specifických podmínek pro daný druh, dále pak konečná úprava a balení. Ovocné čaje se mohou vyrábět jednodruhové nebo ve formě směsi, dále pak sypané nebo porcované. Kromě těchto variant lze ovocné čaje vyrobit i v instantní formě sušením jejich výluhu, který byl získán extrakcí [23].

2.4 Müsli tyčinky

Müsli představuje směs cereálií a dalších komponent, jako je sušené ovoce, ořechy nebo čokoláda, které mohou být konzumovány jak v suchém stavu, tak po smíchání s tekutinou, kterou může být například mléko, nebo jogurt. Cereální složku představují extrudované obilní polotovary a instantní obilné vločky. Tato složka je pak obohacena o nutričně hodnotné komponenty, kterými mohou být ořechy nebo sušené ovoce. Moderním druhem jsou cereální tyčinky na stejné bázi [23].

2.5 Autenticita potravin

Stanovení autenticity potravin se využívá pro potvrzení kvality a bezpečnosti potravin. Tento proces pomáhá identifikovat znehodnocené potraviny nebo celé várky potravin a pomáhá identifikovat, kdy a kde byla potravina vyprodukována. Informace o původu potraviny mohou sloužit jako klíčový nástroj u potravin, u kterých nás zajímá geografický původ [1]. Samotné stanovení se využívá pro ověření autenticity potravin, kdy mimo jiné, je sledovaným znakem i pravdivost údajů uváděných na etiketě. Toto stanovení je využíváno zejména v boji proti falšování potravin. Aby bylo stanovení autenticity potravin efektivní, mělo by být prováděno v rámci celého potravního řetězce [4].

Kvalita potravin je pro konzumenty velice důležitým faktorem a často je spojována právě s autenticitou potravin. Autenticitu potravin lze chápat tak, že to, co je uvedeno na etiketě odpovídá realitě [24]. Z hlediska spotřebitele je autenticita potravin důležitá zejména proto, že zákazník dostává zboží, za které platí, zároveň zná přesné složení uváděné na etiketě včetně původu potraviny [25]. Autenticita potravin budí v poslední době značný zájem pro spotřebitele, výrobce, výzkum, ale také pro mezinárodní orgány vzhledem k rostoucí hrozbě falšování potravin [2].

2.6 Falšování potravin

Jak již bylo zmíněno v úvodu, falšování potravin je definováno jako uvádění na trh takových potravin, u kterých je zjištěna vada týkající se charakteru nebo původu potraviny, a to včetně zásadního porušení právních předpisů, například požadavků na jakost potravin [3]. Zahrnuje tedy úmyslné nahrazování surovin, například drahých surovin levnějšími, dále pak přidávání surovin neuvedených na obalu výrobku, nebo naopak uvádění surovin na obalu výrobku, které pak nejsou součástí výsledného produktu. Mezi falšování potravin ale patří i podvodné označování, tím může být například klamání o původu nebo množství suroviny použité pro výrobu produktu [4], [26].

Nejčastějším falšováním potravin, se kterým se v současné době setkáváme je úmyslná modifikace produktu nebo jeho chybné označení s cílem oklamat spotřebitele. Spotřebitel si pak kupuje potravinu, která neodpovídá tomu, co je uvedeno na obalu výrobku. Nejčastěji se s falšováním potravin setkáváme za účelem finančního zisku prodejce či výrobce, což však může vést až k poškození zdraví či ohrožení života spotřebitele [3], [4].

Správním orgánem, který se zabývá falšováním potravin na území České republiky je Státní zemědělská a potravinářská inspekce [3].

V minulosti jsme se setkali již několikrát s kauzami zabývajícími se falšováním potravin. V poslední době byla významnou zejména metanolová kauza, kdy se v září 2012 na našem území začaly objevovat alkoholické nápoje s nezdaněnými lihovinami neznámého původu. V tomto případě bylo hlavním důvodem akutního řešení kauzy úmrtí spotřebitelů v návaznosti na konzumaci lihovin. Dané lihoviny obsahovaly metanol naředěný s etanolem v poměru 1:1. Tato kauza významně ovlivnila celý lihovarnický průmysl. Mezi další kauzy, se kterými jsme se v minulosti setkali bychom mohli zařadit melamin v mléčných produktech z Číny což mělo za následek ohrožení zdraví dětí. Jako další by bylo možné zmínit doplňky stravy obsahující farmakologicky účinné látky jako například sildenafil, tadalafil či anabolické steroidy, kdy obsah těchto nebezpečných látek nebyl na etiketě výrobku uveden. Dalším nebezpečným typem falšování potravin se stala manipulace s datem použitelnosti potravin, kdy byly v obchodech přebalovány prošlé masné i mléčné výrobky. V tomto případě se však nikdy nepodařilo trestný čin prokázat, avšak dodnes se inspektoři setkávají s tím, že je datum expirace přepisováno, přelepováno či jinak upraveno datem novým. Prošlé výrobky sice nemusí vždy ohrozit zdraví spotřebitele, ale mohou být příčinou zdravotních problémů [3].

Mezi způsoby falšování potravin, které nejsou přímo spojeny s ohrožením zdraví, ale přesto jsou zakázané, lze zařadit doslazování medu, ředění burčáku, falšování vína, klamavou nabídku a klamavé označování nebo džemy s menším podílem ovoce [3], [27].

Falšování potravin jako takové není v legislativě definováno, existuje však několik zákonů, vyhlášek a nařízení, které upravují falšování potravin. Dle zákona č. 110/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, který zahrnuje povinnosti provozovatele potravinářského podniku či označování potravin, je zakázáno na trh uvádět potraviny jak klamavě označené, tak potraviny neznámého původu [28].

Dle NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 178/2002, kterým byly stanoveny obecné zásady a požadavky potravinového práva, byl zřízen Evropský úřad pro bezpečnost potravin, jehož cílem je chránit zájmy spotřebitelů a poskytovat spotřebitelům základ, který umožňuje vybírat se znalostí věci potraviny, které konzumují. Jeho dalším cílem je také zabránit podvodným nebo klamavým praktikám, falšování potravin a jakýmkoli jiným praktikám, které by mohly uvádět spotřebitele v omyl [29].

Dle SMĚRNICE EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY 2000/13/ES o sbližování právních předpisů členských států týkajících se označování potravin, jejich obchodní úpravy a související reklamy pak použité způsoby označování nesmějí uvádět kupujícího v omyl, což se rovněž vztahuje na obchodní úpravu či související reklamu. Tato směrnice dále uvádí informace, které je nutné uvádět na obalu výrobku [30]. S výše zmíněnou směrnicí se pak pojí vyhláška č. 417/2016 Sb. o některých způsobech označování potravin, která shrnuje způsoby

označování potravin, dále pak označování čistého množství potravin nebo označování šarže [31].

NAŘÍZENÍ RADY (ES) č. 510/2006 o ochraně zeměpisných označení a označení původu zemědělských produktů a potravin pak shrnuje informace o označení původu a zeměpisné označení, kterým se rozumí název regionu, určitého místa nebo ve výjimečných případech země, který se používá k označení zemědělského produktu nebo potravin. Dále zahrnuje informace týkající se druhové povahy, překrytí s názvy odrůd rostlin, plemen zvířat, homonymními názvy a ochrannými známkami [32].

Kromě těchto obecných zákonů, nařízení a vyhlášek existuje také několik dalších, které upravují podmínky pro jednotlivé potraviny, specifikují vlastnosti dané potraviny, požadavky na jakost, ale také podmínky uvádění do oběhu. Většinou se jedná o právní předpisy dané českou legislativou. Mezi tyto vyhlášky lze zařadit vyhlášku č. 76/2003 Sb., kterou byly stanoveny požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony [33]. Zákon č. 321/2004 Sb. o vinohradnictví a vinařství [34], vyhláška č. 69/2016 Sb. o požadavcích na maso, masné výrobky, produkty rybolovu a akvakultury a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich [35], vyhláška č. 248/2018 Sb. o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí [36] a v neposlední řadě vyhláška Ministerstva zemědělství č. 330/1997 Sb., kterou se provádí § 18 písm. A), d), j), a k) zákona č. 110/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů pro čaj, kávu a kávoviny [37]. Všechny tyto právní předpisy, přestože neuvádějí informace o falšování potravin, uvádějí přesné informace o vlastnostech výrobků a jejich formě, ve které mohou být tyto výrobky uváděny na trh.

Produkty vyrobené z ovoce jsou upraveny vyhláškou č. 157/2003 Sb., kterou byly stanoveny požadavky pro čerstvé ovoce a čerstvou zeleninu, zpracované ovoce a zpracovanou zeleninu, suché skořápkové plody, houby, brambory a výrobky z nich, jakož i další způsoby jejich označování. Tato vyhláška specifikuje jednotlivé produkty vyráběné z ovoce, zeleniny a dalších surovin. U produktů vyrobených zpracováním ovoce definuje výrobky jako jsou džemy, marmelády, povidla a další. Kromě výrobků definuje tato vyhláška také způsob označování, kdy kromě údajů uvedených v zákoně a ve vyhlášce o způsobu označování potravin je zpracované ovoce nutno dále značit použitým druhem nebo druhy ovoce v sestupném pořadí dle hmotnosti použité suroviny, názvem skupiny atd. Tato vyhláška pak dále uvádí požadavky na jakost, technologické požadavky a informace o uvádění do oběhu. Pokud by výrobce uváděl na trh výrobek, který by jakýmkoli způsobem porušoval danou vyhlášku, jednalo by se tak o falšování potravin [38].

2.7 Analytické metody pro stanovení autenticity potravin

V současné době existuje již spousta metod, které lze využít pro stanovení autenticity potravin, ať už se jedná o metody molekulární, imunochemické nebo instrumentální. Z instrumentálních metod používaných pro stanovení autenticity potravin lze zmínit například hmotnostní spektrometrii, chromatografii nebo elektromigrační techniky [4]. V rámci analytických technik používaných pro stanovení autenticity potravin lze vymezit tyto techniky do několika skupin. Metody, které získávají informace o chemickém složení, dále metody sledující biologické markery nebo metody zabývající se množstvím stabilních izotopů v potravině [1].

Z chemického hlediska lze potraviny považovat za komplexní matici sestávající se z různých látek, v různých koncentracích, s rozdílnými chemickým i fyzikálními vlastnostmi. To vše je způsobeno jak původem, tak zpracováním či skladováním potraviny. Pro stanovení autenticity je tedy zapotřebí zaměřit se na metody charakterizace potravin na molekulární úrovni. Moderní vědní disciplínou, která zahrnuje různé postupy charakterizace potravin je tzv. foodomika, která zahrnuje metody z oblasti genomiky, proteomiky, glykomiky, lipidomiky a metabolomiky. Tato vědní disciplína je díky svému širokému rozsahu schopná poskytnout důkladný přehled o potravině na různé molekulární úrovni [39].

2.8 Analýza potravin založená na analýze genomu

Existuje několik druhů molekulárně biologických metod, které jsou využívány pro stanovení autenticity potravin, jako jsou například metody analyzující proteom nebo DNA dané matrice. Stanovení autenticity se pak v posledních letech nejčastěji provádí pomocí biomolekulárních technik založených na analýze DNA. Tyto metody jsou využívány zejména díky stabilitě molekuly DNA v porovnání s proteiny. Analýza DNA se pojí s PCR, která představuje rychlou, citlivou a vysoce specifickou alternativu k metodám analyzujícím proteiny obsažené v analyzované matrici. Zároveň pak umožňuje druhovou identifikaci a identifikaci původu potraviny, a to dokonce i v komplexní matrici. Nejčastěji se pak využívá real-time PCR umožňující automatizovanou, jednoduchou a opakovatelnou identifikaci amplifikovaného produktu a představující dobrou alternativu se specifickou a citlivou detekcí velmi malých fragmentů DNA [40], [41], [42]. Real-time PCR lze využít také při sledování některých alergenů, jako je například celer, který lze touto metodou detekovat i v komplexní potravinové matrici. Touto metodou lze dokázat i přítomnost složky v potravině, například medu, pocházející z jiné geografické oblasti, než výrobce uvádí. Metoda je schopná detekce již při malém množství příslušné sekvence nukleové kyseliny v analyzované matrici [43].

Dále jsou pak často využívány metody jako například náhodná amplifikace polymorfni DNA (RAPD), polymorfismus délky restrikčních fragmentů (PCR-RFLP), amplifikační refrakční mutační systém (ARMS), jednoduché opakování sekvence (SSR), amplifikovaná oblast charakterizovaná sekvencí (SCAR) nebo multiplex PCR. V současnosti získávají značnou pozornost také biosenzory využívané pro analýzu DNA nebo sekvenování nové generace [44], [45]. Sekvenování nové generace je pokročilou metodou, která umožňuje sekvenování milionů DNA fragmentů zároveň díky čemuž se jedná o populární techniku využívanou v rámci stanovení autenticity potravin [45].

Přestože existuje spousta dalších metod pro stanovení autenticity potravin, molekulární techniky založené na analýze DNA jsou stále značně využívány. Mezi metody analyzující DNA lze dále zařadit metody, které sledují DNA markery umožňující identifikaci změn v nukleotidové sekvenci genomu, jako jsou SNP (jednonukleotidový polymorfismus). SNP získaly v poslední době pozornost díky jejich nadbytku v genomu, jejich genetické stabilitě, ale také díky možnosti být využity při amplifikaci malých molekul DNA, které lze použít při citlivějších technikách. Tyto metody jsou však časově náročné, drahé a vyžadují vysoce proškolený personál. Limitace již existujících metod založených na analýze DNA dospěla k vytvoření nových alternativních technik, které s sebou přináší nižší cenu, jednoduchost, rychlou odpověď a automatizaci. Takovéto techniky zahrnují moderní biosenzory, které fungují jako analytická zařízení kombinující jak biologické, tak fyzikálně – chemické vlastnosti vzorku

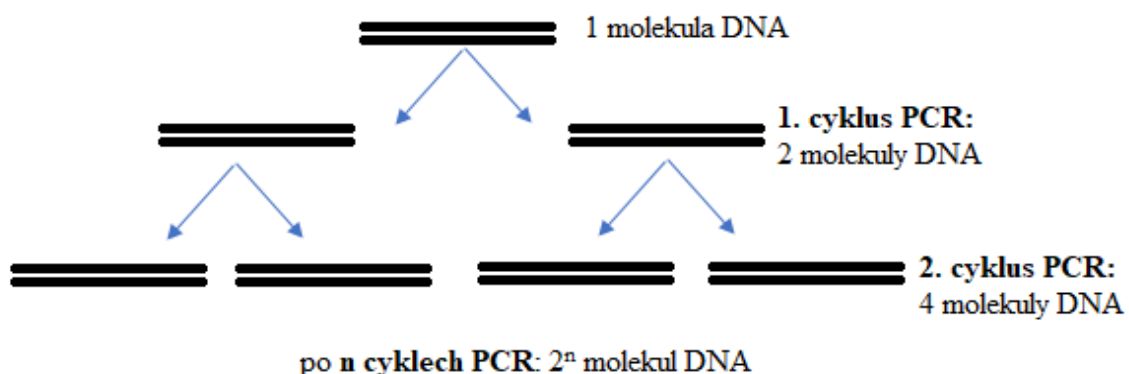
a produkují měřitelný signál, s jehož pomocí je detekována koncentrace analytu biologického významu [6], [46].

Kromě již zmíněných technik byly v posledních letech vytvořeny nové metody založené na analýze DNA, využívající analýzu barkódu DNA v případě identifikace rostlinných druhů. To zahrnuje použití krátkých chloroplastových, nebo jaderných, standardizovaných sekvencí DNA majících běžně 400-800 párů bází. DNA barkódování je využíváno pro identifikaci rostlin a hub a studuje evoluční změny mezi příbuznými organismy. Obecně lze říct, že se jedná o metodu, která je založená na identifikaci krátkých úseků sekvence DNA, které by měly být co nejvíce podobné u jedinců stejného druhu, a naopak se co nejvíce lišit mezi druhy. Tyto DNA barkódy lze následně porovnávat se sekvencemi známých druhů v globálních databázích. V rámci analýzy potravin lze tuto techniku využít zejména pro detekci míchání druhů z rozdílných taxonomických skupin. Metoda kombinuje výhody jako jsou molekularizace identifikačního procesu, standardizace protokolu a komputarizace, kde data složená do sekvenční databáze slouží jako standard pro srovnání neznámého vzorku [44].

2.8.1 PCR

PCR neboli polymerázová řetězová reakce je běžnou technikou používanou v rámci genomiky. Tato technika byla poprvé provedena roku 1984 Kary Mullisem a je používána dodnes. Jedná se o techniku využívanou pro amplifikaci specifických sekvencí nukleových kyselin. V dnešní době se jedná o metodu využívanou v různých odvětvích, jako například v genetice, molekulární diagnostice, ale také při forenzní analýze. Typická PCR zahrnuje denaturaci dvoušroubovice DNA, annealing a elongaci. Výsledkem PCR jsou potom kopie DNA (amplikony), jejichž množství se s každým cyklem zdvojnásobí. Tradičně se využívá tzv. end-point PCR, kdy se provádí vizualizace amplikonů pomocí gelové nebo kapilární elektroforézy. Touto metodou však získáme pouze kvalitativní informaci, nikoli kvantitativní [5], [47].

Pro PCR je nutné využít 2 oligonukleotidové primery, cílovou DNA, která slouží zároveň jako templát pro reakci, termostabilní DNA polymerázu, směs deoxyribonukleotidů a vhodný pufr obsahující Mg^{2+} ionty [48]. Schéma PCR je uvedeno na obrázku (Obrázek 2).



Obrázek 2: Schéma PCR, převzato a upraveno z [48]

2.8.2 Primery

Při PCR je rozhodujícím parametrem vhodná sekvence a koncentrace primerů. V současnosti existuje několik počítačových programů využívaných pro návrh vhodných primerů. Pro návrh vhodných primerů existuje několik pravidel, která jsou spíše orientační [48]:

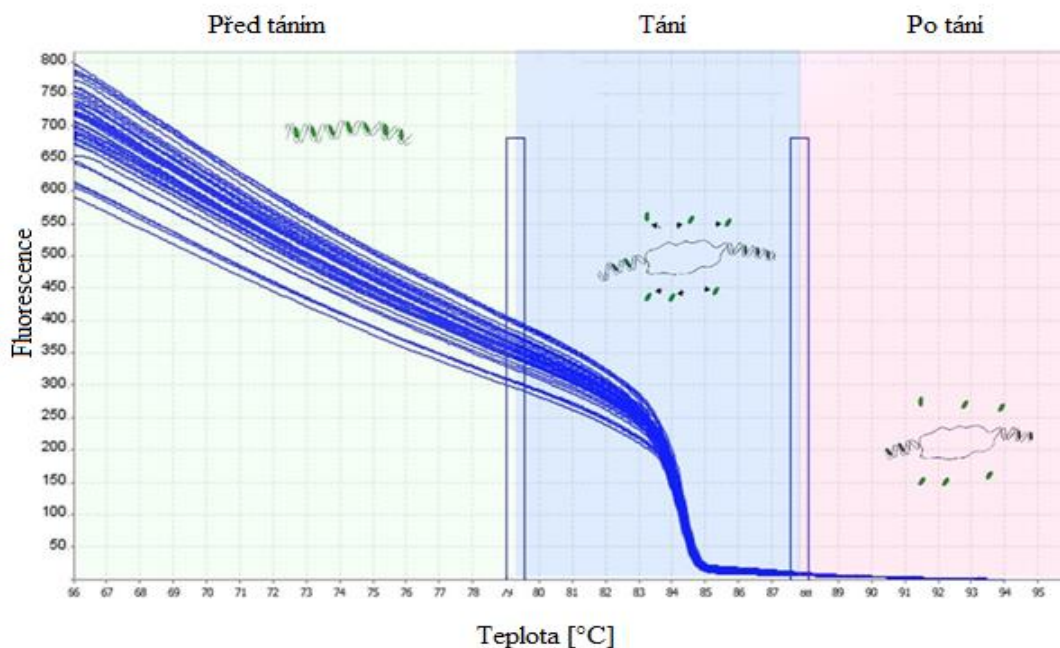
- Oligonukleotid (18–24 nukleotidů)
- Neobsahují sekundární struktury
- Vyvážený poměr G/C a A/T párů
- Nejsou vzájemně komplementární
- Teplota tání cca 55–65 °C – se zvyšující teplotou se zvyšuje i specifita (ΔT_t max 10 °C) [48]

2.8.3 Real-time PCR

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (real-time PCR, qPCR) je technikou, která kombinuje amplifikaci a detekci v jednom kroku. qPCR se využívá například při forenzní analýze, pro diagnostiku rakoviny, detekci Alzheimerovy choroby, ale také pro výzkum kmenových buněk. Této technice je podobná qRT-PCR, která se využívá zejména pro detekci ribonukleových kyselin (RNA). Princip této metody je podobný, v případě qRT-PCR však probíhá navíc reverzní transkripce molekuly RNA na molekulu DNA. Nejčastěji se při detekci ampliconů v případě qPCR využívá fluorescence [47].

2.8.4 Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM)

HRM může být považována za další stupeň navazující na qPCR. Na konci PCR je intenzita fluorescenčního signálu vysoká, a to díky vysoké koncentraci dsDNA s navázaným fluorescenčním barvivem. HRM dokáže detekovat malé rozdíly mezi sekvencemi na základě jejich rozdílné teploty tání, což je teplota, při které se 50 % molekuly DNA stává jednořetězcovou.



Obrázek 3: Schéma HRM analýzy [53]

Prvním krokem vysokorozlišovací analýzy křivek tání je PCR, která je provedena za přítomnosti barviva, které se váže na dvouřetězcovou molekulu DNA (dsDNA). Toto barvivo je vysoce fluorescenční při interakci s dsDNA, ale vykazuje velice nízkou fluorescenci, pokud není navázáno. Po provedení PCR dochází k postupnému zvyšování teploty, čímž dochází k denaturaci amplikonu. Během této fáze dochází k uvolnění fluorescenčního barviva. Křivka tání je potom dána hodnotami klesající fluorescence oproti vzrůstajícím hodnotám teploty, jak je tomu v případě schématu HRM analýzy (Obrázek 3) [50].

Získané HRM křivky tání jsou vysoce charakteristické pro každý amplikon a jsou závislé na obsahu GC párů, délce amplikonu a sekvenci. Přestože křivky tání DNA jsou využívány hlavně pro stanovení teploty tání amplikonů, HRM analýza je založena na faktu, že přesný tvar křivky tání je dán sekvencí DNA. Výhodou této metody je, že křivky tání rozdílných amplikonů mohou být rozlišeny na základě tvaru i přestože jsou definovány stejnou teplotou tání [48].

2.8.5 Gelová elektroforéza

Elektroforéza je široce využívanou metodou v molekulární biologii, využívaná zejména pro separaci a identifikaci individuálních makromolekul ve směsi. K separaci těchto látek dochází na základě rozdílné mobility v elektrickém poli. Negativně nabitě makromolekuly, jako jsou nukleové kyseliny, jsou frakcionovány při pohybu v elektrickém poli směrem k anodě na základě své struktury, náboje, konformace a velikosti. Při elektromigračních technikách se pohybují kratší molekuly rychleji, jelikož mohou póry gelu procházet rychleji, než je tomu v případě větších molekul. Původní vývoj elektroforetických technik započal v roce 1931 separací koloidů v elektrickém poli Arnem Tiselusem [7].

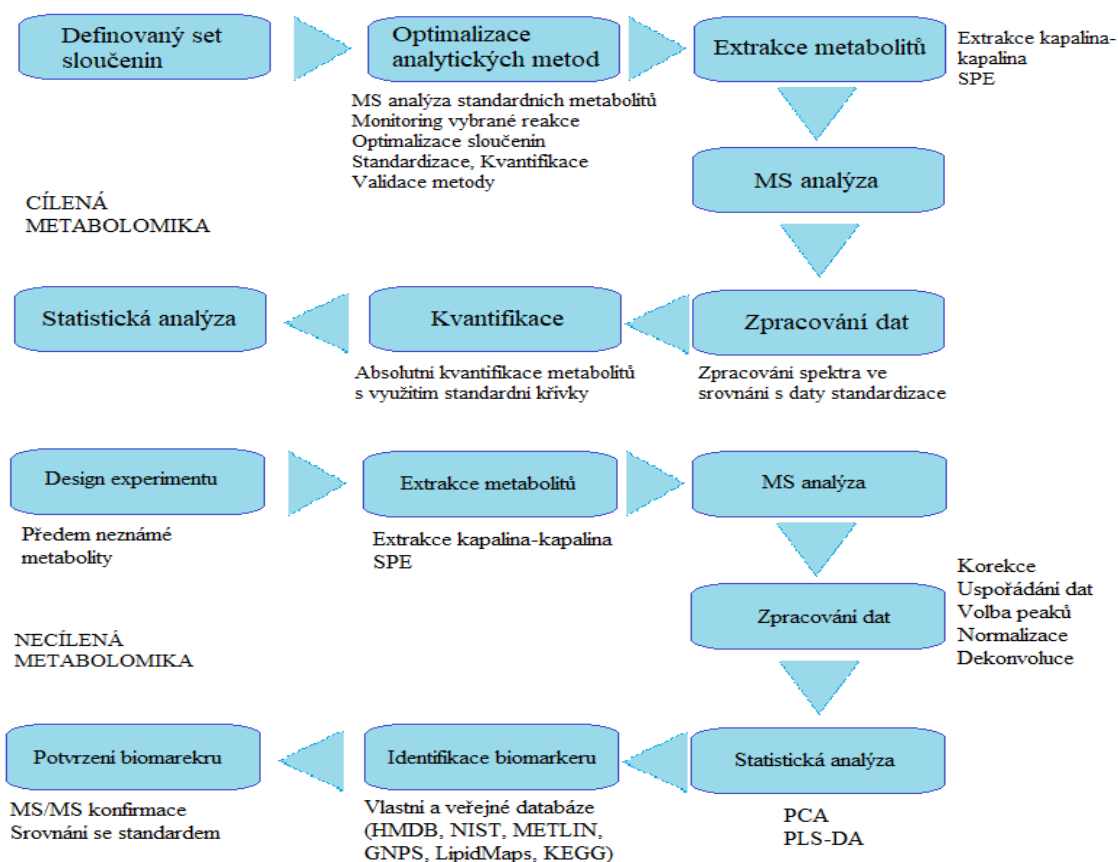
V dnešní době se elektroforetická separace využívá v několika podobách, včetně formy gelové nebo kapilární elektroforézy. Gelová elektroforéza je jednou z nejvyužívanějších technik pro frakcionaci makromolekul na základě elektroforetické mobility. Běžně se při gelové elektroforéze využívá gel z agaru, agaróza, polyakrylamid nebo agaróza-polyakrylamidový gel. Z těchto separačních matric je značně využívána agaróza, zejména pro svou tvrdost a čistotu v porovnání s agarem. Polyakrylamid lze rovněž využít pro separaci makromolekul jako je DNA, ale má své limity v případě větších molekul DNA. Elektroforéza s polyakrylamidovým gelem (PAGE) se tak nejčastěji využívá pro separaci proteinů. Je běžně založena na dělení molekul na základě elektroforetické mobility, zejména pak na základě velikosti, tvaru, ale i náboje molekuly [51], [52].

2.9 Analýza potravin založená na analýze metabolomu

Metabolomika se zaměřuje na obsah metabolitů ve vzorku a definuje změny v metabolomu jako následek genetických nebo enviromentálních faktorů, umožňuje studium malých molekul (metabolitů) v buňkách, biologických tekutinách, tkáních i organismech. Lze ji rozlišit na cílenou a necílenou metabolomiku (Obrázek 4). V současné době se jedná o populární techniku, která je využívána ke studiu bezpečnosti potravin, kvality a původu potravin [8], [53].

Metabolomické studie umožňují charakterizaci mnoha komplexních biologických materiálů obsahujících sloučeniny s rozdílnou polaritou nebo těkavostí. Sacharidy, lipidy, aminokyseliny, aminy, steroidy, fenolické sloučeniny, karotenoidy, alkaloidy a těkavé látky jsou příklady látek tvořící metabolom biologických soustav. Tato diverzita vedla ke vzniku různých odvětví metabolomiky. Příkladem může být lipidomika, která se zabývá studiem tříd lipidů, podtříd a lipidických signálních molekul, které zajišťují změny v metabolismu lipidů. Volatolomika je pak odvětvím metabolomiky zabývající se detekcí, charakterizací a kvantifikací těkavých metabolitů v biologických systémech [54].

Metabolomika se zabývá identifikací a kvantifikací metabolitů nacházejících se v biologických systémech. Zahrnuje dva hlavní postupy a to fingerprinting, tedy porovnání získaného výsledku s několika skupinami vzorků, a profilování, tedy studium pouze specifické skupiny metabolitů. Vysoká komplexita a dynamický rozsah metabolomu mají za následek složitost analýzy a kompletní metabolom nelze analyzovat najednou [55].



Obrázek 4: Schéma pracovního postupu cílené a necílené metabolomiky, převzato z [8]

Rychlý pokrok zaznamenala metabolomika zejména díky chromatografickým separačním technikám a vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrii (HRMS). V současné době má metabolomika založená na hmotnostní analýze značný rozsah včetně využití v rámci analýzy potravin. Dva hlavní postupy pro získání metabolomických dat jsou nukleární magnetická rezonance (NMR) a hmotnostní spektrometrie (MS). Nejčastěji používanými hmotnostními detektory v metabolomice jsou single nebo triple kvadrupól, iontová past nebo TOF (time-of-flight). Různé typy hmotnostních detektorů jsou často kombinovány pro dosažení lepšího výsledku analýzy. Jako separační techniky jsou pak v metabolomice využívány nejčastěji plynová a kapalinová chromatografie nebo kapilární elektroforéza [8].

2.9.1 Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí využívaná v metabolomice

Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií získala značnou pozornost zejména díky možnosti analyzovat komplexní přírodní matrice a v posledních letech se tak jedná o nejvyužívanější techniku v rámci metabolomiky. Lze ji charakterizovat jako široce použitelnou metodu pro separaci a detekci metabolitů v širokém rozsahu, s vysokou citlivostí a robustností. Jako ionizační zdroj se při použití kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí nejčastěji využívají ionizace elektrosprejem, chemická ionizace za atmosférického tlaku nebo fotoionizace za atmosférického tlaku [8].

Jako alternativní techniku lze využít kapalinovou chromatografii s UV nebo PDA detekcí, která představuje jednoduchou a dostupnou techniku pro analýzu potravin. Přesto je však nutné provést kompletní chromatografickou separaci, která je v případě komplexních vzorků velice obtížná a vede tak ke snížení kvality výsledků celé analýzy a ke zvýšení chyb, ke kterým může v rámci analýzy dojít [56].

2.10 Problémy spojené se stanovením autenticity potravin

Problémy spojené se stanovením autenticity potravin jsou významně ovlivněny složením daného vzorku. Např. polysacharidy obsažené ve vzorku představují problém, jelikož mohou negativně ovlivňovat funkci některých enzymů, jako jsou polymerázy, ligázy a restriční endonukleázy. Podobně by pak mohly tyto enzymy inhibovat i fenolické látky obsažené ve vzorku [57].

3 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce je stanovení autenticity potravin obsahujících ovocnou složku s využitím molekulárních a instrumentálních metod.

Práce byla řešena v následujících krocích:

- Rešerše zaměřená na možnosti stanovení autenticity ovocné složky v potravinách pomocí molekulárně biologických a instrumentálních technik.
- Optimalizace extrakce DNA a molekulárních metod na bázi multiplex PCR k simultánnímu stanovení ovocných druhů v potravinách.
- Optimalizace stanovení charakteristických obsahových složek ovoce pomocí HPLC/PDA.
- Sledování vlivu různých typů potravinové matrice na výsledek stanovení autenticity potravin s ovocnou složkou pomocí molekulárních a instrumentálních technik.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Seznam použitých chemikálií

EliGene Plant DNA Isolation Kit (Elisabeth Pharmacon, ČR)
PCR H₂O (Top-Bio, ČR)
qPCR 2x SYTO-9 Master Mix (Top-Bio, ČR)
Primery – viz 4.3 Použité primery
Agaróza pro gelovou elektroforézu (Sigma-Aldrich, USA)
Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA) (Penta, ČR)
Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris-báze) (Serva, Německo)
Kyselina boritá (Penta, ČR)
GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, USA)
Midori Green Advance DNA Stain (NIPPON Genetics EUROPE, Německo)
FastGene 100 bp DNA Marker (NIPPON Genetics EUROPE, Německo)
FastGene 50 bp DNA Marker (NIPPON Genetics EUROPE, Německo)
Pektináza z *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich, USA)
Ethanol (Penta, ČR)
Kyselina chlorovodíková (Lach-ner, ČR)
Acetonitril, Chromasolv Plus, for HPLC, ≥99,9%, (Honeywell Riedel-de Haën Německo)

4.2 Seznam použitých pomůcek a přístrojů

Kávomlýnek ETA Fragranza (ETA, ČR)
Centrifuga MINI Spin (Eppendorf, Německo)
Combi-spin FVL-2400N Mini centrifuge (Biosan, Německo)
Centrifuga Z216 MK (Hermle, Německo)
Centrifuga Z 36 HK (Hermle, Německo)
Laboratorní váhy KERN CM 60-2N (UNIPRO-ALPHA, ČR)
LightCycler® Nano Instrument (Roche, Švýcarsko)
Mikropipety (SOCOREX, Švýcarsko)
Mikrovlnná trouba (SENCOR, ČR)
Mikrozkumavky (Eppendorf, Německo)
Miniinkubátor (Labnet, USA)
MS2 Minishaker Vortexer (IKA, USA)
Nanodrop Spectrophotometer 2000 (TermoFisher Scientific, USA)
Termocycler Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, UK)
Transluminátor Azure Imager c600 (Azure biosystem, USA)
Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro Power Supplies 300 V (Labnet International, USA)
Elektroforetické vany (Owl Separation systems, Inc., USA)
Lyofilizátor FreeZone Triad, LobconcoPS 0200 (Ultrasonic Compact Cleaner, USA)
DNA/RNA UV-CLEANER UV/T-AR PCR box (Biosan, Německo)
Ultrazvuková lázeň PS 02000 (Power Sonic, USA)

HPLC Dionex UltiMate 3000 series, PDA detektor Vanquish, autosampler Dionex UltiMate 3000, Pump UltiMate (ThermoFisher Scientific, USA) s kolonou Kinetex F5, 2,6 µm, 4,6 x 150 mm (Phenomenex, USA)

Lednice (Gorenje, Slovinsko)

Mrazák (Gorenje, Slovinsko)

Další laboratorní pomůcky (špičky, buničina, pinzeta, skalpel atd.)

Exsikátor (Kartell SPA, Itálie)

4.3 Použité primery

Tabulka 1: Sekvence použitých primerů

Primer	Sekvence 5'→3'	Citace
ITS-2 F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	[58]
ITS-3 R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT	
BAS1 F	ATGCTGTGCCTATGAATGTTGC	[59]
BAS1 R	GACTCAGCAAAATCGCATCG	
Pa3LTP F	CATTAGGACCCTCAACGGC	[60]
Pa3LTP R	TTGTTAGGGTTGACTCCAGGG	

4.4 Použitý rostlinný materiál

Pro izolaci DNA broskve a meruňky, která sloužila jako pozitivní kontrola, byl použit list a plod z těchto dvou druhů ovocných stromů.

4.5 Komerční vzorky využité pro simultánní detekci broskve a meruňky

V rámci diplomové práce byly analyzovány vzorky obsahující meruňky a broskve ve své ovocné složce. Vybranými vzorky byly různé druhy dětských příkrmů (tvarohový krém, pyré aj.), dál pak čaj nebo müsli tyčinky. Obsah jednotlivých druhů a vybrané vlastnosti jednotlivých vzorků jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 2). Vzorky, které byly použity pro stanovení specifity primerů BAS1 a Pa3LTP jsou uvedeny a popsány v kapitole 4.5.1.

- Hamánek broskvev meruňka 100 g (vzorek 1)
Typ vzorku: Ovocná kapsička pro děti – pyré.
Složení: 100 % ovoce (jablka 70 %, meruňky 15 %, broskve 15 %), citronová šťáva z koncentrátu, antioxidant: kyselina askorbová, vitamin C.
- Hipp broskvev meruňka tvarohový krém 160 g (vzorek 2)
Typ vzorku: Tvarohový krém pro děti s ovocnou složkou ve formě pyré.
Složení: Ovoce 41 % (broskve 18 %, meruňky 12 %, banány, citronová šťáva z koncentrátu citronové šťávy), voda, MLÉKO, koncentrát hroznové šťávy, odtučněný TVAROH * 8 %, vařená rýže, rýžový škrob, kukuřičný škrob, regulátor kyselosti citrát vápenatý, Antioxidační kyselina askorbová.

- Holle Bio Panda peach 100% ovocné pyr  broskve, meruňka, banán a řpalda 100 g (vzorek 3)
Typ vzorku: Ovocn  kapsiřka pro děti – pyr .
SloŹen : Broskve 40 %, banány 33 %, meruňky 25 %, řpalda 2 %.
- Vitabio ovocn  BIO kapsiřky Cool Fruits jablko broskve meruňka a acerola 90 g (vzorek 4)
Typ vzorku: Ovocn  kapsiřka pro děti – pyr .
SloŹen : Jablka 67 %, broskve 20 %, meruňky 10 %, acerola 3 %.
- Meruňka a broskve – ovocn  řaj (vzorek 5)
Typ vzorku: Ovocn  řaj.
SloŹen : ř pky, kousky jablek, ibiřek, pomeranřov  k ra, kousky meruňek (min.10 %) (meruňka, konzervařn  látky: oxid siřiřit  – max 2000 ppm-, oddělující prostředek: r Źov  mouka), broskve kousky (min.10 %) (broskve, konzervařn  látky: oxid siřiřit  -max. 2000 ppm-, oddělující prostředek: r Źov  mouka), aroma, kv ty sluneřnice, kv ty osmanthu.
- Mini müsli t řinky s meruňkami bez lepku 70 g (vzorek 6)
Typ vzorku: Müsli t řinka.
SloŹen : Meruňkov  pasta 36 %, OVESN  vlořky klíčení bez lepku *33 %, sluneřnicov  olej, voda, datlov  pasta 7,5 %, mlet  sušen  jablka 2,5 %, ovocn  pr řek maracuja, p rodn  aroma, mořsk  s l, ovocn  pr řek Acerola 0,1 %.

Tabulka 2: Obsah ovocn  sloŹky a vybran  vlastnosti analyzovaných vzorků.

Vzorek	Obsah ovocn� sloŹky – meruňka	Obsah ovocn� sloŹky – broskve	Jableřn� sloŹka	Skupenství	Aditiva
Vzorek 1	15 %	15 %	ANO (70 %)	Tekut�	ANO
Vzorek 2	12 %	18 %	NE	Tekut�	ANO
Vzorek 3	25 %	40 %	NE	Tekut�	NE
Vzorek 4	10 %	20 %	ANO (67 %)	Tekut�	NE
Vzorek 5	min. 10 %	min. 10 %	ANO	Pevn�	ANO
Vzorek 6	36 %	–	ANO (2,5 %)	Pevn�	ANO

4.5.1 Seznam použitých komerčních vzorků pro stanovení specifity duplex PCR

- Apotheke Dětský čaj Lesní směs s malinou BIO (vzorek S1)
Typ vzorku: Ovocný čaj
Složení: Šípek plod, ibišek květ, rakytník plod, ostružiník list 10 %, přírodní aroma, jahodník list 5 %, máta nať, lékořice kořen, malina plod 2 %, borůvka plod 1 %.
- Relax pyrė 100% malina, 120 g (vzorek S2)
Typ vzorku: Ovocná kapsička – pyrė
Složení: Jablko (37 %), Mrkev (32 %), Jablečná šťáva z koncentrátu (14 %), Banán (10 %), Maliny (4 %), Jahody (2 %), borůvková šťáva z koncentrátu (1 %), aromata.
- dmBio příkrm jablko, jahody a maliny, 190 g (vzorek S3)
Typ vzorku: Ovocná přesnídávka – pyrė
Složení: 83 % hm. jablka, 10 % hm. jahody, 5 % hm. maliny, 2 % hm. borůvky, antioxidační látka: kyselina askorbová.
- dmBio proteinové smoothie, 250 ml (vzorek S4)
Typ vzorku: Smoothie – macerované ovoce
Složení: 34,49% MANDLOVÝ NÁPOJ (voda, MANDLE, mořská sůl), 29,99% banánová dřev, 21,5% borůvková šťáva, 6% malinová šťáva, 3% bílá hroznová šťáva, 3% citronová šťáva, 2% MANDLOVÁ PROTEINOVÁ MOUKA, 0,02% sušená vanilka
- dmBio ovocná tyčinka banán a borůvka, 25 g (vzorek S5)
Typ vzorku: Müsli tyčinka
Složení: 33 % banánové vločky, 26 % CELOZRNÁ OVESNÁ MOUKA, koncentrát hroznové šťávy bílý, koncentrát hruškové šťávy, palmový tuk, 4 % koncentrát borůvkové šťávy, oplatky (PŠENIČNÁ MOUKA, bramborový škrob).

4.6 Molekulárně-biologické analýzy

Molekulární část diplomové práce byla zaměřena na detekci DNA broskve a meruňky v analyzovaných vzorcích. V rámci genomické části práce byla provedena izolace DNA, polymerázová řetězová reakce (PCR), vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM), a také gelová elektroforéza.

4.6.1 Příprava vzorků na izolaci DNA

Před samotnou izolací DNA byly kapalné vzorky převedeny do 50ml zkumavek, ve kterých byly zamrazeny při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně byly lyofilizovány po dobu 48h v lyofilizátoru. Takto připravené vzorky byly uchovávány v chladu a suchu.

Pevné vzorky byly pomocí kávomlýnku rozemlety na menší částice, čímž zároveň došlo k jejich homogenizaci. Takto připravené vzorky byly uchovávány v suchu.

4.6.2 Izolace DNA z meruňky a broskve

Pro izolaci DNA z rostlinného materiálu byl využit EliGene Plant DNA Isolation Kit od firmy Elisabeth Pharmakon a izolace DNA probíhala dle přiloženého návodu, který byl součástí kitu. Nejprve byla izolována rostlinná DNA z listů broskve a meruňky, která dále v práci sloužila jako pozitivní kontrola při PCR.

Do 1,5ml zkumavky bylo naváženo 0,2 g homogenizačního písku a 0,05 g rostlinného materiálu (listu). Pomocí tloučku, který byl součástí kitu, byl rostlinný materiál nejprve rozdrčen, následně bylo do zkumavky přidáno 450 µl homogenizačního pufru P1 a obsah zkumavky byl zhomogenizován. Ke zhomogenizované směsi bylo následně přidáno 50 µl lyzačního pufru P2, obsah zkumavky byl krátce zvortexován a takto připravená směs byla inkubována po dobu 10 minut při teplotě 65 °C z občasného míchání. Po dokončení inkubace byl obsah zkumavek zcentrifugován (10 000 g, 3 min, 23 °C). Po centrifugaci byl supernatant odpipetován do čistých 1,5 ml zkumavek a bylo k němu přidáno 175 µl pufru odstraňujícího inhibiční látky (P3). Obsah zkumavek byl krátce zvortexován, inkubován při 5 minut na ledu a následně zcentrifugován (10 000 g, 3 min, 23 °C). Po centrifugaci bylo 500 µl supernatantu převedeno do čisté 2ml zkumavky. K supernatantu bylo nejprve přidáno 500 µl vázacího pufru P4 a obsah zkumavky byl krátce zvortexován, Následně bylo přidáno 500 µl vázacího pufru P5 a obsah zkumavky byl znovu krátce zvortexován. Z takto připravené směsi bylo pipetováno 750 µl na spin filtr (součástí kitu) a byla provedena centrifugace (10 000 g, 3 min, 23 °C). Po centrifugaci byl vyjmut spin filtr opatrně ze zkumavky a supernatant byl slit, spin filtr byl umístěn zpět do zkumavky a opět bylo pipetováno 750 µl směsi na spin filtr a opět byla provedena centrifugace (10 000 g, 3 min, 23 °C). Po centrifugaci byl spin filtr převeden do nové 2ml zkumavky, na spin filtr bylo pipetováno 500 µl čistícího pufru P6 a byla provedena centrifugace (10 000 g, 1 min, 23 °C). Po centrifugaci byl spin filtr opatrně vyjmut ze zkumavky a supernatant byl slit. Spin filtr byl pak umístěn zpět do stejné 2ml zkumavky, bylo na něj pipetováno 500 µl čistícího pufru P7 a byla provedena centrifugace (10 000 g, 1 min, 23 °C). Po centrifugaci byl znovu vyjmut spin filtr ze zkumavky, supernatant byl slit a spin filtr byl umístěn zpět do stejné 2ml zkumavky. Následně byla provedena centrifugace (12 000 g, 2 min, 23 °C), která sloužila pro vysušení membrány spin filtru. Po vysušení byl spin filtr opatrně přenesen do nové 2 ml zkumavky, na filtr bylo pipetováno 100 µl elučního pufru P8 a naposledy byla provedena centrifugace (10 000 g, 1 min, 23 °C). Po centrifugaci byl spin filtr odebrán a supernatant byl odpipetován do nové 1,5 ml zkumavky, ve které byla DNA uchovávána v lednici před další použitím.

4.6.3 Izolace DNA z komerčních vzorků bez použití pektinázy

Při izolaci DNA z reálných vzorků byl rovněž využit EliGene Plant DNA Isolation Kit od firmy Elisabeth Pharmacon a při izolaci bylo postupováno stejně jako v kapitole 4.6.2.

4.6.4 Izolace DNA z reálných vzorků s využitím pektinázy

Stejně jako v předchozích krocích byl i v tomto případě využit kit EliGene Plant DNA Isolation Kit od firmy Elisabeth Pharmacon. Izolační protokol byl modifikován přidáním dalšího kroku, kterým byla inkubace s pektinázou, která sloužila pro odstranění inhibujících látek (polysacharidů) ze vzorku.

Do 1,5ml zkumavky bylo naváženo 0,2 g homogenizačního písku a 0,05 g vzorku. Pomocí tloučku, který byl součástí kitu, byl vzorek nejprve rozmělněn, následně bylo do zkumavky přidáno 450 µl homogenizačního pufru P1 a obsah zkumavky byl zhomogenizován. Ke zhomogenizované směsi bylo následně přidáno 50 µl lyzačního pufru P2, obsah zkumavky byl krátce zvortexován a takto připravená směs byla inkubována po dobu 10 minut při teplotě 65 °C z občasného míchání. Po dokončení inkubace byl obsah zkumavek zcentrifugován (10 000 g,

3 min, 23 °C). Po centrifugaci byl supernatant odpipetován do čistých 1,5 ml zkumavek. Nejprve bylo pomocí indikátorového papírku ověřeno pH supernatantu (pro dosažení největší efektivity pektinázy bylo vyžadováno kyselé okolo pH 3 [60]). Po ověření pH bylo ke vzorku přidáno 12,8 μl pektinázy. Výsledná koncentrace pektinázy ve směsi tak byla $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ a takto připravená směs byla inkubována při teplotě 35 °C po dobu 2 hodin[61]. Po dokončení inkubace bylo přidáno 175 μl pufru odstraňujícího inhibiční látky (P3). Obsah zkumavek byl krátce zvortexován, inkubován při 5 minut na ledu a následně zcentrifugován (10 000 g, 3 min, 23 °C). Po centrifugaci bylo 500 μl supernatantu převedeno do čisté 2ml zkumavky. K supernatantu bylo nejprve přidáno 500 μl vázacího pufru P4 a obsah zkumavky byl krátce zvortexován, Následně bylo přidáno 500 μl vázacího pufru P5 a obsah zkumavky byl znovu krátce zvortexován. Z takto připravené směsi bylo pipetováno 750 μl na spin filtr (součástí kitu) a byla provedena centrifugace (10 000 g, 3 min, 23 °C). Po centrifugaci byl vyjmut spin filtr opatrně ze zkumavky a supernatant byl slit, spin filtr byl umístěn zpět do zkumavky a opět bylo pipetováno 750 μl směsi na spin filtr a rovněž byla provedena centrifugace (10 000 g, 3 min, 23 °C). Po centrifugaci byl spin filtr převeden do nové 2ml zkumavky, na spin filtr bylo pipetováno 500 μl čistícího pufru P6 a byla provedena centrifugace (10 000 g, 1 min, 23 °C). Po centrifugaci byl spin filtr opatrně vyjmut ze zkumavky a supernatant byl slit. Spin filtr byl pak umístěn zpět do stejné 2ml zkumavky, bylo na něj pipetováno 500 μl čistícího pufru P7 a byla provedena centrifugace (10 000 g, 1 min, 23 °C). Po centrifugaci byl znovu vyjmut spin filtr ze zkumavky, supernatant byl slit a spin filtr byl umístěn zpět do stejné 2ml zkumavky. Následně byla provedena centrifugace (12 000 g, 2 min, 23 °C), která sloužila pro vysušení membrány spin filtru. Po vysušení byl spin filtr opatrně přenesen do nové 2 ml zkumavky, na filtr bylo pipetováno 100 μl elučního pufru P8 a naposledy byla provedena centrifugace (10 000 g, 1 min, 23 °C). Po centrifugaci byl spin filtr odebrán a supernatant byl odpipetován do nové 1,5ml zkumavky, ve které byla DNA uchováována v lednici před dalším použitím.

4.6.5 Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace vyizolované DNA

Čistota a koncentrace vyizolované DNA byly ověřené spektrofotometricky pomocí nanospektrofotometru Nanodrop 2000. Přístroj byl před použitím vždy očištěn pomocí UV-VIS ethanolu a sterilní buničiny. Na rameno přístroje byl nejprve nanášen blank a následně i vzorky, vždy v objemu 2 μl . Jako blank byl v tomto případě použit eluční pufr, který byl používán při izolaci DNA. Pomocí nanospektrofotometru bylo proměřené spektrum v rozsahu vlnových délek 220-340 nm. Z hodnot absorbance při 260 nm byla stanovena koncentrace izolované DNA v $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Čistota izolované DNA byla stanovena z poměrů A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230} .

4.6.6 Polymerázová řetězová reakce

Příprava PCR směsi byla prováděna ve sterilních boxech, které byly před samotnou prací vždy vysvíceny UV zářením po dobu 15 minut. V prvním boxu byly připravované PCR směsi a bylo zde pracováno pouze s PCR komponentami. Ve druhém boxu pak vždy byla do PCR směsi přidána DNA. Směs pro PCR byla vždy pipetována do speciálních 0,2 ml zkumavek a celkový objem vzorku pro PCR byl vždy 25 μl .

4.6.6.1 Ověření amplifikovatelnosti izolované DNA s využitím ITS2 primerů

U vyzolované DNA bylo potřeba ověřit její amplifikovatelnost. To bylo provedeno metodou PCR. Pro PCR byl nejprve připraven mastermix, který obsahoval všechny komponenty uvedené v tabulce (Tabulka 3) kromě DNA, která byla pipetována až jako poslední. Do zkumavek bylo pipetováno 24 μl připraveného mastermixu a do každé zkumavky byl následně pipetován 1 μl izolované DNA. Takto připravené zkumavky byly umístěny do termocycleru a byla provedena PCR dle schématu v tabulce (Tabulka 4). Součástí PCR byla také analýza křivek tání, která sloužila ke zjištění, zda a u kterých vzorků došlo ke vzniku specifických amplikonů.

Tabulka 3: Složení PCR směsi s primery ITS2 s koncentrací primerů $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ v reakční směsi

PCR komponenta	Objem [μl]
PCR H ₂ O	9,5
SYTO	12,5
ITS - 2 F	1,0
ITS - 3 R	1,0
DNA	1,0
Celkem	25,0

Tabulka 4: Teplotní profil PCR pro ITS2 primery

Krok PCR	Počet opakování	Čas [s]	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]
Počáteční denaturace	1	300	95
Denaturace	35	30	95
Hybridizace primerů		30	52
Polymerace		45	72
Elongace	1	600	72

4.6.6.2 Singleplex PCR s využitím druhově specifických primerů

Pro důkaz jednotlivých ovocných druhů ovoce ve vzorku byly využity druhově specifické primery. Pro důkaz broskve byly využity primery BAS1 a pro důkaz meruňky ve vzorku potom primery Pa3LTP. Pro singleplex PCR s druhově specifickými primery byl použit stejný teplotní profil jako pro multiplex PCR. V PCR směsi však byl obsažen vždy pouze jeden pár druhově specifických primerů a bylo sledování, zda budou průběh reakce a účinnost primerů nějak ovlivněny ve srovnání s multiplex PCR, pokud je každý pár ve směsi samostatně. Směs pro PCR byla připravena dle tabulek (Tabulka 5-7). Teplotní profil PCR s využitím druhově specifických primerů je uveden v tabulce (Tabulka 8).

Tabulka 5: Směs pro PCR s primery BAS1 s koncentrací primerů $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ v reakční směsi

PCR komponenta	Objem [μl]
PCR H ₂ O	11,00
SYTO	12,50
BAS1 F	0,25
BAS1 R	0,25
DNA	1,00
Celkem	25,00

Tabulka 6: Směs pro PCR s druhově specifickými primery pro broskev (BAS1) s koncentrací primerů $200 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ v reakční směsi

PCR komponenta	Objem [μl]
PCR H ₂ O	10,5
SYTO	12,5
BAS1 F	0,5
BAS1 R	0,5
DNA	1,0
Celkem	25,0

Tabulka 7: Směs pro PCR s druhově specifickými primery pro meruňku (Pa3LTP) s koncentrací primerů $400 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ v reakční směsi

PCR komponenta	Objem [μl]
PCR H ₂ O	7,5
SYTO	12,5
Pa3LTP F	2,0
Pa3LTP R	2,0
DNA	1,0
Celkem	25,0

Tabulka 8: Teplotní profil PCR s druhově specifickými primery

Krok PCR	Počet opakování	Čas [s]	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]
Počáteční denaturace	1	600	95
Denaturace	35	2	95
Hybridizace primerů		15	52
Polymerace		25	72
Elongace	1	300	72

4.6.6.3 Duplex PCR s využitím BAS1 a Pa3LTP primerů pro simultánní detekci meruňky a broskve

Pro simultánní detekci dvou ovocných druhů ve vzorku byly využité specifické primery BAS1 pro broskev a Pa3LTP pro meruňku. Složení PCR směsi a teplotní profil duplex PCR s využitím specifických primerů jsou uvedeny v tabulkách (Tabulka 9, Tabulka 10) níže.

Tabulka 9: Složení PCR směsi pro duplex PCR se specifickými primery pro broskev a meruňku

PCR komponenta	Objem [μl]
PCR H ₂ O	5,5
SYTO	12,5
BAS1 F	0,5
BAS1 R	0,5
Pa3LTP F	2,0
Pa3LTP R	2,0
DNA	2,0
Celkem	25,0

Tabulka 10: Teplotní profil PCR směsi pro duplex PCR se specifickými primery pro broskev a meruňku

Krok PCR	Počet opakování	Čas [s]	Teplota [°C]
Počáteční denaturace	1	600	95
Denaturace	35	2	95
Hybridizace primerů		15	52
Polymerace		25	72
Elongace	1	300	72

4.6.6.4 Stanovení citlivosti primerů pro duplex PCR

Stanovení citlivosti primerů sloužilo k určení nejmenšího stanovitelného množství DNA, které dokážou páry primerů v PCR směsi detekovat a amplifikovat. Jako standard sloužila amplifikovatelná DNA vyizolovaná z listů broskve a meruňky. Pro stanovení citlivosti byly zvoleny celkem 4 koncentrace: $3,5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$; $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$; $100 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a $10 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Zároveň byly při stanovení citlivosti analyzovány vzorky obsahující pouze DNA vyizolovanou z broskve, nebo z meruňky. PCR směs byla připravena stejně jako pro duplex PCR dle postupu v kapitole 4.6.6.3.

4.6.6.5 Stanovení specifity primerů pro duplex PCR

Stanovení specifity primerů sloužilo k určení specifity a přesnosti primerů, tedy k ověření, že jsou navržené primery dostatečně specifické pro detekci vybraných ovocných druhů. Při tomto stanovení bylo postupováno stejně jako v kapitole 4.6.6.3. Pro toto stanovení byla kromě vyizolované DNA z broskve a meruňky použita DNA, která neobsahovala tyto dva ovocné druhy. Pro stanovení specifity byly využity vzorky uvedené v kapitole 4.5.1.

4.6.7 Vysokorozlišovací analýza křivek tání (PCR-HRM)

Pro křivky tání vzorků obsahující vícedruhovou ovocnou DNA, u kterých není možné rozeznat teplotu tání specifických amplifikovaných produktů při běžné analýze křivek tání s krokem $0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ se využívá tzv. vysokorozlišovací analýza křivek tání (PCR-HRM). Po provedení duplex PCR byly reakční směsi obsahující vzniklé amplikony přepipetovány do speciálních zkumavek (stripů) a následně byla provedena vysokorozlišovací analýza křivek tání pomocí přístroje Roche LightCycler Nano s krokem $0,01 \text{ }^\circ\text{C}$. Vyhodnocení výsledků HRM analýzy bylo provedeno pomocí softwaru LightCycler Nano Software 1.1.

4.6.8 Gelová elektroforéza

Pro elektroforézu byl nejprve připraven 1,2% agarózový gel v $0,5\text{x}$ TBE pufru (připravený z: 54 g Tris báze, 27,5 g kyseliny borité, 40 ml $0,5\text{M}$ EDTA, doplněný destilovanou vodou na celkový objem 1 l a následně 10x zředěný). Do Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo 1,2 g agarózy a následně bylo přidáno 100 ml TBE pufru. Následně byl roztok v mikrovlnné troubě přiveden několikrát k varu, čímž došlo k úplnému rozpuštění agarózy. Takto připravený agarózový gel byl ochlazen na teplotu $60\text{-}70 \text{ }^\circ\text{C}$ a bylo do něj přidáno $5 \mu\text{l}$ interkalačního barviva Midori Green, které sloužilo jako barvivo umožňující UV detekci po provedení elektroforézy. Takto připravený agarózový gel byl nalit do formy s umístěným hřebínkem. Agarózový gel byl ponechán, aby vychladnul a zatuhnul. Jakmile gel zatuhnul, byl z něj vyjmut hřebínek a na gel byly pipetovány vzorky, pozitivní a negativní kontrola a žebříček, který

sloužil pro určení velikosti fragmentů. Před nanesením vzorků na gel byly tyto vzorky smíchány s nanášecím pufrem red load (5:1 tedy 25 μ l PCR produktu a 5 μ l nanášecího pufru) a byly pipetovány do jamek na gelu. Do jednotlivých jamek bylo v případě vzorků a kontrol pipetováno 15 μ l, v případě žebříčku bylo pipetováno pouze 5 μ l. Standard (žebříček) sloužil pro určení velikosti amplifikovaného produktu a obsahoval fragmenty DNA o různé velikosti dle typu použitého standardu. Jakmile byly vzorky, pozitivní a negativní kontrola a žebříček nanесeny na gel, byl tento gel umístěn do elektroforetické vany a přelit 0,5x TBE pufrem. Elektroforetická vana byla připojena ke zdroji napětí tak, aby molekuly, zejména záporně nabitá DNA, migrovaly ke kladně nabitě anodě. Elektroforéza probíhala po dobu 2 hodin při napětí 80 V pro singleplex PCR, pro detekci PCR produktů z duplex PCR probíhala elektroforéza 3 hodiny při napětí 60 V. Po ukončení elektroforézy byl gel vyjmut z elektroforetické vany a pomocí transluminátoru byl tento gel zanalyzován s využitím UV záření o vlnové délce 302 nm.

4.7 Instrumentální část

Součástí instrumentální části práce byla extrakce fenolických látek. Dále pak přečištění a zakoncentrování extraktů a HPLC analýza.

4.7.1 Příprava vzorku

V rámci instrumentální části práce byly vzorky připraveny a uchovávány stejně jako v případě části molekulární, tedy dle postupu v kapitole 4.6.1.

4.7.2 Extrakce fenolických látek

Pro extrakci fenolických látek byl do zkumavky navážen 1 g vzorku připraveného dle návodu v kapitole 4.6.1. Do zkumavky bylo pipetováno 5 ml extrakčního činidla, tedy směsi ethanolu s vodou (7:3) okyselené HCl na pH 2. Takto připravené vzorky byly vloženy do ultrazvukové vodní lázně (40 kHz, 60 min, 25 °C). Po dokončení byly vzorky zcentrifugovány (5000 rpm, 10 min, 23 °C) a supernatant byl odpipetován do nových zkumavek. Extrakty byly zfiltrány před hydrofobní 0,45 μ m filtr a před dalším použitím byly uchovány v mrazáku při -15 °C [62].

4.7.3 Přečištění extraktů

Vzhledem k podezření na kontaminaci polysacharidy byly extrakty přečištěny. Po odstranění polysacharidů bylo zvoleno jejich srážení nadbytkem ethanolu podle Xu a kol. [64].

Do zkumavky bylo pipetováno 1 nebo 5 ml surového extraktu, ke kterému byl přidán pětinasobek objemu UV-VIS ethanolu. Obsah zkumavky byl krátce zvortexován a ponechán po dobu 2 hodin při teplotě -20 °C. Následně byla provedena centrifugace (10 000 g, 15 min, 10 °C). Po zcentrifugování byl supernatant odpipetován do čisté zkumavky a byl ponechán v exsikátoru připojenému k membránové vývěvě, kde ve vakuu došlo k odpaření rozpouštědla. Zbytek po odpaření rozpouštědla byl rozpuštěn v 500 μ l extrakčního činidla.

4.7.4 Zakoncentrování vzorků

V rámci optimalizace HPLC analýzy byly extrakty zakoncentrovány 2x a 10x. Extrakty byly nejprve přečištěny dle postupu v kapitole 4.7.3. V případě dvojnásobného zakoncentrování byl přečištěn 1 ml surového extraktu a zbytek po odpaření rozpouštědla byl rozpuštěn v 500 μ l

extrakčního činidla. V případě desetinásobného zakoncentrování bylo přečištěno 5 ml extraktu a zbytek po odpaření rozpouštědla byl rozpuštěn opět v 500 µl extrakčního činidla.

4.7.5 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Připravené extrakty byly analyzovány pomocí HPLC. Před analýzou bylo pipetováno 500 µl připraveného extraktu do vialky. Analýza extraktů probíhala pomocí gradientové eluce jejíž parametry jsou uvedeny v tabulkách níže (Tabulka 11, Tabulka 12). Kolona a autosampler byly vyhřívány termostatem na teplotu 35 °C. PDA detektor byl nastavený na vlnové délky 260, 280, 300 a 680 nm. Jednotlivé chromatogramy byly vyhodnoceny pomocí softwaru Chromeleon.

Tabulka 11: Parametry HPLC analýzy

Kolona	Kinetex F5 C18, velikost částic 2,6 µm, 4,6 x 150 mm
Nástřík vzorku	20 µl
Mobilní fáze (MF)	MF A: acetonitril
	MF B: 0,1 % TFA v deionizované vodě
Průtok MF	0,4 ml · min ⁻¹
Detektor	ThermoScientific PDA detektor
Teplota kolony	35 °C
Doba analýzy	30 minut
Eluce	Gradientová

Tabulka 12: Parametry gradientové eluce.

Čas [min]	MF A [%]	MF B [%]
0	10	90
1	10	90
5	12	88
10	25	75
15	40	60
20	55	45
22	70	30
30	10	10

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Předložená diplomová práce byla zaměřená na stanovení autenticity různých typů potravinářských produktů s ovocnou složkou pomocí molekulárních a instrumentálních metod. Konkrétně pak byla diplomová práce zaměřená na simultánní stanovení broskve a meruňky ve vzorku. Tato práce byla zaměřená na optimalizaci extrakce DNA a zároveň na optimalizaci molekulárních metod na bázi multiplex PCR. Dále pak byla zaměřena na optimalizaci stanovení a charakterizaci obsahových složek ovoce pomocí HPLC/PDA. V neposlední řadě byl sledován vliv potravinové matrice na samotné stanovení pomocí molekulárních a instrumentálních metod.

Pro analýzu bylo vybráno celkem 6 vzorků, které obsahovaly jak broskev, tak meruňku. V diplomové práci byly analyzovány vzorky obsahující také podíl jablečné složky nebo různá aditiva. Dále pak byly analyzovány vzorky v kapalném (ovocné pyré) a pevném stavu (čaj, müsli tyčinka).

5.1 Molekulární část

V molekulární části práce byla nejprve izolována DNA, která byl následně podrobena PCR. Po dokončení amplifikace byly vzorky podrobeny vždy analýze křivek tání (PCR s primery ITS2), nebo vysokorozlišovací analýze křivek tání (HRM) a následně i agarózové gelové elektroforéze.

5.1.1 Izolace rostlinné DNA

Rostlinná DNA byla vyizolována pomocí kitu EliGene Plant DNA Isolation Kit od firmy Elisabeth Pharmacon. Pro izolaci rostlinné DNA byly vybrány jak plod meruňky a broskve, tak listy těchto ovocných druhů. DNA z listů byla izolována dle postupu v kapitole 4.6.2, DNA z plodů pak byla izolována s využitím pektinázy dle postupu v kapitole 4.6.4. Koncentrace a čistota vyizolované DNA byly změřeny pomocí přístroje NanoDrop Spectrophotometer 2000 dle postupu v kapitole 4.6.5. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 13).

Tabulka 13: Koncentrace vyizolované rostlinné DNA z plodu či listu broskve a meruňky

DNA	Koncentrace [ng · μl ⁻¹]	A260/280	A260/230
Broskev – list	13,07 ± 0,06	1,58 ± 0,05	0,81 ± 0,02
Broskev – plod	4,50 ± 0,14	1,04 ± 0,04	0,10 ± 0,03
Meruňka – list	0,80 ± 0,10	5,98 ± 7,79	0,14 ± 0,01
Meruňka – plod	2,20 ± 0,08	1,71 ± 0,30	0,06 ± 0,01

Základními parametry, které byly sledovány u vyizolované DNA byly koncentrace a dále pak čistota, kterou lze určit z poměrů absorbancí A260/280 a A260/230. Poměr absorbancí A260/280 by měl být okolo hodnoty 1,8. Hodnoty nižší než 1,8 značí kontaminaci proteiny, fenolem nebo jinými látkami, které absorbují záření při vlnové délce 280 nm [63]. U DNA izolované z plodu broskve byla hodnota pouze 1,04 ± 0,04. Naopak u DNA izolované z listu meruňky se hodnoty A260/280 pohybovaly okolo hodnoty 6, tato hodnota však byla ovlivněna téměř nulovými hodnotami absorbancí pro vlnové délky 260 nm a 280 nm. Vyšší hodnota by

tak mohla představovat kontaminaci RNA, v tomto případě se však spíše jednalo o nepřesnost měření [65].

Hodnoty poměrů absorbancí A260/230 by pak měly být v rozsahu 2,0-2,2. Nižší hodnota může značit kontaminaci fenolickými látkami, sacharidy nebo jinými látkami, které absorbují záření při vlnové délce 230 nm. Zejména v případě DNA izolované z plodu broskve a meruňky byla tato hodnota blízká nule. To je zejména způsobeno vysokým obsahem sacharidů a fenolických látek, které se nacházejí v plodech těchto plodin.

Zároveň mohly být některé hodnoty ovlivněny samotným kitem, který byl určen pro izolaci DNA z listů rostlin. V našem případě byly kromě listů pro izolaci využity také plody se zařazením dalšího kroku, tedy inkubace s pektinázou. Oba tyto faktory mohly hrát roli při izolaci rostlinné DNA

U vyzolované DNA byla ověřena její amplifikovatelnost a následně byla tato DNA využívána jako pozitivní kontrola při PCR se specifickými primery.

5.1.2 Izolace DNA z komerčních výrobků

DNA z reálných vzorků byla izolována pomocí kitu EliGene DNA Isolation Kit od firmy Elisabeth Pharmacon. DNA z reálných vzorků byla izolována dle postupu v kapitole 4.6.3. Koncentrace a čistota vyzolované DNA byly změřeny pomocí přístroje NanoDrop Spectrophotometer 2000 dle postupu v kapitole 4.6.5. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 14). Kromě postupu daného výrobcem izolačního kitu byl postup izolace upraven a byl přidán krok, kdy byly jednotlivé vzorky inkubovány s pektinázou dle postupu v kapitole 4.6.4. Výsledky izolace dle tohoto postupu jsou pak uvedeny v tabulce níže (Tabulka 15).

Tabulka 14: Koncentrace vyzolované DNA z reálných vzorků bez použití pektinázy

Vzorek	Koncentrace [ng · μl ⁻¹]	A260/280	A260/230
Vzorek 1 – Hamánek	4,00 ± 0,22	1,16 ± 0,01	0,23 ± 0,01
Vzorek 2 – Hipp	4,80 ± 0,14	1,39 ± 0,16	0,40 ± 0,01
Vzorek 3 – Holle	6,37 ± 0,12	1,95 ± 0,16	0,76 ± 0,03
Vzorek 4 – Vitabio	3,48 ± 0,99	1,29 ± 0,14	0,30 ± 0,02
Vzorek 5 – Čaj	6,67 ± 0,62	0,89 ± 0,03	0,20 ± 0,01
Vzorek 6 – Müsli tyčinka	68,77 ± 1,30	1,93 ± 0,02	1,27 ± 0,02

Tabulka 15: Koncentrace vyizolované DNA z reálných vzorků s využitím pektinázy

Vzorek	Koncentrace [ng · μl ⁻¹]	A260/280	A260/230
Vzorek 1 – Hamánek	1,90 ± 0,16	0,95 ± 0,04	0,09 ± 0,01
Vzorek 2 – Hipp	0,90 ± 0,14	1,00 ± 0,20	0,12 ± 0,01
Vzorek 3 – Holle	2,40 ± 0,33	0,96 ± 0,03	0,19 ± 0,01
Vzorek 4 – Vitabio	2,13 ± 0,34	1,21 ± 0,17	0,21 ± 0,01
Vzorek 5 – Čaj	2,00 ± 0,16	1,03 ± 0,06	0,15 ± 0,01
Vzorek 6 – Müsli tyčinka	12,80 ± 0,29	0,90 ± 0,01	0,17 ± 0,01

V rámci optimalizace extrakčních metod DNA byl využit kit EliGene Plant DNA Isolation kit od firmy Elisabeth Pharmacon. Tento kit je běžně použitelný pro izolaci rostlinné DNA z listů. V této diplomové práci byly využity dva postupy pro izolaci DNA. Prvním postupem byl izolační protokol udávaný výrobcem. Druhým izolačním postupem byl upravený protokol, kdy byla zařazena inkubace s pektinázou. Tento krok byl zařazen zejména proto, že analyzované vzorky obsahují značné množství sacharidů, jelikož se nejedná o DNA z listu, pro který je daný kit primárně určen, ale o DNA z plodu. Z tohoto důvodu byla tedy zařazena inkubace s pektinázou a výsledky obou těchto postupů byly zpracovány v tabulkách výše (Tabulka 14 a Tabulka 15).

V případě dodržení postupu udávaného výrobcem bylo vyizolováno větší množství DNA, než tomu bylo v případě využití pektinázy. Hodnoty poměrů absorbancí A260/280 by měl být okolo hodnoty 1,8. Nejblíže se této hodnotě přiblížily vzorky 3 a 6. V případě vzorku 3 by se tento fakt dal okomentovat absencí jablečné složky, ale také aditiv ve vzorku. V případě vzorku 6 je možné čistotu vyizolované DNA odůvodnit tím, že se jednalo o pevný, suchý vzorek, jehož některé části byly ve formě kousků. Při ohledu na složení, by však tato hodnota mohla být ovlivněna ovsem, který tvoří až 33 % daného vzorku. Vyizolovaná DNA tak mohla být rostlinná, avšak z jiného druhu. Tím by se dala vysvětlit jak koncentrace, tak čistota DNA vyizolované z tohoto vzorku. Přestože se ve vzorku nacházela i jablečná složka, vyskytovala se v něm pouze v malém množství a nemuselo tak dojít k významnému ovlivnění izolace DNA. U ostatních vzorků pak byla hodnota A260/280 značně nižší, a pravděpodobně byla tato DNA znečištěna proteiny nebo jinými látkami, které absorbují záření při vlnové délce 280 nm. U hodnoty poměrů absorbancí A260/230 by potom hodnota měla být v rozsahu 2,0-2,2. V případě komerčních vzorků se kromě vzorku 6 pohybovaly hodnoty A260/230 pod hodnotou 1. U všech vzorků by se tedy dalo uvažovat o kontaminaci fenolickými látkami nebo sacharidy.

Tento fakt přichází v úvahu zejména při pohledu na složení vzorků. Analyzované vzorky jsou dětské příkrmy, čaj a müsli tyčinka. Obecně se tedy jedná o vzorky obsahující vysoké množství sacharidů, stejně tak vysoké množství fenolických látek. Jelikož se jedná o látky absorbující záření při vlnové délce 230 nm, lze tedy usuzovat, že hodnota A260/230 byla ovlivněna právě obsahem těchto látek, které jsou přirozenou součástí produktů tohoto typu.

Z důvodu vysokého obsahu sacharidů, zejména pektinu, který se ve vzorcích nachází zejména jako součást jablečné složky, byl zařazen do izolačního postupu další krok, a to inkubace s pektinázou. Při využití pektinázy došlo k velkému poklesu výtěžku vyizolované DNA. Koncentrace DNA se v případě analyzovaných vzorků pohybovaly kromě vzorku 6, u kterého byla koncentrace vyšší, okolo $1-2 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Důležitým ukazatelem je i v tomto případě poměr absorbancí, a to při vlnových délkách 230 nm, 260 nm a 280 nm. Pro poměr absorbancí A260/280 lze konstatovat, že vyizolovaná DNA byla kontaminována proteiny nebo jinými látkami, které absorbují záření při 280 nm. Tento fakt byl pravděpodobně ovlivněn samotným použitím pektinázy. V případě poměrů absorbancí A260/230 se hodnoty přibližovaly nule, což by naznačovalo kontaminaci fenolickými látkami nebo sacharidy.

Při srovnání výsledků obou izolačních technik lze pozorovat určité rozdíly. Ze samotných hodnot koncentrace a poměrů absorbancí A260/280 a A260/230 vyplývá, že metoda s využitím pektinázy byla méně účinná, jelikož byl získán nižší výtěžek DNA a zároveň byla tato DNA více kontaminovaná, než tomu bylo v případě, kdy pektináza použita nebyla. Přestože hodnoty napovídají, který izolační postup by byl vhodnější při analýze vzorků daného typu, oba druhy vyizolované DNA byly podrobeny PCR s ITS2 primery pro ověření amplifikovatelnosti vyizolované DNA. Touto analýzou byl původní závěr vyvrácen, protože lepších výsledků bylo dosaženo právě v případě DNA vyizolované s využitím pektinázy (kapitola 5.1.3).

5.1.3 Ověření amplifikovatelnosti izolované DNA s využitím ITS2 primerů

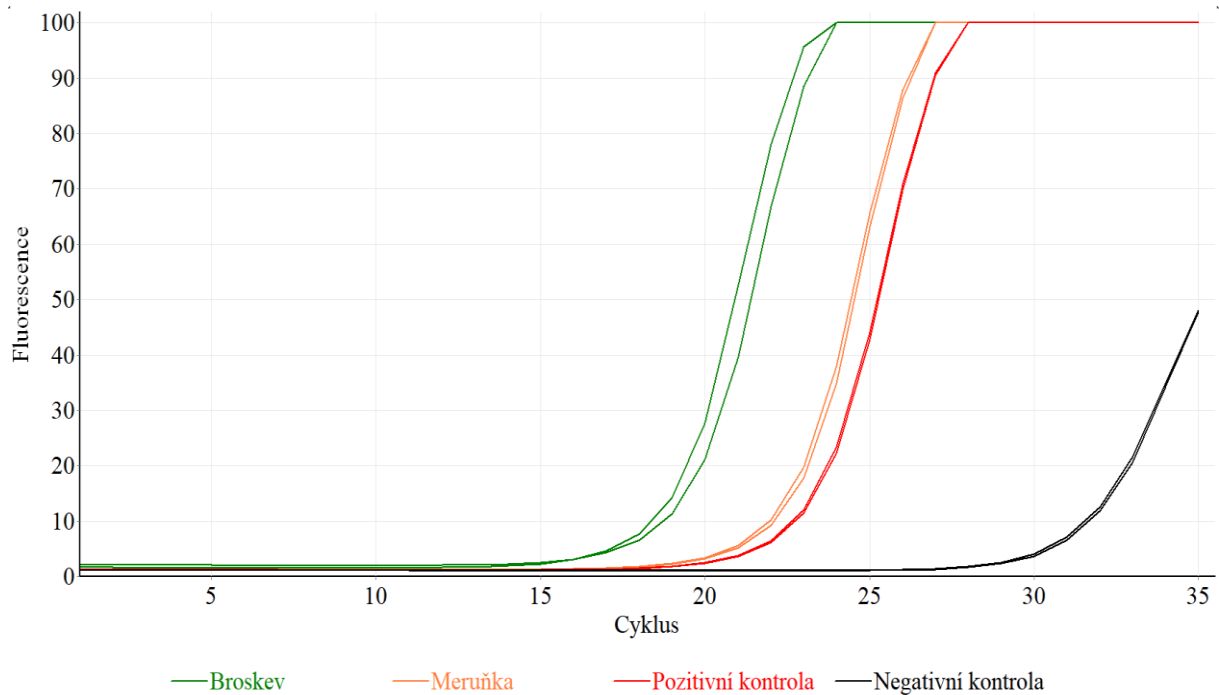
Při ověření amplifikovatelnosti vyizolované DNA bylo postupováno dle postupu v kapitole 4.6.6.1. Ověření amplifikovatelnosti bylo provedeno pro všechny vzorky izolované DNA. Toto stanovení sloužilo k potvrzení, že se jedná o DNA, která může být využita i při dalších analýzách.

5.1.3.1 Ověření amplifikovatelnosti rostlinné DNA izolované z listů

Jako první krok samotné analýzy byla vyizolována DNA z listů broskve a meruňky. Aby mohla být tato DNA dále využívána v práci jako pozitivní kontrola při dalších PCR, byla ověřena její amplifikovatelnost. Amplifikovatelnost vyizolované DNA byla ověřena metodou PCR dle postupu v kapitole 4.6.6.1 s následnou analýzou křivek tání a využitím gelové elektroforézy, ta byla provedena dle postupu v kapitole 4.6.8.

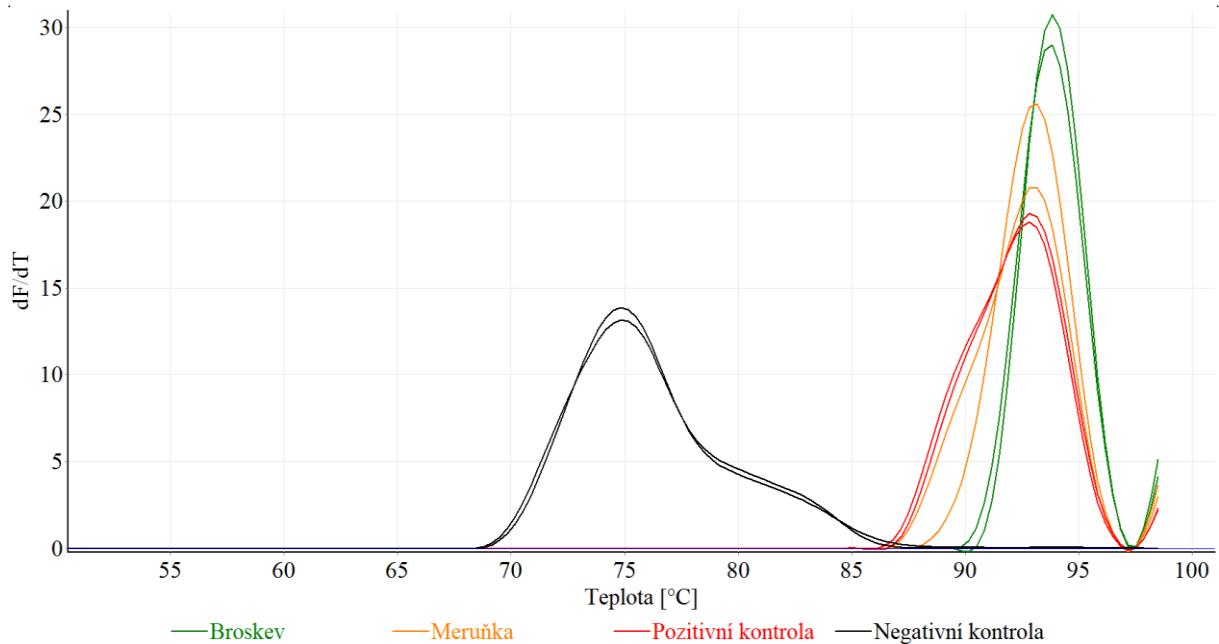
Prvním krokem byla tedy polymerázová řetězová reakce. Pro ověření amplifikovatelnosti byly při PCR využity primery ITS2 (Tabulka 1). Z tvaru amplifikačních křivek (Obrázek 5) lze pozorovat, že došlo k amplifikaci obou vyizolovaných DNA a také k amplifikaci pozitivní kontroly. Jako pozitivní kontrola byla v tomto případě využita DNA vyizolovaná z evropské borůvky, jejíž amplifikovatelnost již byla ověřena. Jako první se začala amplifikovat DNA vyizolovaná z listu broskve, a to při 14. cyklu PCR. K amplifikaci DNA meruňky a kanadské borůvky pak došlo v 18 cyklu PCR. U všech vzorků dosáhly amplifikační křivky fáze plató

a koncentrace produktu se již dále nezvyšovala. V případě negativní kontroly nedošlo k amplifikaci, což značí o čistotě negativní kontroly.



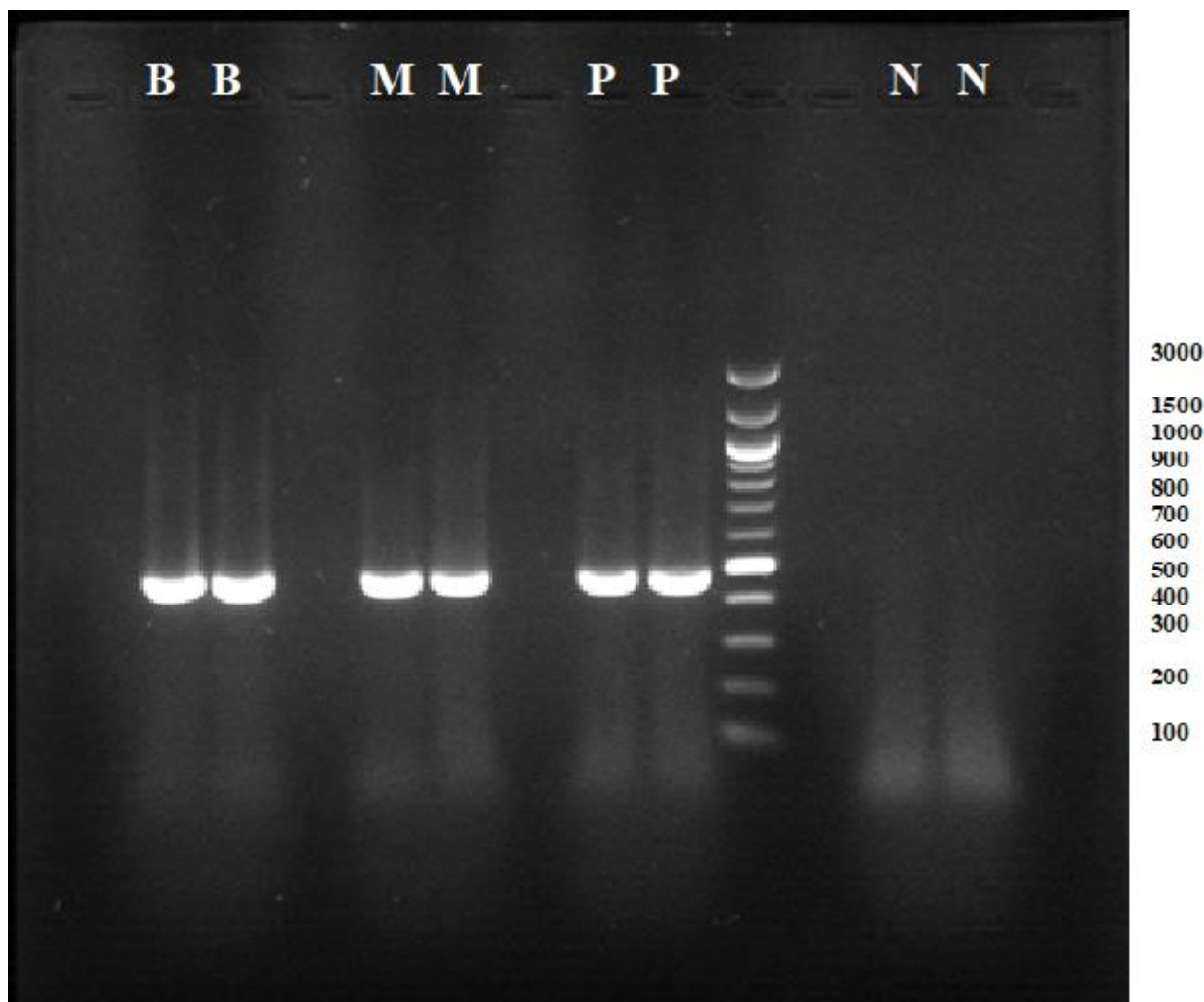
Obrázek 5: Amplifikační křivky, ověření amplifikovatelnosti vyizolované rostlinné DNA

Na obrázku níže (Obrázek 6) lze pak pozorovat křivky tání PCR produktů. Z těchto křivek lze opět pozorovat, že došlo k amplifikaci specifických produktů. Pomocí analýzy křivek tání byla také ověřena čistota negativních kontrol. V jejich případě došlo ke vzniku dimerů či oligomerů, které tvoří samostatný pík, nejednalo se však o vznik specifického produktu primerů ITS2.



Obrázek 6: Křivky tání, ověření amplifikovatelnosti vyizolované rostlinné DNA

Čistota negativních kontrol a amplifikovatelnost vyizolované DNA byla nakonec ověřena pomocí gelové elektroforézy. Na fotografii gelu (Obrázek 7) lze pozorovat v případě vyizolovaných DNA a pozitivní kontroly bandy specifických produktů o velikosti přibližně 500 bp. Zároveň lze pozorovat čistotu negativních kontrol, které netvoří v dané oblasti žádný band.

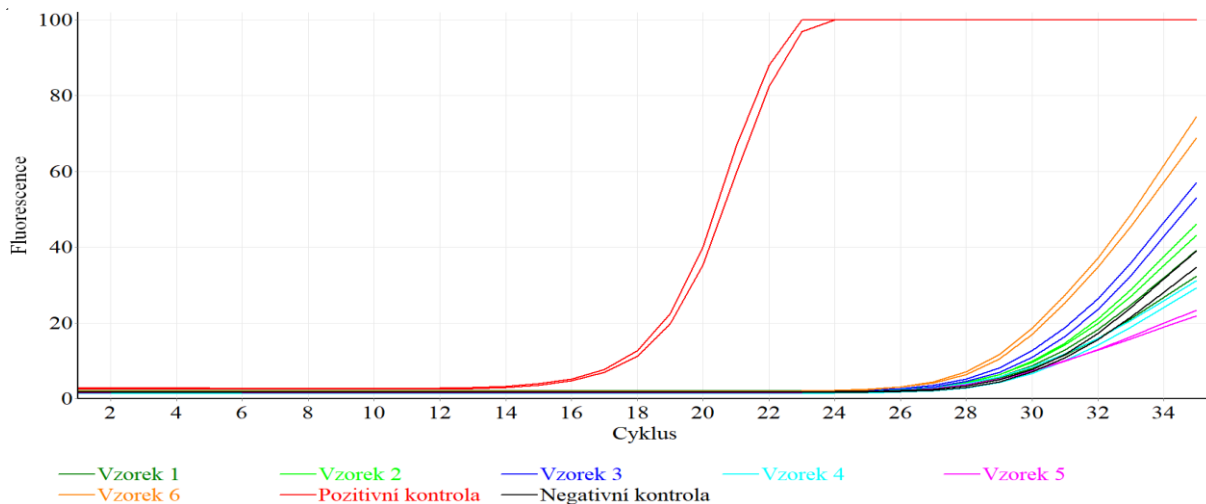


Obrázek 7: Fotografie gelu, ověření amplifikovatelnosti vyizolované rostlinné DNA (B – broskev, M – meruňka, P – pozitivní kontrola, N – negativní kontrola)

5.1.3.2 Ověření amplifikovatelnosti DNA izolované z komerčních vzorků bez použití pektinázy

U DNA vyizolované z komerčních vzorků dle postupu v kapitole 4.6.3 byla ověřena amplifikovatelnost metodou PCR dle postupu v kapitole 4.6.6.1 s následnou analýzou křivek tání a využitím gelové elektroforézy, která byla provedena dle postupu v kapitole 4.6.8.

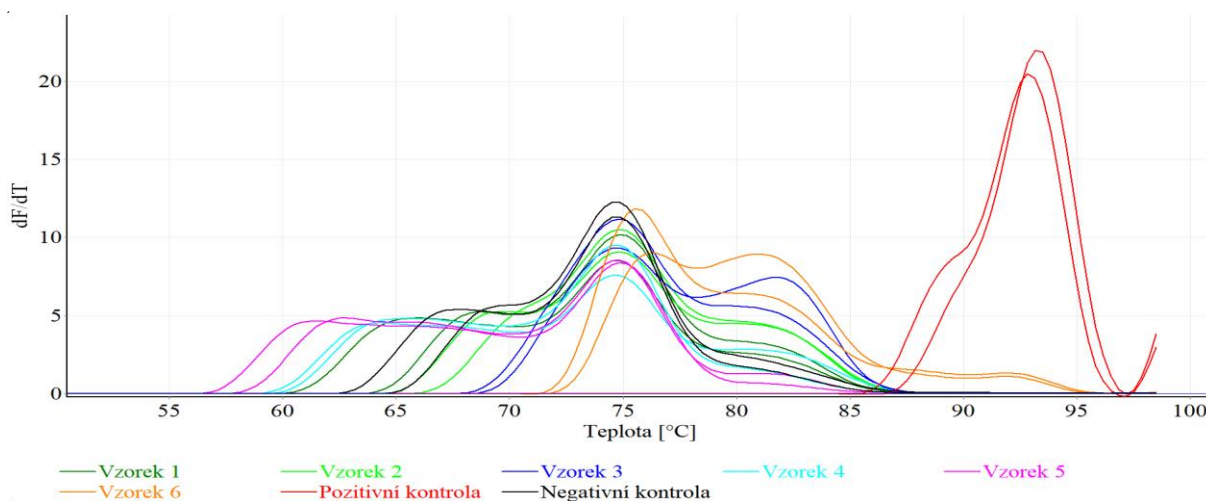
Pro ověření amplifikovatelnosti byly při PCR opět využity primery ITS2. Nejprve došlo k amplifikaci pozitivní kontroly, a to již při 12. cyklu. Pozitivní kontrola, kterou byla v tomto případě DNA vyizolovaná z listu broskve, dosáhla jako jediná fáze plató. Žádná z DNA, které byly vyizolovány z komerčních vzorků bez použití pektinázy nedosáhla fáze plató.



Obrázek 8: Amplifikační křivky, ověření amplifikovatelnosti DNA izolované z komerčních vzorků bez použití pektinázy

Na obrázku (Obrázek 8) můžeme také pozorovat, že většina křivek připadající komerčním vzorkům kopírovala tvar křivky náležící negativní kontrole a dalo by se tedy předpokládat, že u většiny vzorků nebyla vyizolována amplifikovatelná DNA.

Po provedení PCR byla provedena analýza křivek tání. Již z této analýzy bylo zřejmé, že vyizolovaná DNA z komerčních vzorků nebyla amplifikovatelná. S takto vyizolovanou DNA tedy nebylo možné pracovat při PCR s využitím specifických primerů. Jedinou DNA, která se amplifikovala, aniž by při její izolaci byla použita pektináza, byla DNA izolovaná ze vzorku 6, kterým byla müsli tyčinka. To bylo pravděpodobně způsobeno tím, že se jednalo o pevný a suchý vzorek, mohla tedy hrát značnou roli i výroba výrobku, a zároveň tím, že tento vzorek obsahoval kromě ovocné složky obilnou složku. Přestože se tato DNA amplifikovala, pravděpodobně i u ní docházelo k inhibici amplifikace a vzhledem k tomu, že v reakční směsi bylo cca 60 ng zdánlivě čisté DNA, dalo se očekávat, že křivka dojde do fáze plató, což se ale nestalo. Pozitivní kontrola tvořila specifický produkt s teplotou tání 93 °C. Při této teplotě lze na obrázku (Obrázek 9) pozorovat menší pík náležící DNA vyizolované ze vzorku 6. Zároveň lze pozorovat nespecifické produkty, které i DNA vyizolovaná ze vzorku 6 tvořila.



Obrázek 9: Křivky tání, ověření amplifikovatelnosti DNA izolované z komerčních vzorků bez použití pektinázy

Tyto nespecifické produkty, tedy různé dimery či oligomery se tvořily jak v případě negativních kontrol, tak v případě DNA vyizolované ze vzorků 1-5. Negativní kontrolu lze i přesto považovat za čistou, jelikož netvořila žádný specifický produkt. Amplifikovatelnost vyizolované DNA a čistota negativních kontrol byly rovněž ověřeny pomocí gelové elektroforézy. Na fotografii gelu (Obrázek 37), které byla zařazena mezi přílohy práce bylo možné pozorovat band o velikosti 500 bp jak u pozitivní kontroly, tak u DNA vyizolované ze vzorku 6.

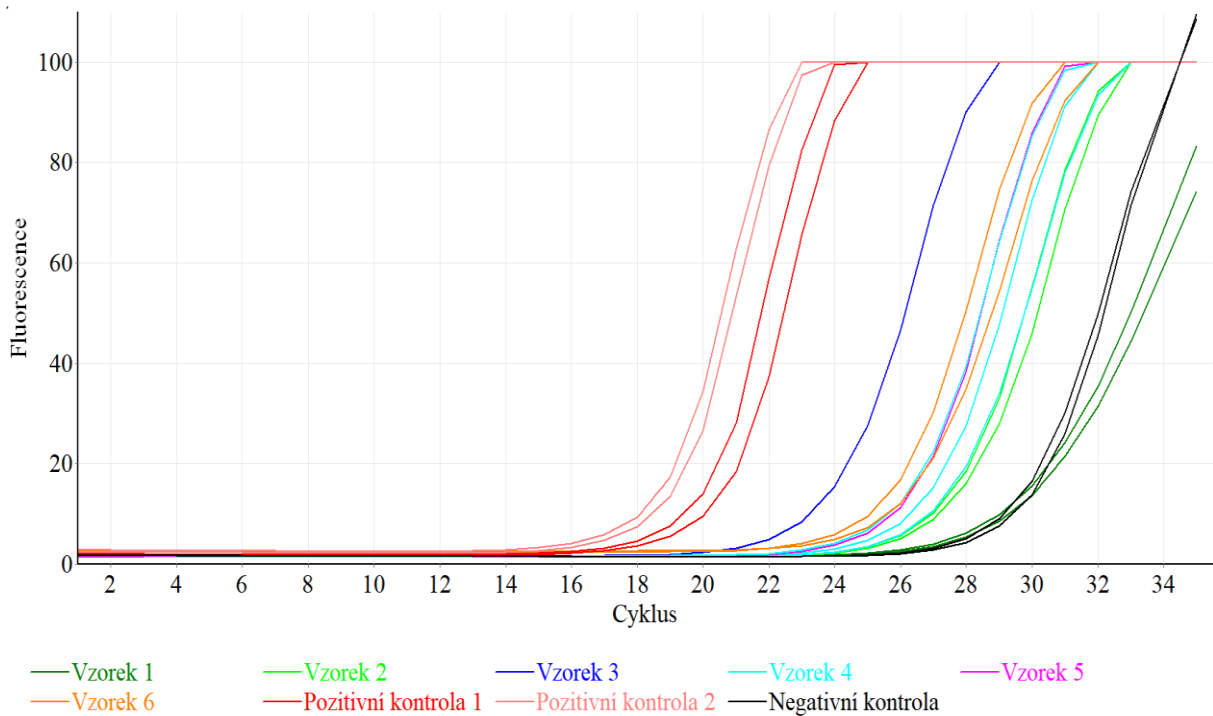
Jelikož primery ITS2 nejsou druhově specifické a jedná se o primery k ověření amplifikovatelnosti rostlinné DNA, vzhledem k povaze a množství vyizolované DNA nebyla u většiny vzorků vyizolována amplifikovatelná DNA. Důvodem amplifikovatelnosti pouze DNA vyizolované ze vzorku 6 bylo jednak složení vzorku a jednak povaha daného vzorku, jednalo se totiž o pevný, suchý vzorek s vysokým obsahem rostlinné složky a nízkým obsahem látek, které by mohly rušit samotnou izolaci DNA.

5.1.3.3 Ověření amplifikovatelnosti DNA izolované z komerčních vzorků s využitím pektinázy

Jako další postup izolace DNA byla provedena izolace s využitím pektinázy. Využití pektinázy bylo zařazeno z důvodu neúspěšné izolace DNA dle původního postupu v kapitole 4.6.3. Izolace DNA byla tedy provedena dle postupu v kapitole 4.6.4. Během tohoto postupu byla použita pektináza vyizolovaná z mikroorganismu *Aspergillus niger*. Tento krok byl zařazen z důvodu podezření na kontaminaci polysacharidy, vzhledem k tomu, že některé vzorky obsahovaly i složky bohaté na pektin. Předpokládalo se, že využitím pektinázy by mělo dojít k odstranění polysacharidů, které při využití nemodifikovaného postupu zůstávaly v izolátech DNA a znemožňovaly jejich amplifikaci. Amplifikovatelnost byla opět ověřena metodou PCR dle postupu v kapitole 4.6.6.1 s následnou analýzou křivek tání a využitím gelové elektroforézy, která byla provedena dle postupu v kapitole 4.6.8.

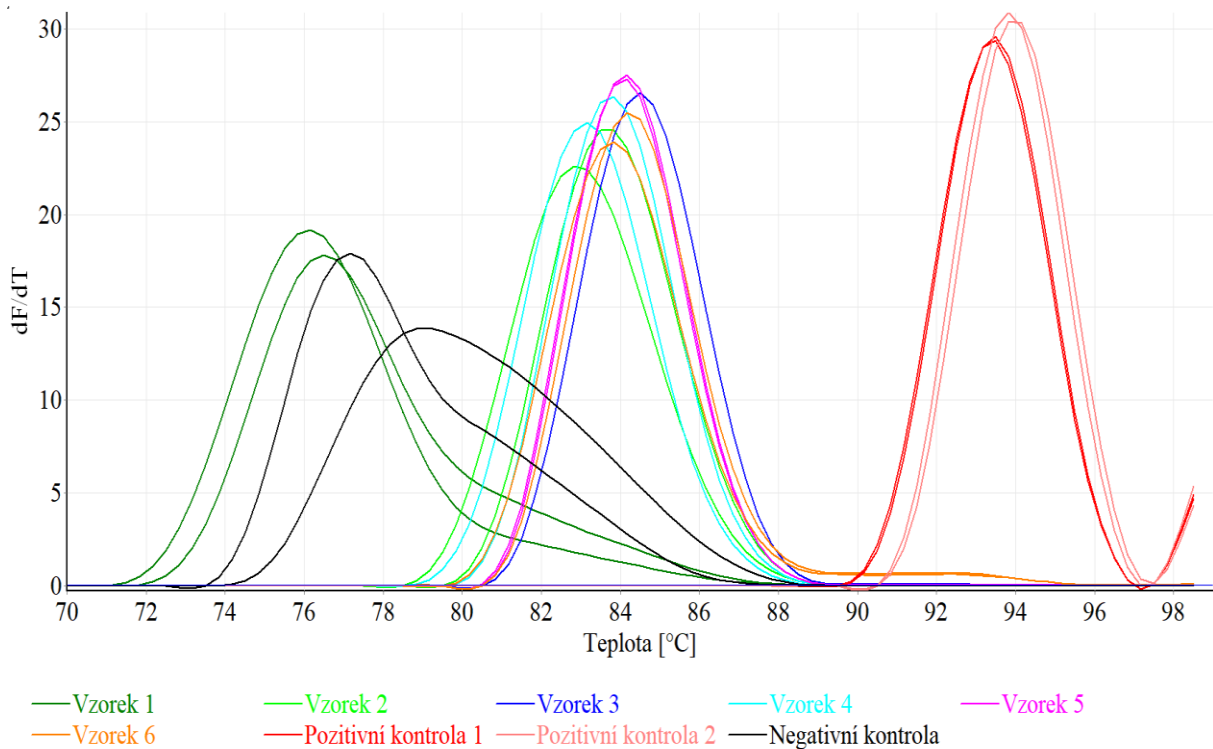
Na obrázku (Obrázek 10) lze pozorovat amplifikační křivky. Na rozdíl od předchozí metody izolace lze pozorovat, že došlo k amplifikaci vyizolované DNA. Přestože bylo množství vyizolované DNA menší než v prvním případě a rovněž její čistota stanovená dle poměrů absorbancí A260/230 a A260/280 byla nižší, na rozdíl od metody izolace bez použití pektinázy, DNA vyizolovaná s použitím pektinázy byla amplifikovatelná. Jediným vzorkem, kdy nebyla DNA amplifikovatelná byl vzorek 1.

Jako první se začaly amplifikovat pozitivní kontroly. Jako pozitivní kontroly byly v tomto případě použity již dříve vyizolované DNA, u kterých byla ověřena amplifikovatelnost. Obě tyto kontroly se začaly amplifikovat v 16. cyklu PCR a dosáhli fáze plató ve 23.-25. cyklu. V pozdějších cyklech PCR se pak začaly amplifikovat jednotlivé vzorky. Kromě vzorku 1 dosáhly před koncem reakce všechny vzorky fáze plató.



Obrázek 10: Amplifikační křivky, ověření amplifikovatelnosti DNA izolované z komerčních vzorků s využitím pektinázy

Jako další krok byla pro ověření amplifikovatelnosti stejně jako v předchozích případech provedena analýza křivek tání, kterou následovala gelová elektroforéza. Při analýze křivek tání lze sledovat tři oblasti na obrázku (Obrázek 11).



Obrázek 11: Křivky tání, ověření amplifikovatelnosti DNA izolované z komerčních vzorků s využitím pektinázy

Pozitivní kontroly tvoří specifický produkt při teplotě 94 °C. Tato teplota odpovídá tvorbě specifického produktu primerů ITS2, jak tomu bylo i v předchozích případech. Druhou oblast tvoří vzorky, které tvoří produkt s teplotou tání v rozmezí 83–85 °C. Třetí oblast pak představují negativní kontroly a vzorek 1. Již z analýzy křivek tání je jasné, že v případě vzorku 1 nedošlo k amplifikaci vyizolované DNA. Amplifikační křivky i křivky tání tohoto vzorku měly podobný tvar jako negativní kontroly. Rozdílná teplota tání mezi pozitivními kontrolami a analyzovanými vzorky byla pravděpodobně způsobena složením jednotlivých vzorků. Na rozdíl od pozitivních kontrol se totiž nejednalo o čistou, jednodruhovou DNA vyizolovanou z listů, ale o DNA vyizolovanou z komerčních vzorků, které obsahovaly jablečnou složku, případně i DNA z jiných ovocných druhů. Kromě rostlinné složky však některé vzorky obsahovaly také přídavné látky. Vliv na amplifikovatelnost mohla mít také výroba jednotlivých vzorků, které byly vystaveny vyšší teplotě, která mohla ovlivnit strukturu či stabilitu dané DNA.

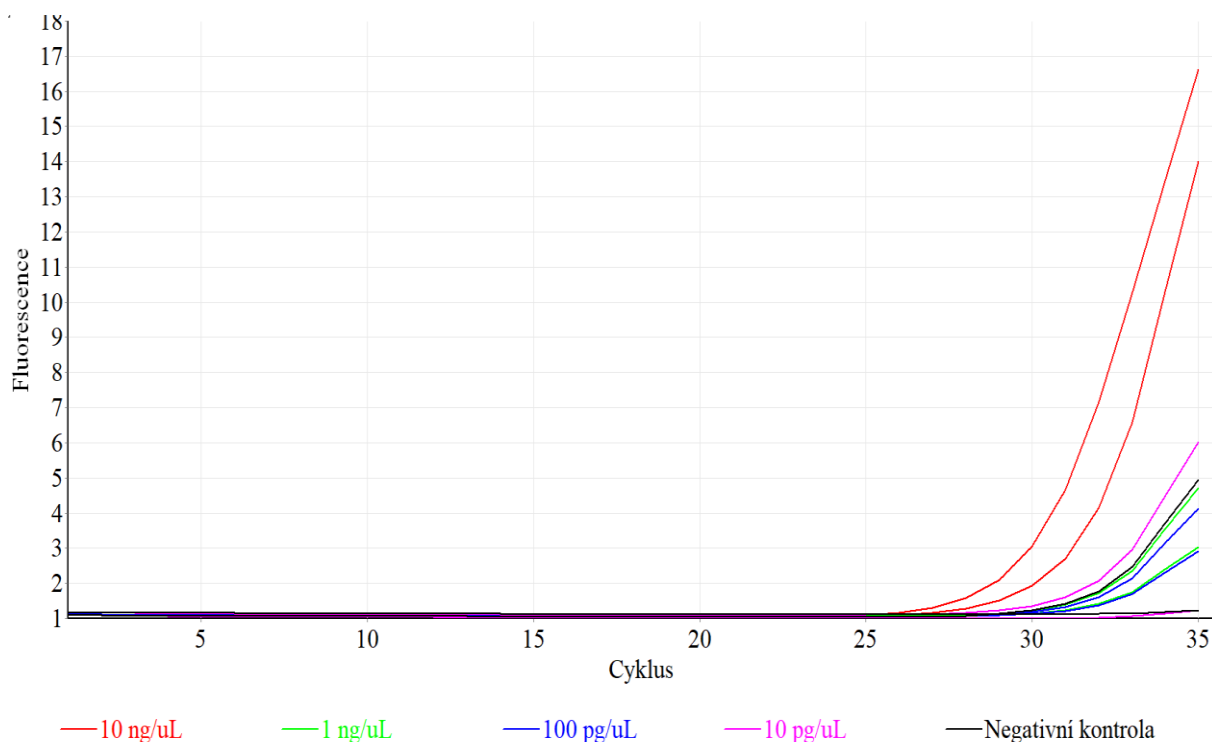
Jako poslední krok analýzy byla provedena gelová elektroforéza. Na fotografii gelu (Obrázek 38), která je součástí příloh lze pozorovat bandy o velikosti 500 bp v případě pozitivních kontrol. U negativních kontrol byla pomocí gelové elektroforézy ověřena jejich čistota. U vzorků 2-6 lze na fotografii gelu pozorovat detekovaný produkt, kdy nejvyšší odezva fluorescence byla zachycena v oblasti 500 bp, tedy v oblasti, ve které byl detekován specifický produkt ITS2 primerů v případě pozitivních kontrol. U vzorku 1 bylo pomocí gelové elektroforézy ověřeno, že vyizolovaná DNA nebyla amplifikovatelná. DNA byla ze vzorku proto ještě jednou izolovaná s prodloužením inkubace s pektinázou a následně byla ověřena její amplifikovatelnost. Po prodloužení inkubace s pektinázou byla vyizolována amplifikovatelná DNA.

5.1.4 Detekce DNA broskve pomocí specifických primerů (BAS1) s využitím singleplex PCR

Pro detekci druhové DNA broskve s využitím druhově specifických primerů BAS1 byla provedena PCR dle postupu v kapitole 4.6.6.2. Pro analýzu byla použita vyizolovaná DNA, u které byla v předchozí analýze ověřena její amplifikovatelnost. Po provedení polymerázové řetězové reakce byla provedena vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM) dle postupu v kapitole 4.6.7 a následně byla provedena gelová elektroforéza dle postupu v kapitole 4.6.8. U takto analyzovaných vzorků byla sledována zejména teplota tání specifických produktů, které vznikly během PCR. Teplota tání specifických produktů byla základním ukazatelem pro posouzení přítomnosti druhové DNA ve vzorku. Součástí analýzy bylo také stanovení citlivosti této metody.

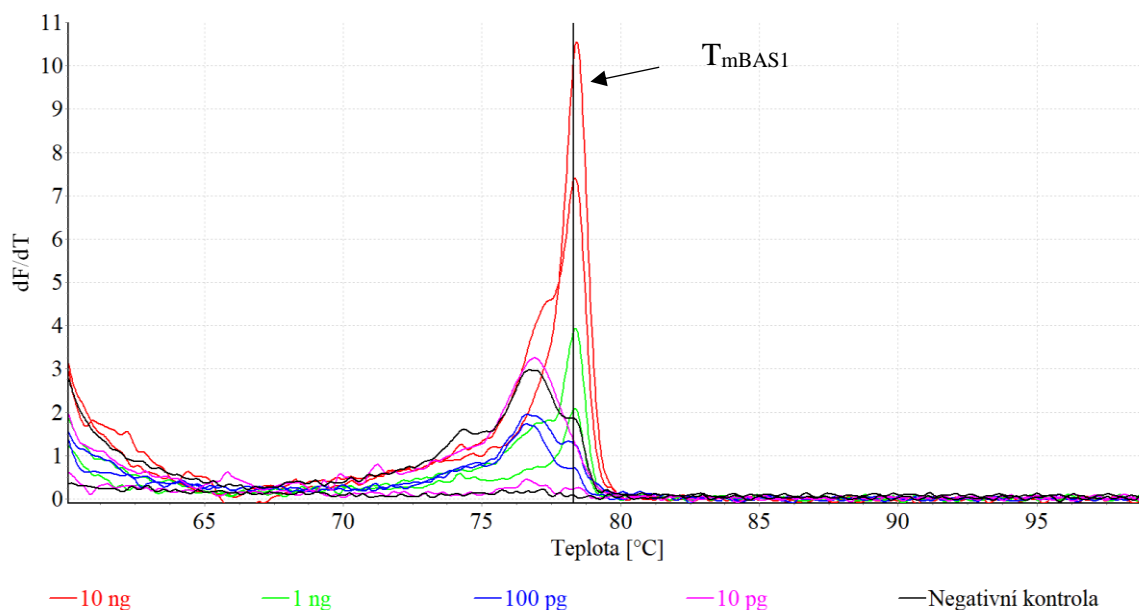
5.1.4.1 Stanovení citlivosti primerů BAS1 při koncentraci 100 nmol · l⁻¹ v reakční směsi

Nejprve bylo provedeno stanovení citlivosti PCR při koncentraci 100 nmol · l⁻¹ druhově specifických primerů BAS1 v reakční směsi. Již z amplifikačních křivek (Obrázek 12) lze pozorovat, že k amplifikaci DNA při této reakci začalo docházet až v pozdní fázi. Nejvíce koncentrovaný vzorek (10 ng · μl⁻¹) se začal amplifikovat až ve 26. cyklu reakce. Ostatní vzorky dokonce později a k amplifikaci téměř nedošlo.



Obrázek 12: Amplifikační křivky, stanovení citlivosti druhově specifických primerů BAS1 při koncentraci $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ v reakční směsi

Dalším krokem byla vysokorozlišovací analýza křivek tání. Tato analýza využívala teplotní krok $0,01 \text{ }^\circ\text{C}$, díky čemuž bylo možné přesně stanovit teplotu tání specifických produktů a odlišit tyto produkty od dimerů či oligomerů vznikajících během reakce v negativní kontrole. Z grafu (Obrázek 13) je zřejmé, že specifický produkt byl tvořen zejména při koncentraci DNA $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, kdy teplota tání produktu byla $78,3 \text{ }^\circ\text{C}$. Specifický produkt s danou teplotou tání tvořil rovněž vzorek s koncentrací DNA $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

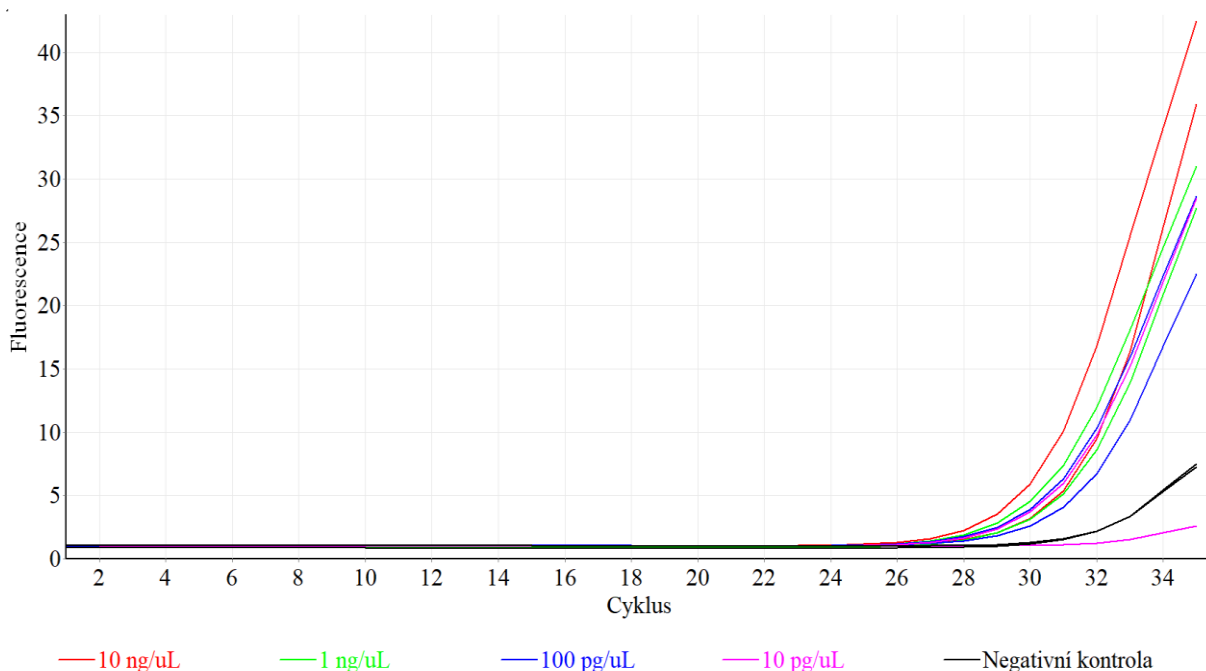


Obrázek 13: Křivky tání, stanovení citlivosti druhově specifický primerů BAS1 při koncentraci $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ v reakční směsi

Vzorky s nižší koncentrací pak tvořily nespecifický produkt s odlišnou teplotou tání podobný negativní kontrole. Závěrem tohoto stanovení tedy bylo, že singleplex PCR s koncentrací primerů BAS1 $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ v reakční směsi má citlivost $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Nižší množství DNA broskve již nejsme schopni ve vzorku stanovit. Součástí příloh je pak fotografie gelu (Obrázek 39), na které lze pozorovat bandy odpovídající specifickým produktům o velikosti 150 bp. Zároveň lze pozorovat bandy odpovídající nespecifickým produktům o velikosti 100 bp. Na fotografii gelu lze pozorovat silnější band pro vzorek o koncentraci $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, velice slabý potom pro koncentraci $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

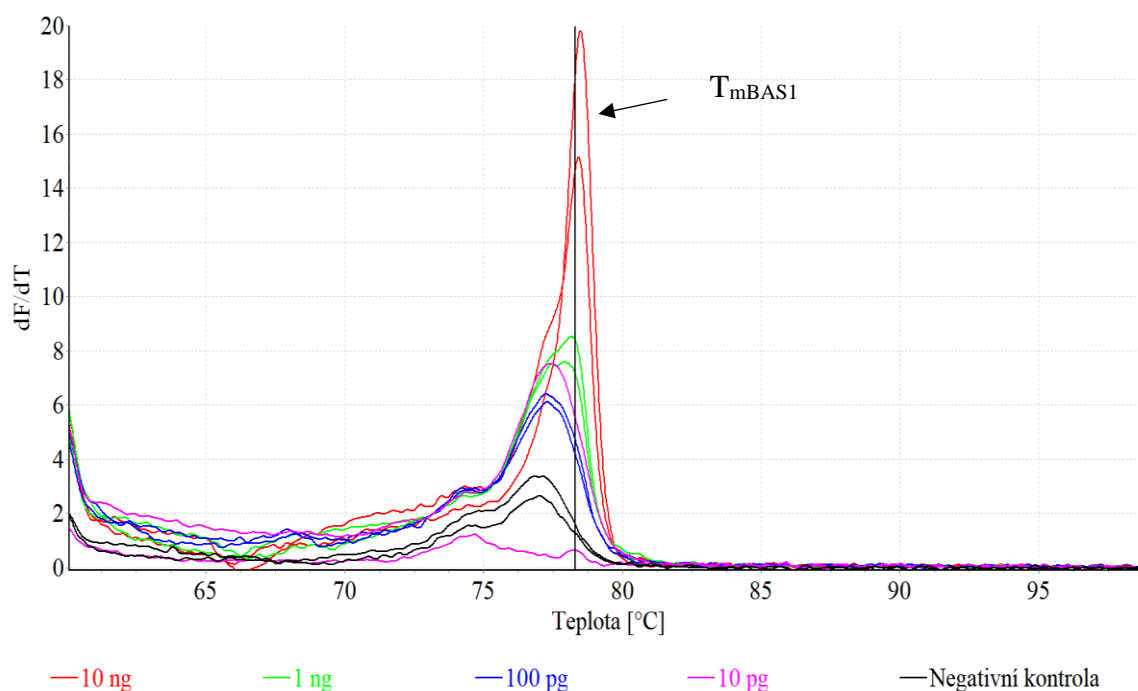
5.1.4.2 Stanovení citlivosti primerů BAS1 při koncentraci $200 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ v reakční směsi

Pro zvýšení citlivosti PCR byla provedena reakce s dvojnásobnou koncentrací specifických primerů, tedy $200 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ v reakční směsi. Jak lze pozorovat v grafu amplifikačních křivek (Obrázek 14), zvýšením koncentrace primerů v reakční směsi došlo k počátku amplifikace dříve než v předchozím případě, a to zejména u nižších koncentrací. Zároveň lze i pozorovat, že odezva fluorescence byla v případě vyšší koncentrace primeru několikanásobně vyšší, než tomu bylo v případě nižší koncentrace primerů.



Obrázek 14: Amplifikační křivky, stanovení citlivosti druhově specifický primerů BAS1 při koncentraci $200 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ v reakční směsi

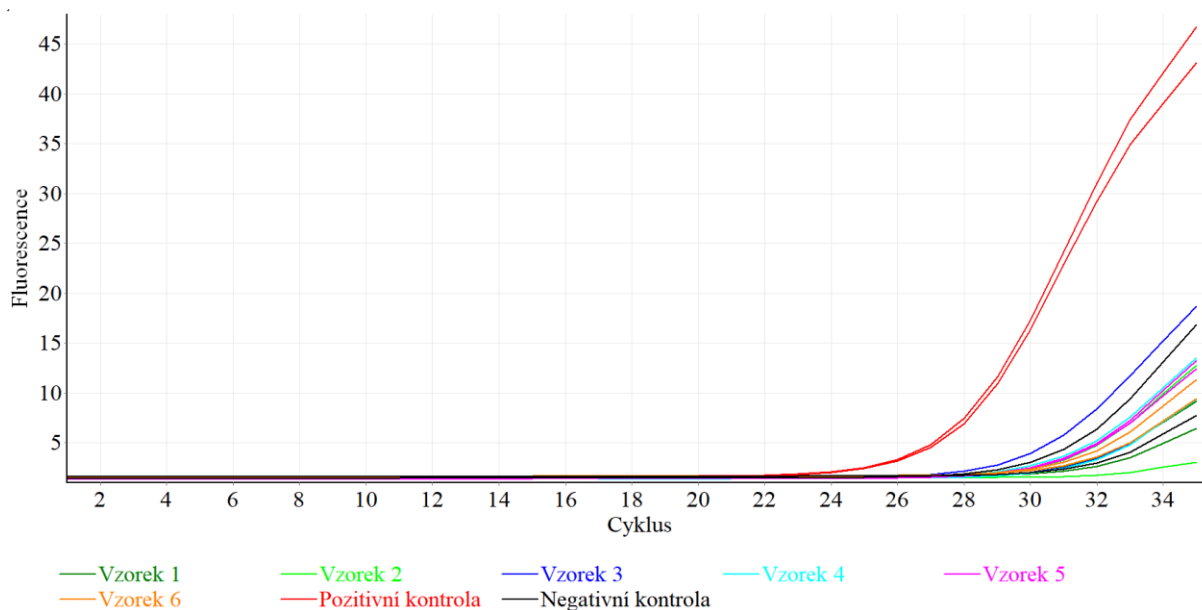
Dalším krokem analýzy byla vysokorozlišovací analýza křivek tání. Lze pozorovat, že stejně jako v případě nižší koncentrace, specifický produkt měl teplotu tání $78,4 \text{ }^\circ\text{C}$. Z grafu (Obrázek 15) lze vyčíst, že specifický produkt s danou teplotou tání vzniká v případě koncentrací $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Po provedení HRM byla provedena ještě gelová elektroforéza. Fotografie gelu (Obrázek 40) je součástí příloh práce.



Obrázek 15: Křivky tání, stanovení citlivosti druhově specifický primerů BAS1 při koncentraci $200 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ v reakční směsi

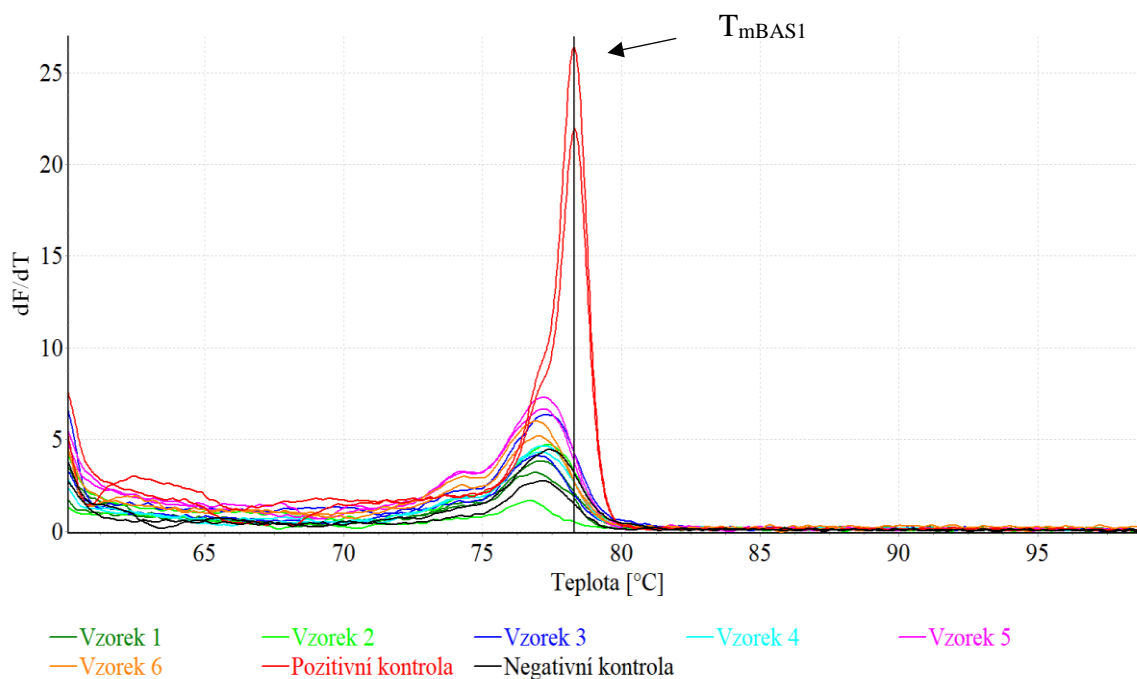
5.1.4.3 Detekce DNA broskve v komerčních vzorcích s využitím specifických primerů BAS1

Po ověření citlivosti dané metody byla provedena analýza reálných vzorků. U těchto vzorků byla provedena PCR dle postupu v kapitole 4.6.6.2. Pro PCR byla využita koncentrace $200 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ specifických primerů v reakční směsi. Amplifikační křivky dané reakce lze pozorovat v grafu níže (Obrázek 16).



Obrázek 16: Amplifikační křivky, detekce DNA broskve v komerčních vzorcích s využitím specifických primerů BAS1

Jako první se začala amplifikovat pozitivní kontrola, kterou byla DNA vyizolovaná z listu broskve, a to při 24. cyklu reakce. Komerční vzorky se potom zdánlivě amplifikovaly až v pozdějších cyklech reakce, stejně tak i negativní kontrola. Po provedení PCR byla dalším krokem HRM. Z grafu analýzy křivek tání (Obrázek 17) lze pozorovat vznik specifického produktu pozitivní kontroly s teplotou tání 78,4 °C.



Obrázek 17: Křivky tání, detekce DNA broskve v komerčních vzorcích s využitím specifických primerů BAS1

Při této analýze však byla pozitivní kontrola jediným vzorkem, který při PCR vytvořil specifický produkt o dané teplotě. Všechny vzorky včetně negativní kontroly v případě této reakce tvořily nespecifické produkty s teplotou tání přibližně 77 °C. Metodou singleplex PCR s využitím druhově specifických primerů BAS1 tak nebyla druhová DNA broskve stanovena ani v jednom z analyzovaných vzorků. To mohlo být způsobeno jednak citlivostí metody, dále pak množstvím vyizolované DNA, její čistotou, ale také složením a povahou jednotlivých vzorků. Součástí analýzy byla také gelová elektroforéza. Na fotografii gelu (Obrázek 41) lze pozorovat bandy o velikosti 50 bp, které náleží nespecifickým produktům a 2 bandy o velikosti 100 bp, které náleží specifickým produktům pozitivní kontroly. Stejně jako při HRM, nebyla při gelové elektroforéze stanovena přítomnost druhově specifické DNA broskve.

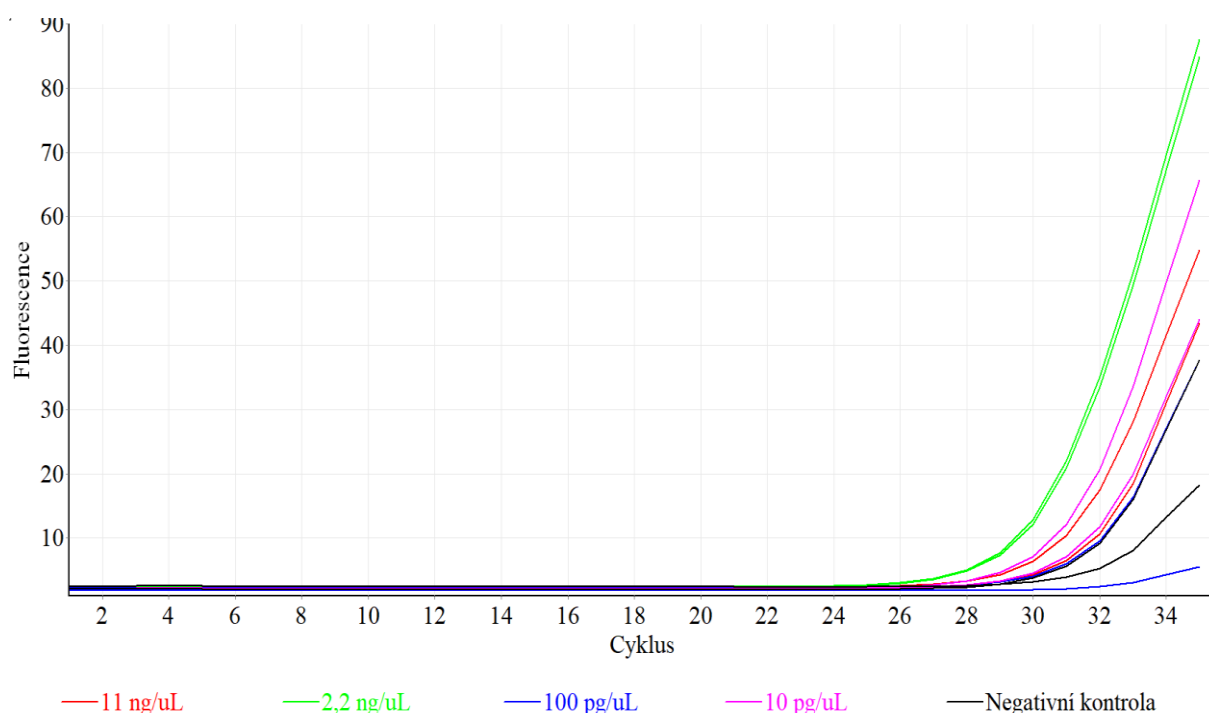
5.1.5 Detekce DNA meruňky pomocí specifických primerů (Pa3LTP) s využitím singleplex PCR

Pro detekci DNA meruňky s využitím druhově specifických primerů Pa3LTP byla provedena PCR dle postupu v kapitole 4.6.6.2. Pro analýzu byla použita vyizolovaná DNA, u které byla v předchozí analýze ověřena její amplifikovatelnost. Po provedení polymerázové řetězové reakce byla provedena vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM) dle postupu v kapitole 4.6.7 a následně byla provedena gelová elektroforéza dle postupu v kapitole 4.6.8. U takto analyzovaných vzorků byla sledována zejména teplota tání specifických produktů, které

vznikly během PCR. Teplota tání specifických produktů byla základním ukazatelem pro posouzení přítomnosti DNA meruňky ve vzorku. Součástí analýzy bylo také stanovení citlivosti této metody.

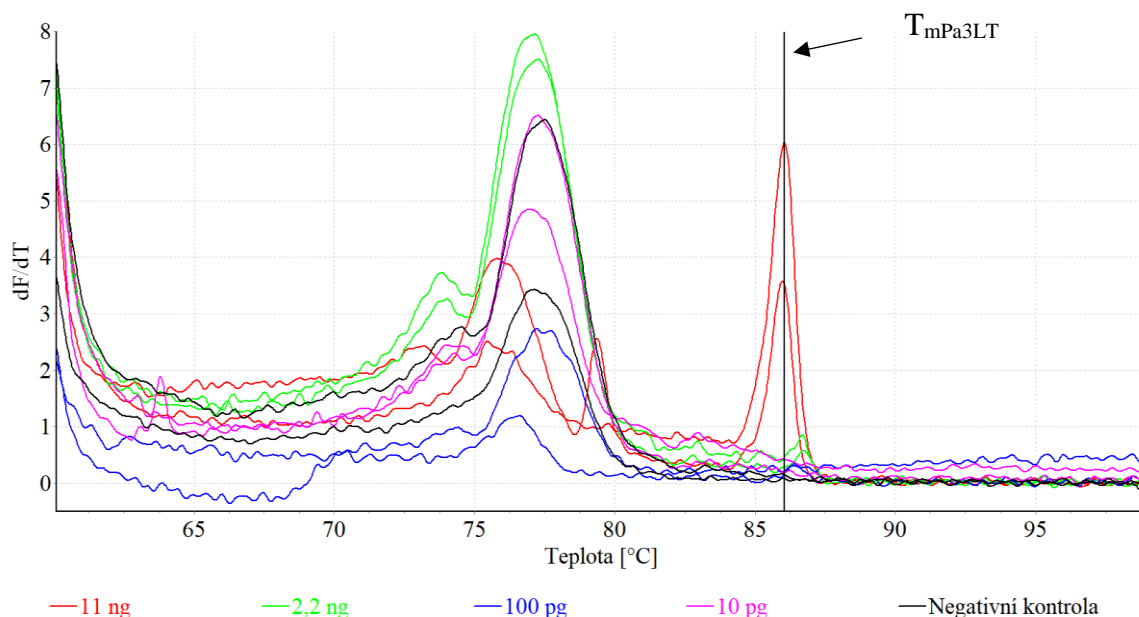
5.1.5.1 Stanovení citlivosti primerů Pa3LTP

Obdobně jako v případě specifických primerů pro broskev BAS1 i v případě specifických primerů pro meruňku Pa3LTP byla nejprve stanovena citlivost reakce. Z grafu amplifikačních křivek (Obrázek 18) lze pozorovat, že nejprve se začal amplifikovat vzorek s koncentrací DNA $2,2 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. U druhově specifických primerů Pa3LTP je zajímavostí, že při amplifikaci se nejvyšší koncentrace neamplifikovala jako první, to je pravděpodobně ovlivněno vznikem nespecifických produktů, které vznikají současně při vzniku specifických produktů. Nespecifické produkty vznikají i v případě nepřítomnosti DNA.



Obrázek 18: Amplifikační křivky, stanovení citlivosti druhově specifických primerů Pa3LTP

Dalším krokem po PCR bylo provedení vysokorozlišovací analýzy křivek tání. Při této analýze byla sledována teplota tání specifického produktu. Teplota tání tohoto produktu byla stanovena na $86,05 \text{ }^\circ\text{C}$. V grafu (Obrázek 19) lze pozorovat tvorbu specifického produktu s teplotou tání $86,05 \text{ }^\circ\text{C}$ v případě vzorku s koncentrací DNA $2,2 \text{ ng}$. Tato teplota je však odlišná od teploty tání specifického produktu v případě vyšší koncentrace. Proto lze usuzovat, že citlivost singleplex PCR s použitím druhově specifických primerů pro meruňku Pa3LTP je 11 ng .

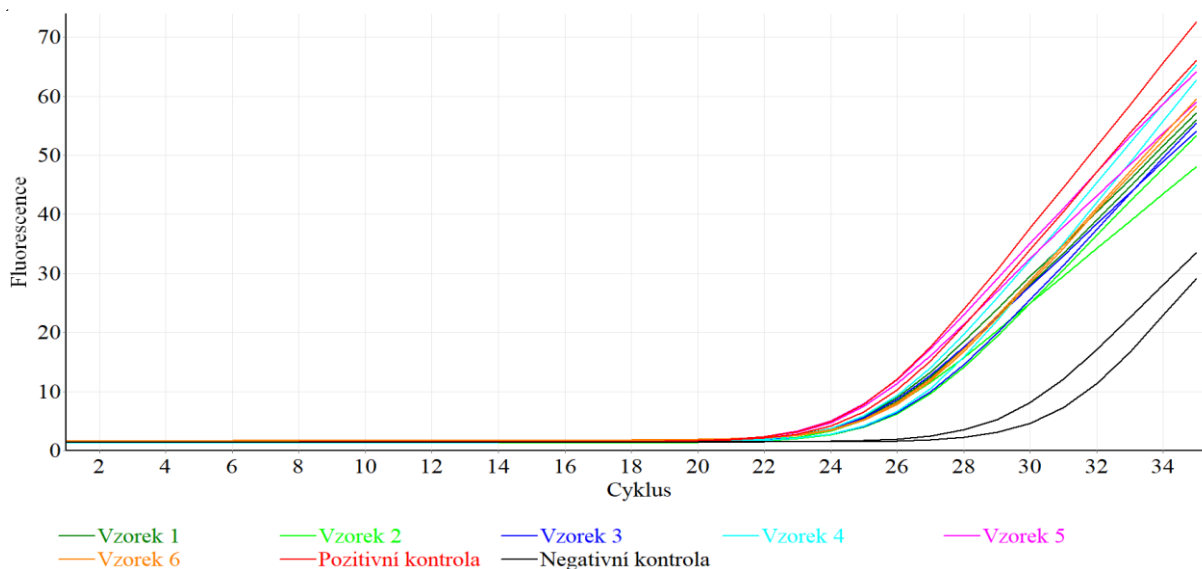


Obrázek 19: Křivky tání, stanovení citlivosti druhově specifických primerů Pa3LTP

Součástí analýzy byla rovněž gelová elektroforéza. Fotografie gelu (Obrázek 42) je součástí příloh této práce. Na fotografii gelu lze pozorovat detekci specifických produktů v případě koncentrace DNA $11 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ o velikosti přibližně 200 bp, u koncentrace DNA $2,2 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ již specifický produkt nebyl detekován. Při gelové elektroforéze byly rovněž detekovány nespecifické produkty, tedy dimery či oligomery o velikosti 100 bp.

5.1.5.2 Detekce DNA meruňky v komerčních vzorcích s využitím specifických primerů Pa3LTP

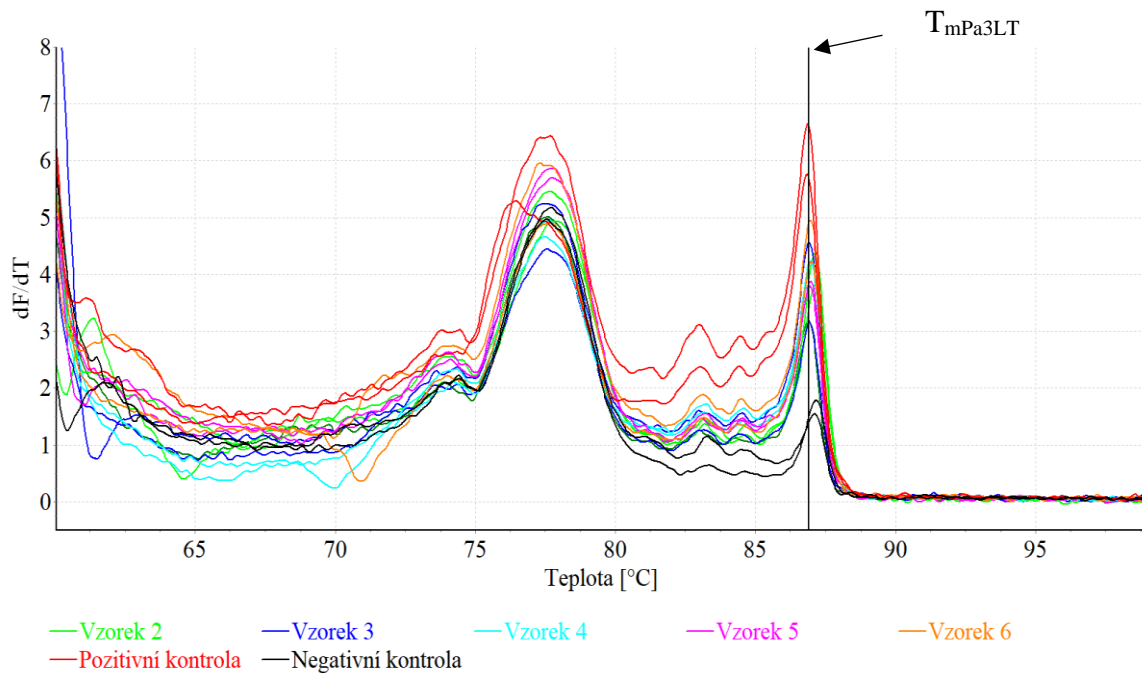
Po ověření citlivost dané metody byla provedena analýza reálných vzorků. U těchto vzorků byla provedena PCR dle postupu v kapitole 4.6.6.2. Amplifikační křivky dané reakce lze pozorovat v grafu níže (Obrázek 20)



Obrázek 20: Amplifikační křivky, detekce DNA meruňky v komerčních vzorcích s využitím specifických primerů Pa3LTP

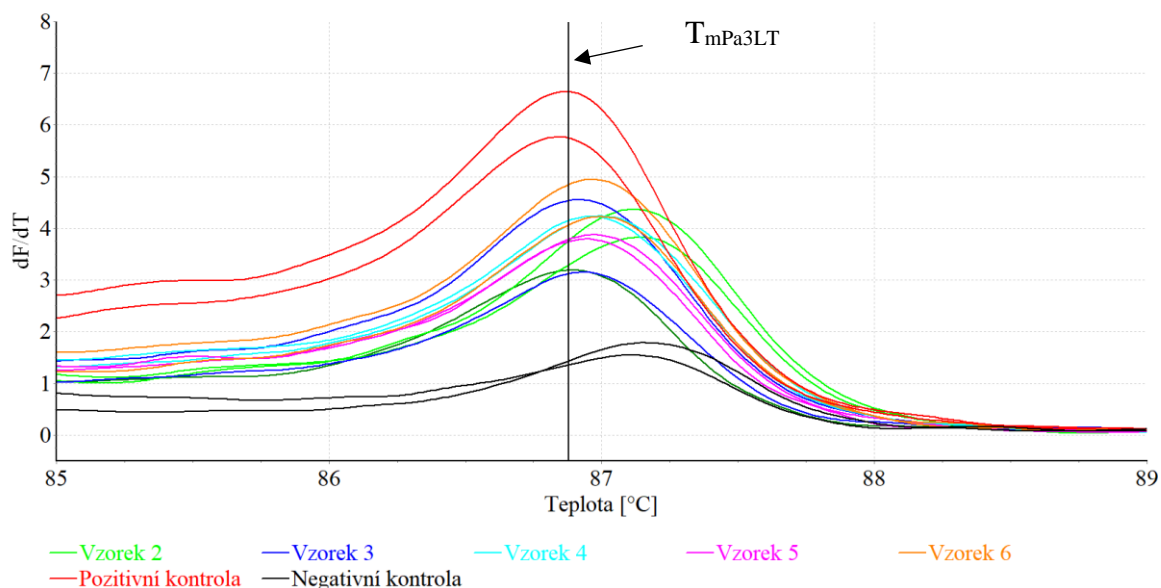
V případě analýzy reálných vzorků došlo k počátku amplifikace všech vzorků včetně pozitivní kontroly během 22. cyklu reakce. Všechny komerční vzorky se amplifikovaly podobně jako pozitivní kontrola, kterou byla DNA izolovaná z listu meruňky, u které byla amplifikovatelnost ověřena již dříve.

U vysokorozlišovací analýzy křivek tání (Obrázek 21) byla opět sledována teplota tání specifického produktu, která byla v tomto případě 86,8 °C.



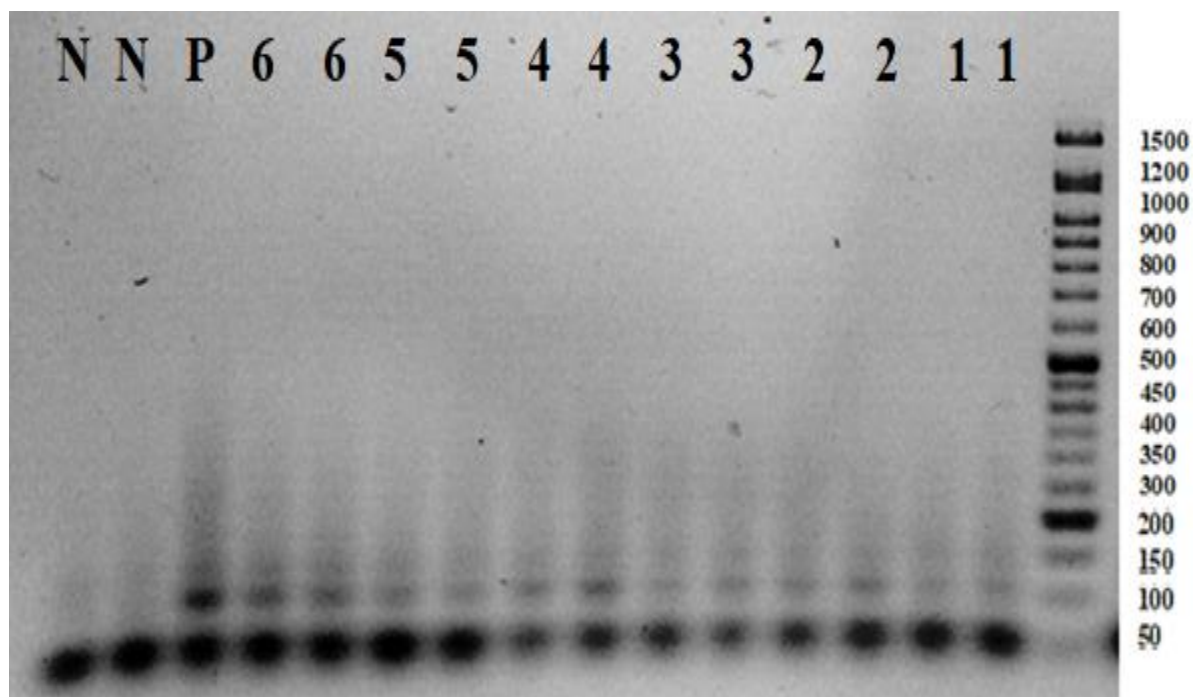
Obrázek 21: Křivky tání, detekce DNA meruňky v komerčních vzorcích s využitím specifických primerů Pa3LTP

Při této teplotě byla stanovena teplota tání specifických produktů pozitivních kontrol, dále pak všech vzorků kromě vzorku 2, kdy teplota tání daného produktu byla 87,2 °C, což odpovídalo teplotě tání nespecifického produktu, který vznikl v negativních kontrolách viz Obrázek 22.



Obrázek 22: Křivky tání, detail, detekce DNA meručky v komerčních vzorcích s využitím specifických primerů Pa3LTP

Součástí analýzy byla také gelová elektroforéza. Pomocí gelové elektroforézy byla ověřena čistota negativních kontrol. V případě negativních kontrol byly detekovány pouze nespecifické produkty o velikosti 50 bp. V případě všech vzorků, včetně vzorku 2, u kterého dle HRM nebyla DNA meručky detekována, byla pomocí gelové elektroforézy ověřena přítomnost druhové DNA meručky. Jelikož HRM je však více specifickou metodou, jednalo se v tomto případě o detekci nespecifického produktu. Na fotografii elektroforetického gelu (Obrázek 23) lze pak pozorovat bandy detekovaných specifických produktů o velikosti 100 bp.



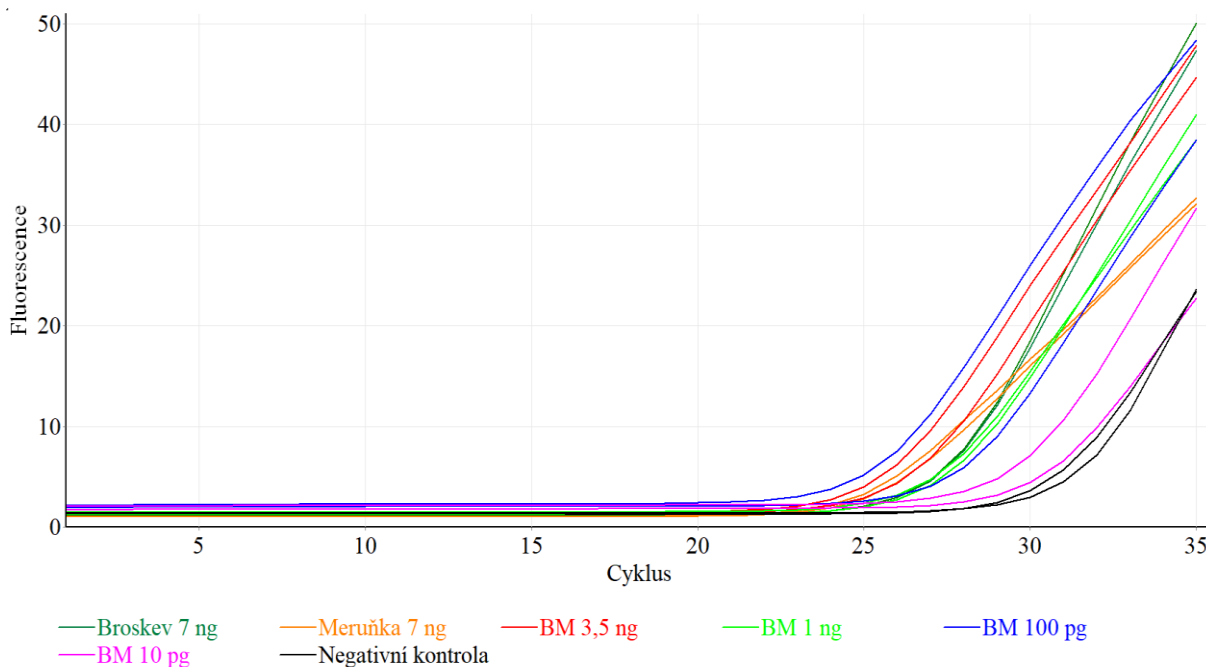
Obrázek 23: Elektroforetický gel, detekce DNA meručky v komerčních vzorcích s využitím specifických primerů Pa3LTP (N – negativní kontrola, P – pozitivní kontrola, 1-6 – vzorky)

5.1.6 Simultánní detekce DNA broskve a meruňky pomocí specifických primerů (BAS1, Pa3LTP) s využitím duplex PCR

Hlavním cílem diplomové práce bylo provedení simultánní detekce dvou ovocných druhů pomocí duplex PCR s využitím druhově specifických primerů BAS1 a Pa3LTP. Prvním krokem analýzy bylo provedení samotné polymerázové řetězové reakce, ta byla provedena dle postupu v kapitole 4.6.6.3. Součástí provedení této analýzy bylo stanovení citlivosti a specifity této metody. Po provedení PCR byla vždy provedena vysokorozlišovací analýza křivek tání dle postupu v kapitole 4.6.7 a dále pak gelová elektroforéza dle postupu v kapitole 4.6.8. U analyzovaných vzorků byla sledována teplota tání specifických produktů, které vznikly během PCR. Tato teplota sloužila při vyhodnocování jako základní ukazatel přítomnosti druhově specifické DNA.

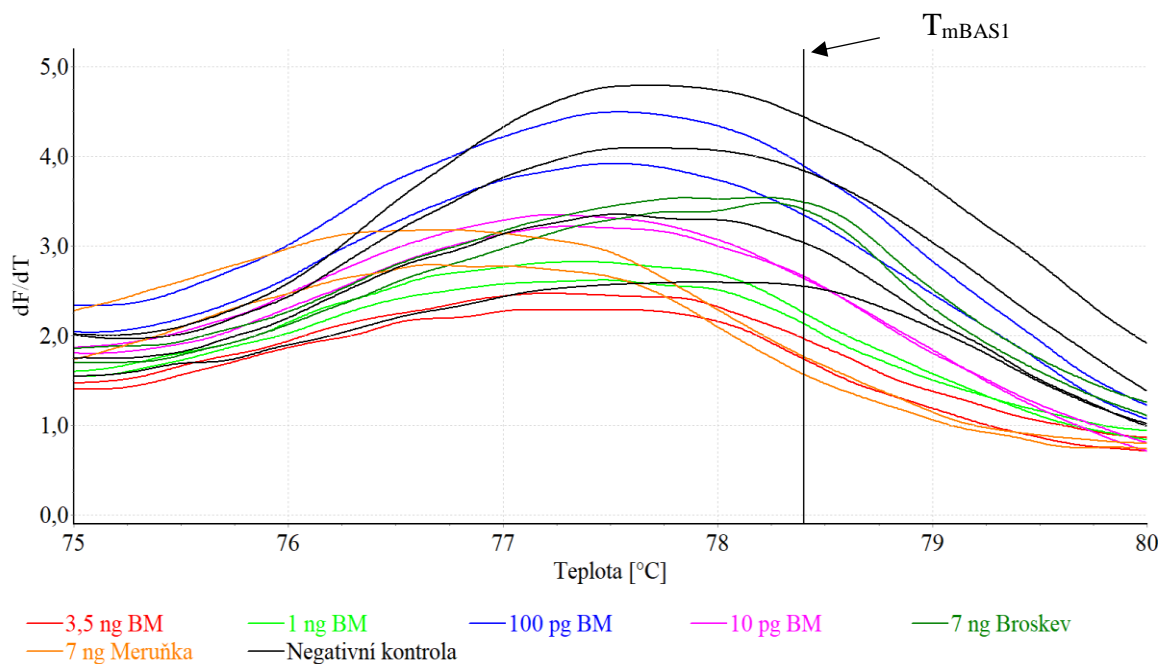
5.1.6.1 Stanovení citlivosti specifických primerů (BAS1, Pa3LTP) pro duplex PCR

Pro duplex PCR byla nejprve stanovena citlivost dané reakce. Při duplex PCR bylo postupováno dle postupu v kapitole 4.6.6.4. V grafu (Obrázek 24) lze pozorovat amplifikační křivky pro jednotlivé koncentrace DNA. Jako referenční vzorky (částečně pozitivní kontroly) byly využity vzorky o koncentraci DNA $7 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ obsahující pouze DNA z broskve, nebo meruňky. Dále pak byla vytvořena koncentrační řada pro stanovení citlivosti metody, kdy nejvyšší koncentrace byla $3,5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a nejnižší pak $10 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Koncentrační řada byla připravena tak, aby v reakční směsi pro duplex PCR byla jak DNA z broskve, tak DNA z meruňky. Z grafu amplifikačních křivek lze pozorovat, že se postupně od 22. cyklu reakce zdánlivě začaly amplifikovat všechny vzorky obsahující DNA.

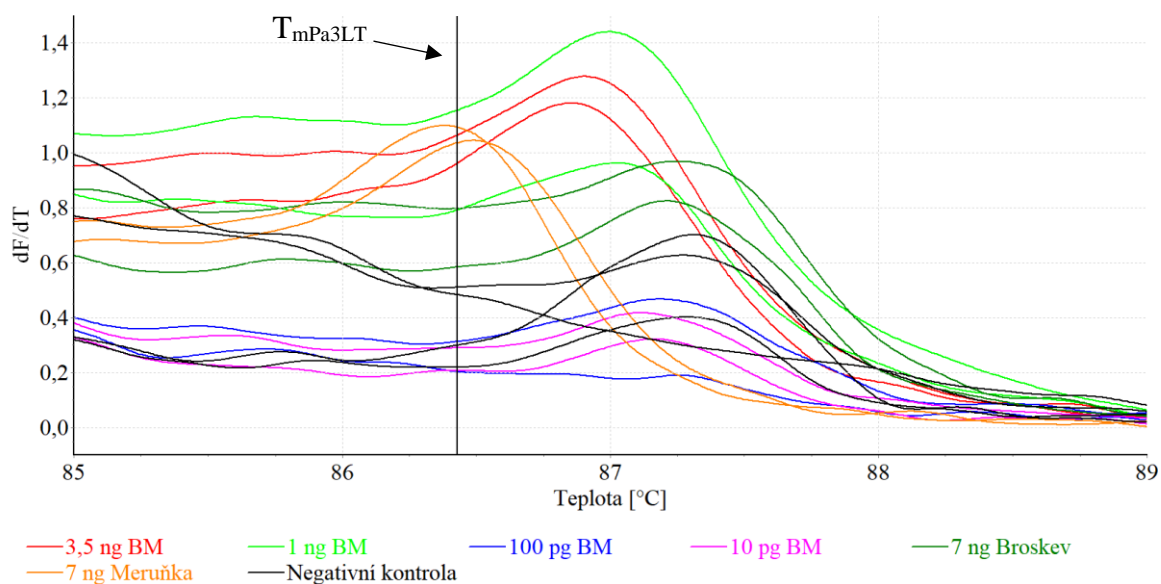


Obrázek 24: Amplifikační křivky, stanovení citlivosti specifických primerů (BAS1, Pa3LTP) pro duplex PCR

Pomocí HRM byly stanoveny teploty tání specifických produktů jak pro primery BAS1 specifické pro broskev, tak pro primery Pa3LTP specifické pro meruňku. Teplota tání specifického produktu pro primery BAS1 byla stanovena na 78,4 °C, pro primery Pa3LTP pak na 86,43 °C. Obě tyto teploty jsou znázorněny na obrázcích níže (Obrázek 25, Obrázek 26).

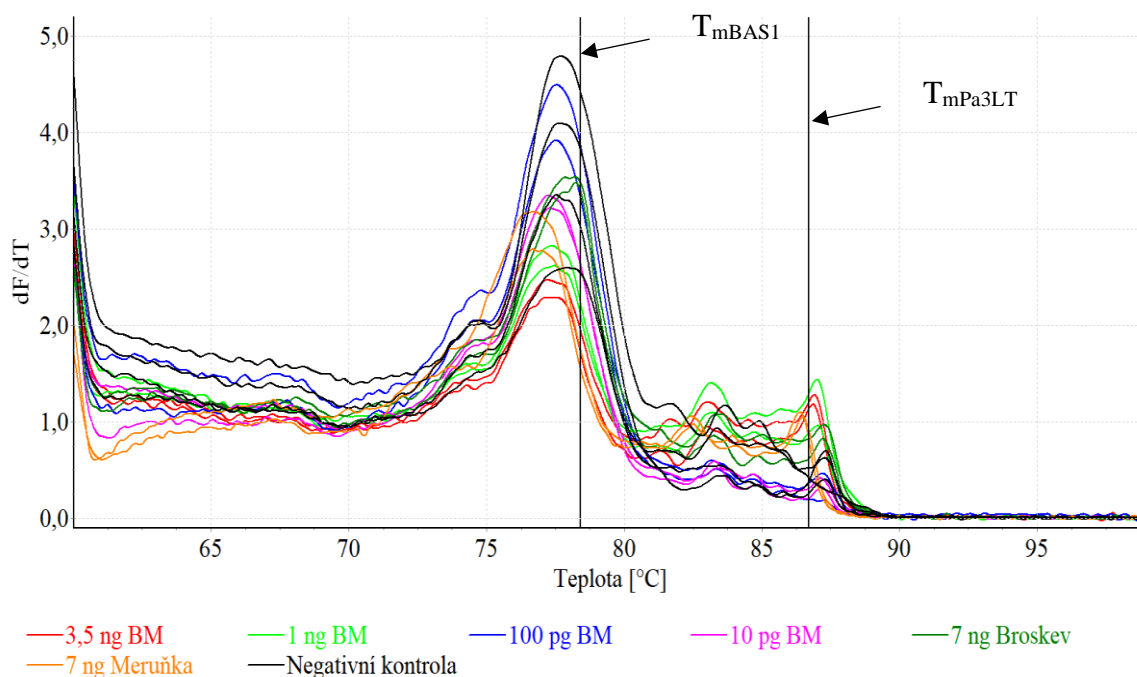


Obrázek 25: Křivky tání, detail stanovení citlivosti specifických primerů (BAS1, Pa3LTP) pro duplex PCR – teplota tání specifického produktu pro primery BAS1



Obrázek 26: Křivky tání, detail, stanovení citlivosti specifických primerů (BAS1, Pa3LTP) pro duplex PCR – teplota tání specifického produktu pro primery Pa3LTP

Jednotlivé křivky tání jak pro vzorky obsahující pouze jeden druh DNA, tak pro koncentrační řadu obsahující oba druhy DNA lze pozorovat v grafu níže (Obrázek 27).



Obrázek 27: Křivky tání, stanovení citlivosti specifických primerů (BAS1, Pa3LTP) pro duplex PCR

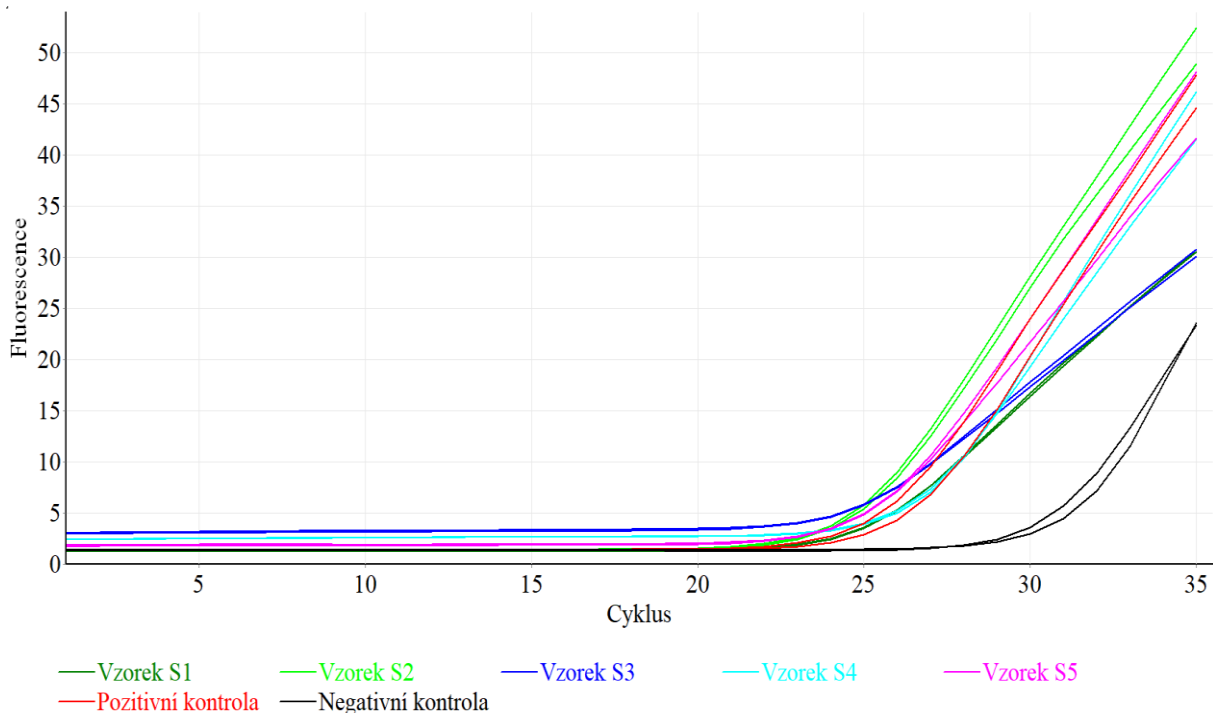
Z grafu lze pozorovat že u vzorků obsahujících 7 ng jednodruhové DNA byl detekován specifický produkt s danou teplotou tání. V případě koncentrační řady však vzniklé produkty měly teplotu tání vyšší či nižší, než by měla být teplota tání specifických produktů daných primerů. Lze tedy stanovit, že v případě přítomnosti obou specifických primerů (BAS1, Pa3LTP) a pouze jedné ze dvou druhů DNA, je možné tuto DNA stanovit již při množství 7 ng. V případě, kdy jsou však v reakční směsi oba druhy specifických primerů a oba druhy stanovovaných DNA v nižší koncentraci, nejsme schopni tuto DNA správně pomocí této metody stanovit, jelikož vznikají jiné než specifické produkty pro dané primery, které mají odlišnou teplotu tání. Výsledkem tohoto stanovení tedy je, že lze očekávat, že citlivost duplex PCR pro simultánní stanovení broskve a meruňky pomocí druhově specifických primerů bude o řád nižší, než je tomu v případě singleplex PCR. Specifické produkty byly v tomto případě detekovány pouze metodou HRM, gelovou elektroforézou nikoli. Z výsledků gelové elektroforézy (Obrázek 43) nelze jednoznačně určit, zda specifické produkty vznikají či nikoli. Na fotografii gelu nelze pozorovat 2 bandy, které by mělo být možné v případě duplex PCR na fotografii detekovat.

5.1.6.2 Stanovení specifity primerů (BAS1, Pa3LTP) pro duplex PCR

Stanovení specifity primerů sloužilo k ověření, zda je daná metoda dostatečně specifická pro detekci analyzovaných druhů ovoce. Při tomto stanovení bylo postupováno stejně jako při analýze komerčních vzorků, konkrétně dle postupu v kapitole 4.6.6.5. Součástí analýzy byla rovněž HRM a gelová elektroforéza. Pro stanovení specifity bylo využito celkem 5 vzorků, kdy ani jeden z těchto vzorků neobsahoval broskve nebo meruňku ve svém složení. Vzorky použité pro stanovení specifity primerů jsou uvedeny v kapitole 4.5.1. Pro stanovení specifity byly

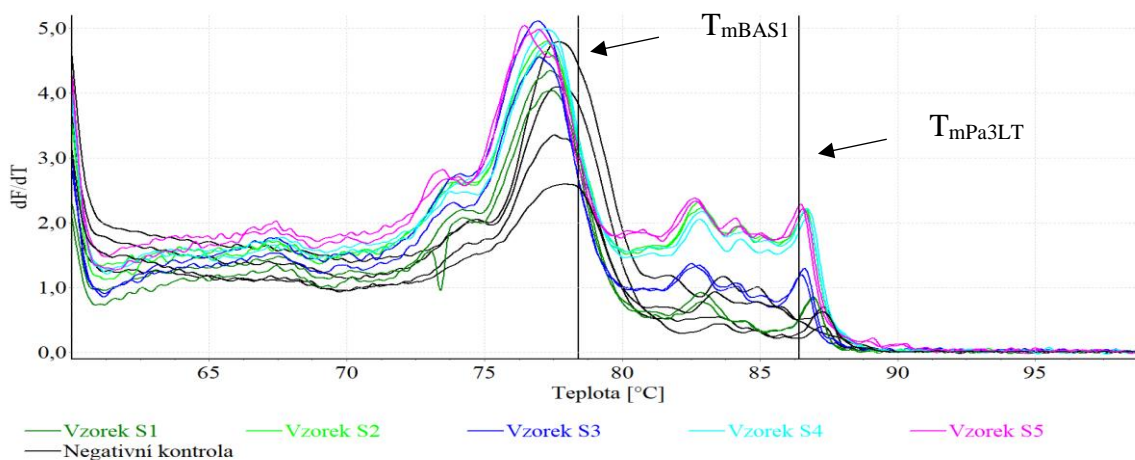
použity jak vzorky jiného složení, tak vzorky různé povahy. Jelikož se jednalo o vzorky neobsahující ani broskev ani meruňku ve svém složení, předpokládaným výsledkem bylo tvorba buď žádných nebo nespecifických produktů, tedy produktů o jiné teplotě tání, než je teplota tání specifických produktů druhově specifických primerů pro broskev a meruňku.

Nejprve byla tedy provedena PCR jejíž výsledkem byl graf amplifikačních křivek (Obrázek 28). Z grafu lze pozorovat, že k amplifikaci DNA začalo docházet ve 22. cyklu reakce.



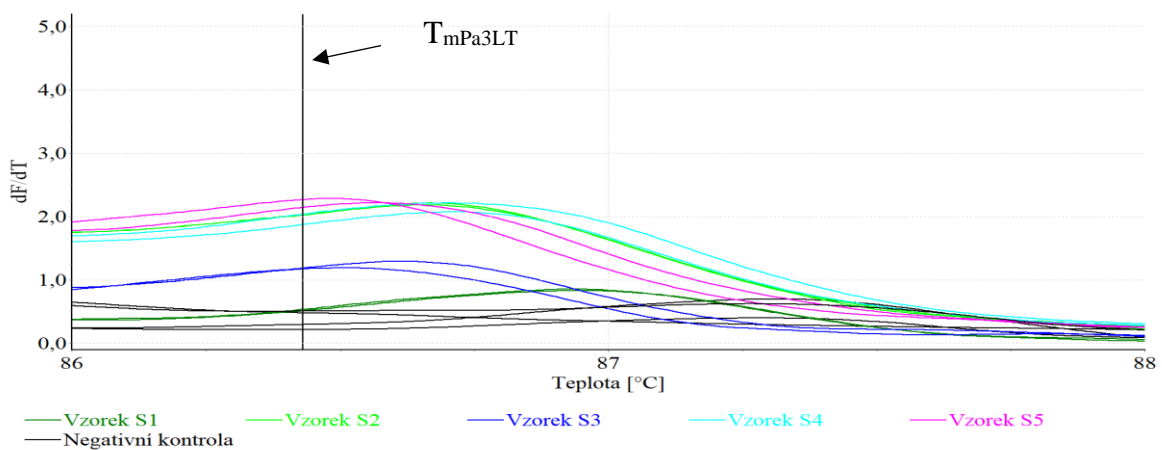
Obrázek 28: Amplifikační křivky, stanovení specifity primerů (BAS1, Pa3LTP) pro duplex PCR

Následně byla provedena HRM, u které byly opět sledovány zejména teploty tání specifických produktů. Ty byly stejné jako v případě stanovení citlivosti duplex PCR. Teplota tání specifického produktu pro primery BAS1 byla stanovena na 78,4 °C, pro primery Pa3LTP pak na 86,43 °C.



Obrázek 29: Křivky tání, stanovení specifity primerů (BAS1, Pa3LTP) pro duplex PCR

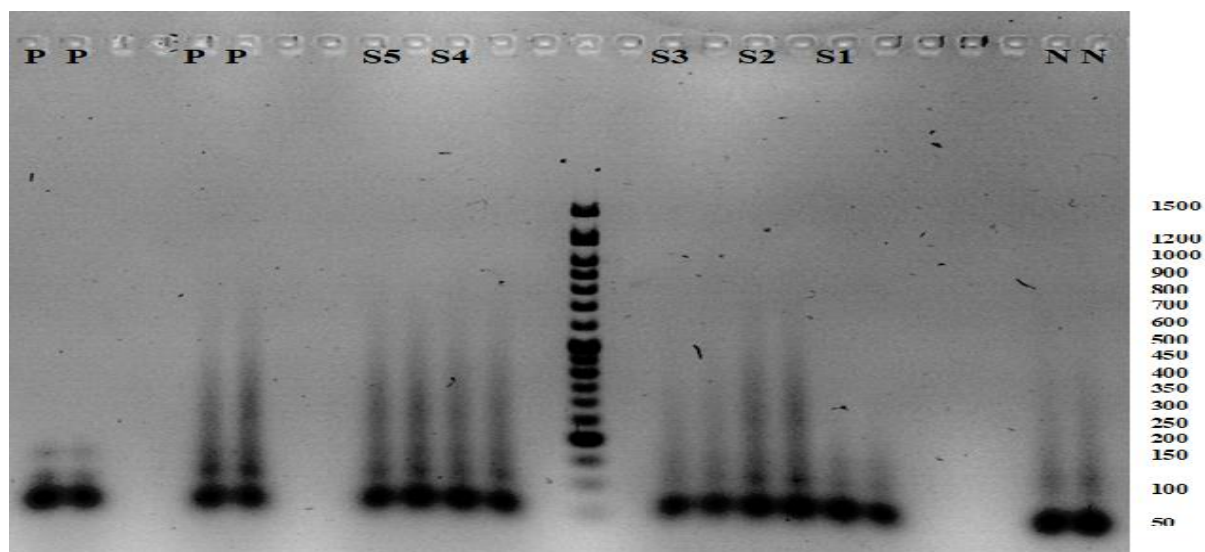
Jak lze pozorovat z grafu (Obrázek 29), ani u jednoho vzorku nebyla stanovena DNA broskve. U velké části analyzovaných vzorků však byla na první pohled stanovena DNA meruňky, přestože by se v daných vzorcích správně tento ovocný druh vůbec neměl nacházet. To mohlo být způsobeno kontaminací, jelikož však produkt negativních kontrol nevykazuje stejnou teplotu tání, tuto možnost lze vyloučit. Další možností by mohla být přítomnost DNA meruňky v daných vzorcích. Poslední možností by mohla být nedostatečná specifita navržených primerů. Řešením by v tomto případě mohlo být navržení více specifických primerů. Dalším důvodem pro tento výsledek by mohla být právě již zmíněná teplota tání, kdy teplota tání specifických produktů je velice blízká teplotě tání nespecifických produktů a mohlo by tak dojít k vytvoření milného závěru z důvodu blízkých teplot tání, které mohou být ovlivněny různými faktory jako je koncentrace DNA, koncentrace primerů, čistota PCR komponent, složení a povaha jednotlivých vzorků atd. Po přiblížení křivek tání v dané oblasti (Obrázek 30) pak můžeme pozorovat, že přestože tvoří jednotlivé vzorky produkty teplotou tání blízkí se teplotě tání specifických produktů primerů Pa3LTP, z obrázku vyplývá, že při analýze vznikly produkty s mírně odlišnou teplotou tání a dalo by se tedy vyvodit závěr, že ani DNA meruňky nebyla v těchto vzorcích stanovena. Nejbliže byl svou teplotou tání této teplotě vzorek S5.



Obrázek 30: Křivky tání, detail, stanovení specifity duplex PCR s využitím druhově specifických primerů (BAS1 a Pa3LTP) pro broskev a meruňku

Součástí analýzy však byla i gelová elektroforéza. Na fotografii gelu (Obrázek 31) lze v případě této analýzy pozorovat, že u vzorků S1 a S3 nebyl detekován žádný specifický produkt, jako je tomu u vzorků S2, S4 a S5 a pozitivních kontrol. V tomto případě však došlo k detekci nespecifických produktů, které měly podobnou velikost jako specifický produkt. Z tohoto výsledku by se tedy dal udělat závěr, že navržené primery jsou dostatečně specifické a nereagují na vzorky, které neobsahují broskev nebo meruňku ve svém složení a zároveň by se dalo usuzovat, že vzorky S2, S4 a S5 mohly být částečně kontaminovány při přípravě DNA z jiného druhu, nebo došlo k tomu, že přestože nebyly analyzované ovocné druhy ve složení vzorku uvedeny, byly tyto ovocné druhy součástí výrobku. Pro tento závěr by bylo potřeba stanovení specifity zopakovat s větším a různorodějším množstvím vzorků, ze kterého by se dalo statisticky určit, zda jsou navržené primery dostatečně specifické. Z HRM, která je však

dostatečně citlivou metodou lze říci, že se jedná o specifické primery, které netvoří specifický produkt s danou teplotou v případě nepřítomnosti druhově specifické DNA pro daný druh.

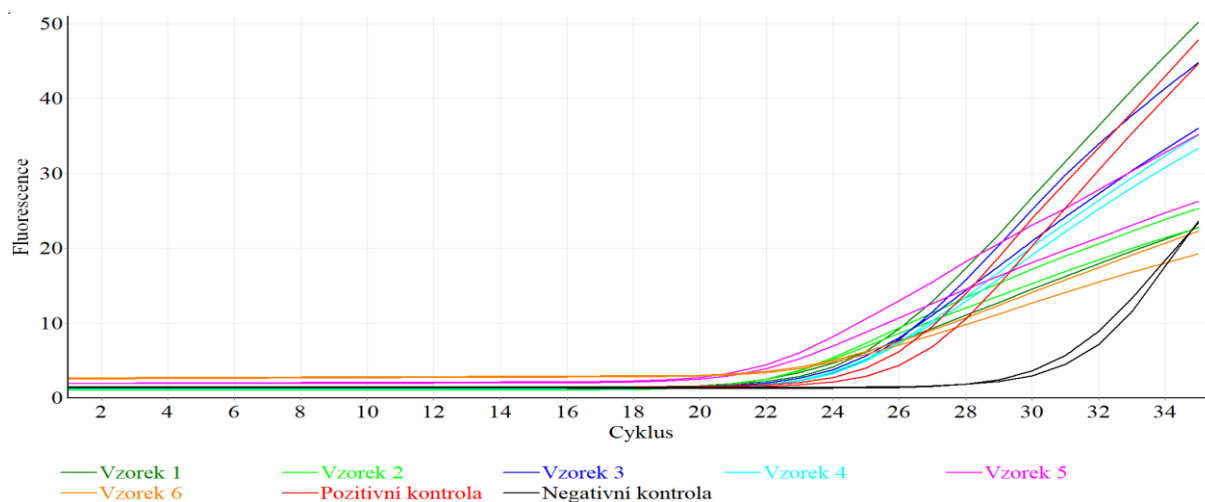


Obrázek 31: Elektroforetický gel, stanovení specifity primerů (*BAS1*, *Pa3LTP*) pro duplex PCR (*P* – pozitivní kontrola, *S1-S5* vzorky použité pro stanovení specifity, *N* – negativní kontrola)

5.1.6.3 Simultánní detekce DNA broskve a meruňky v komerčních vzorcích s využitím specifických primerů (*Bas1*, *Pa3LTP*) pomocí duplex PCR

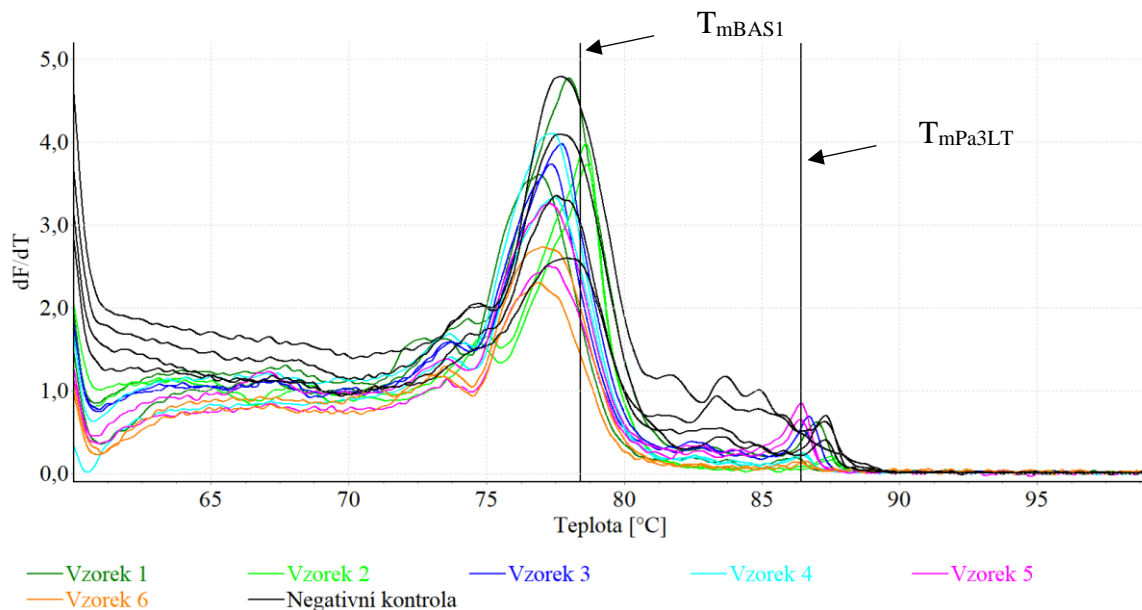
Hlavním cílem práce byla simultánní detekce dvou ovocných druhů (broskve a meruňky) ve vzorku současně. K tomuto stanovení byly použity druhově specifické primery *BAS1* pro broskvev a *Pa3LTP* pro meruňku. V rámci simultánní detekce byla provedena nejprve PCR dle postupu v kapitole 4.6.6.3. Po provedení PCR byly výsledné produkty podrobeny HRM analýze dle postupu v kapitole 4.6.7 a následně byla provedena gelová elektroforéza dle postupu v kapitole 4.6.8.

Nejprve byla tedy provedena PCR, kdy došlo k amplifikaci DNA jednotlivých vzorků. K amplifikaci začalo docházet u většiny vzorků během 22. cyklu reakce. Amplifikační křivky jsou uvedeny na obrázku (Obrázek 32).



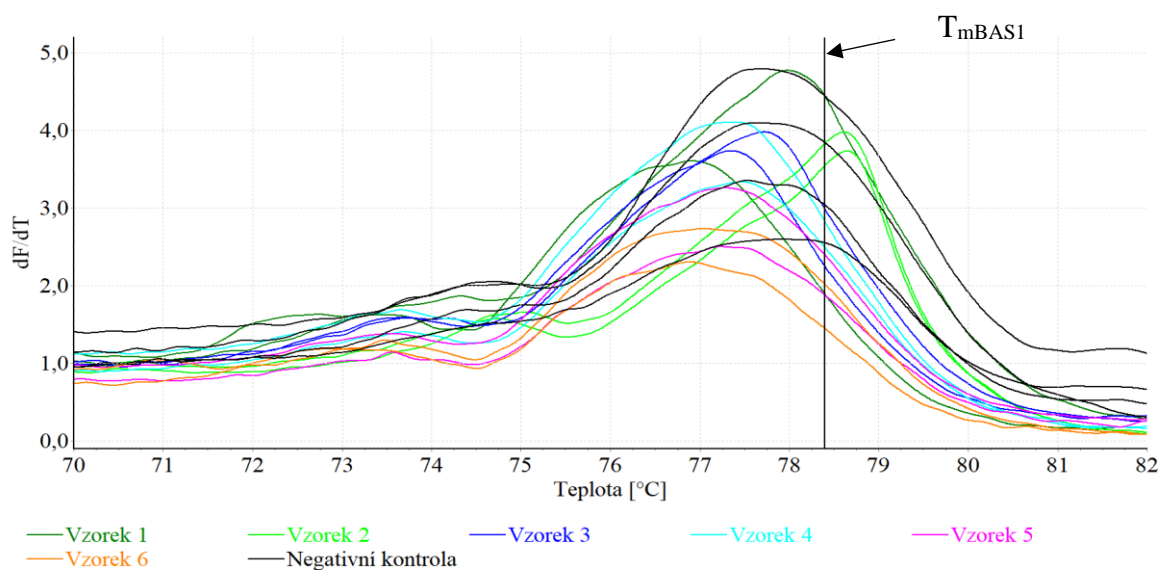
Obrázek 32: Amplifikační křivky, simultánní detekce DNA broskve a meruňky v komerčních vzorcích s využitím specifických primerů (*Bas1*, *Pa3LTP*) pomocí duplex PCR

Po provedení PCR byla provedena vysokorozlišovací analýza křivek tání. Při této analýze byla sledována teplota tání vzniklých PCR produktů. Teplota tání specifického produktu pro primery BAS1 byla stanovena na 78,4 °C, pro primery Pa3LTP pak na 86,43 °C.

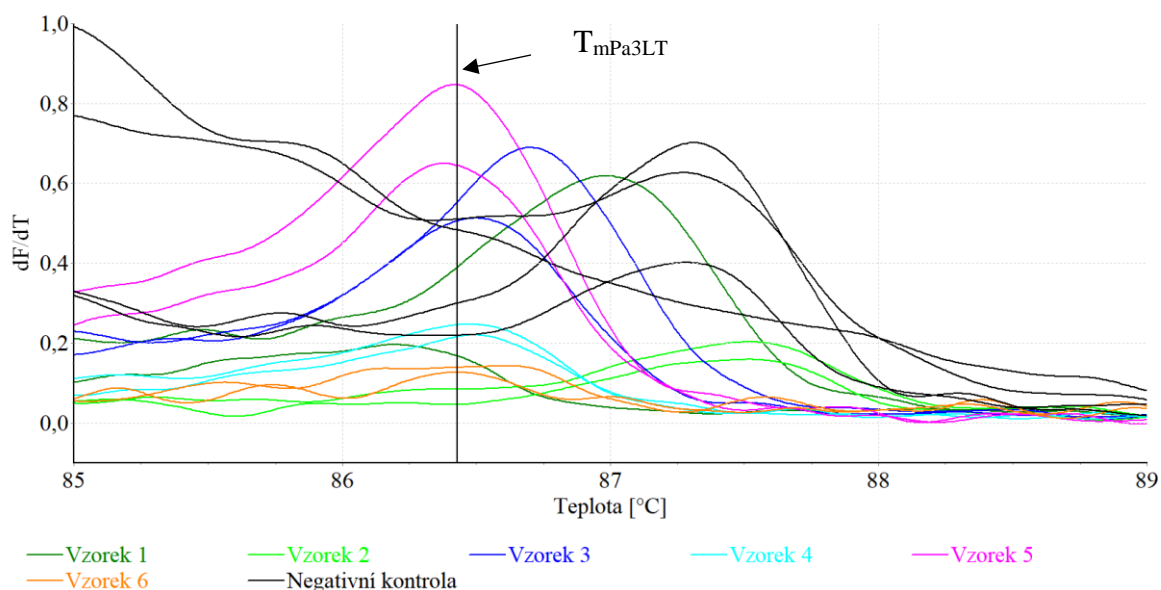


Obrázek 33: Křivky tání, simultánní detekce DNA broskve a meruňky v komerčních vzorcích s využitím specifických primerů (*Bas1*, *Pa3LTP*) pomocí duplex PCR

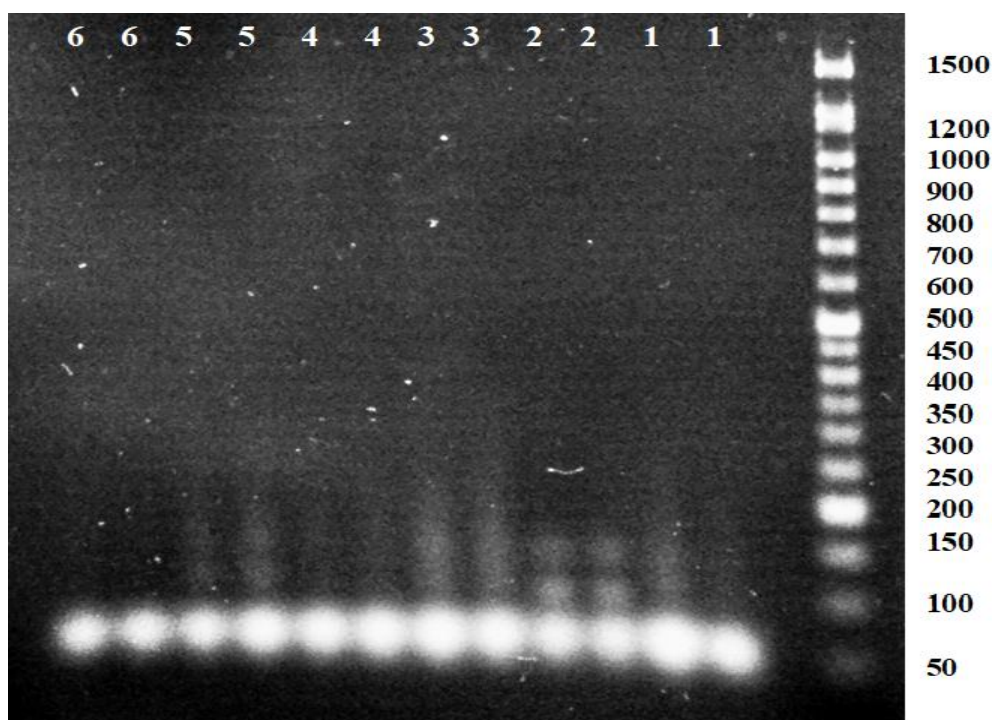
Jak je možné sledovat na obrázku (Obrázek 33), DNA broskve byla stanovena pouze ve vzorku 2. U ostatních vzorků měly vzniklé PCR produkty nižší teplotu tání, než byla teplota tání specifického produktu. DNA meruňky byla metodou duplex PCR stanovena pouze ve vzorku 5. Ve vzorku 3 pak byla teplota tání velice blízká teplotě tání specifického produktu, DNA meruňky však v ostatních vzorcích nebyla pomocí HRM detekována. Detail oblasti teplot tání specifických produktů jsou zobrazeny na obrázcích níže (Obrázek 34, Obrázek 35).



Obrázek 34: Křivky tání, detail, simultánní detekce DNA broskve a meruňky v komerčních vzorcích s využitím specifických primerů (*Bas1*, *Pa3LTP*) pomocí duplex PCR



Obrázek 35: Křivky tání, detail, simultánní detekce DNA broskve a meruňky v komerčních vzorcích s využitím specifických primerů (*Bas1*, *Pa3LTP*) pomocí duplex PCR



Obrázek 36: Elektroforetický gel, simultánní detekce DNA broskve a meruňky v komerčních vzorcích s využitím specifických primerů (*Bas1*, *Pa3LTP*) pomocí duplex PCR (1-6 – vzorky)

Součástí analýzy byla i gelová elektroforéza, výsledný gel lze pozorovat na obrázku (Obrázek 36). Na fotografii gelu lze pozorovat detekované nespecifické produkty o velikosti 50 bp u všech vzorků. U vzorku 6, 3 a jednoho z duplikátů vzorku 1 nebyla ani pomocí gelové elektroforézy detekována žádná ze sledovaných DNA. O vzorku 2 můžeme pozorovat na gelu vznikající 2 bandy. V tomto případě byla detekována pouze DNA broskve a lze tak usuzovat, že druhý band by patřil nespecifickému produktu primerů *Pa3LTP*. V případě vzorku 5 byla

zase pomocí HRM detekována pouze DNA meruňky, tak tomu bylo i u gelové elektroforézy, jelikož lze pozorovat rozdílný tvar na fotografii gelu ve srovnání se vzorkem 2. Přesto však i v tomto případě lze detekovat fragmenty o velikosti 100-150 bp. V případě ostatních vzorků by pak zdánlivě bylo možné detekovat pomocí gelové elektroforézy fragmenty o velikosti 100-150 bp, které odpovídají velikosti fragmentů specifických produktů. Po srovnání s výsledky HRM však lze vyvodit závěr, že se jedná o detekci nespecifických produktů. Zároveň lze pozorovat u těchto vzorků rozdíl ve srovnání se vzorkem 2 a 5, kdy u těchto vzorků lze pozorovat bandy alespoň trochu oddělené, zatímco u ostatních vzorků jsou spíše spojené v jednu šmouhu na gelu.

Z těchto výsledků lze vyvodit závěr, že u multiplex PCR je vhodnější pro analýzu ampliconů používat metodu HRM, která dokáže přesně stanovit teplotu tání specifického produktu a po srovnání teploty tání specifického produktu s analyzovanými vzorky lze určit, zda se DNA v analyzovaném vzorku vyskytuje nebo ne. Z důvodu vzniku specifických i nespecifických produktů o podobné velikosti, ale odlišné teplotě tání je vhodnější využívat metodu HRM namísto gelové elektroforézy.

5.1.7 Srovnání singleplex a duplex PCR pro simultánní detekci broskve a meruňky

Cílem diplomové práce byla optimalizace molekulárních metod na bázi multiplex PCR k simultánní detekci ovocných druhů v potravinách a zároveň sledování vlivu různých typů potravinové matrice na výsledek stanovení autenticity potravin s ovocnou složkou pomocí molekulárních a instrumentálních technik. V rámci práce byla zároveň porovnána metoda singleplex a duplex PCR pro stanovení vybraných ovocných druhů v potravinách. Srovnání těchto dvou metod je uvedeno v tabulce (Tabulka 16).

Tabulka 16: Srovnání metod singleplex a duplex PCR pro detekci DNA ovocných druhů v potravinách

	Vzorek	Singleplex PCR	Duplex PCR
Důkaz DNA broskve	1	NE	NE
	2	NE	ANO
	3	NE	NE
	4	NE	NE
	5	NE	NE
	6	NE	NE
Důkaz DNA meruňky	1	ANO	NE
	2	NE	NE
	3	ANO	NE
	4	ANO	NE
	5	ANO	ANO
	6	ANO	NE
Citlivost – detekce DNA broskve		1 ng · μl ⁻¹	> 3,5 ng · μl ⁻¹
Citlivost – detekce DNA meruňky		11 ng · μl ⁻¹	> 3,5 ng · μl ⁻¹
T_m Pa3LTP		86,89 °C	86,43 °C
T_m BAS1		78,40 °C	78,40 °C

Základní vlastností, která byla po celou dobu analýzy sledována byla teplota tání vzniklých PCR produktů. Teplota tání specifického produktu pro primery BAS1 byla stanovena na 78,4 °C jak pro singleplex PCR, tak pro duplex PCR. Pro primery Pa3LTP však byla stanovena teplota tání specifického produktu na 86,89 °C pro singleplex PCR, na 86,43 °C pro duplex PCR. Tento rozdíl by mohl být ovlivněn jednak přítomností dalších komponent ve vzorku, ale také přítomností jiné DNA. Zároveň se však může jednat pouze o chybu při stanovení teploty tání daného specifického produktu, jelikož se jedná o vysoce citlivou analýzu.

Kromě teploty tání byla v rámci diplomové práce sledována citlivost jednotlivých metod. Pro singleplex PCR byla nejnižší možná koncentrace DNA, kterou lze stanovit pomocí této metody stanovena na $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ pro primery BAS1 a $11 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ pro primery Pa3LTP. Pro duplex PCR nebyl limit detekce stanoven z důvodu nízké koncentrace vyizolované DNA. Při nejvyšší koncentraci $3,5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ nebylo pomocí duplex PCR možné stanovit DNA broskve ani meruňky. Při dané metodě však byly využity vzorky obsahující pouze jednu ze dvou analyzovaných druhů DNA o koncentraci $7 \text{ g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a v obou případech bylo možné danou DNA stanovit. Proto by se dalo předpokládat, že pomocí duplex PCR by bylo možné stanovit DNA o koncentraci $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

V rámci práce měl být sledován i vliv potravinové matrice na analýzu. Předpokládá se, že složení či povaha vzorku mohou ovlivnit samotnou analýzu.

Vzorek 1 byl jedním z vzorků, u kterého byla analýza DNA ovocných druhů nejsložitější. U tohoto vzorku se podařilo detekovat pouze DNA meruňky pomocí singleplex PCR, přestože obsahoval oba druhy DNA. Složitá práce s tímto vzorkem byla nejspíše ovlivněna několika faktory. Jednalo se o vzorek obsahující největší množství jablečné složky a to až 70 %. Zároveň tento vzorek obsahoval aditiva a vzhledem k povaze vzorku (ovocné pyré), tak nejspíše podléhal úpravám, které mohly mít vliv na samotnou DNA. Mohlo se jednat jednak o degradaci DNA vlivem teploty nebo mechanickými silami nebo o depurinaci následkem kyselého pH.

U Vzorku 2 se jako u jediného vzorku podařilo detekovat DNA broskve. DNA meruňky pak nebyla v případě vzorku 2 detekována ani při singleplex PCR. Ve složení nebyla zahrnuta jablečná složka, povaha vzorku však i v tomto případě mohla mít vliv na izolaci a samotnou analýzu.

Ve vzorku 3 se povedlo detekovat DNA meruňky pomocí singleplex PCR. Jedná se o vzorek obsahující poměrně vysoké množství analyzovaných ovocných druhů, neobsahuje však jablečnou složku ani přídatné látky. Jednalo se však opět o vzorek v tekutém stavu a během jeho výroby tak mohlo docházet k procesům, které mohly ovlivnit analýzu.

Vzorek 4 obsahoval dvakrát více broskve než meruňky. Broskev však v tomto vzorku nebyla detekována. Podobně jako vzorek 1 obsahoval vzorek 4 vysoký podíl jablečné složky, která kromě jiného obsahuje pektin. Je tedy možné, že část pektinu zůstala v izolátech DNA i přes použití pektinázy, čímž mohlo dojít k inhibici PCR.

V rámci práce byly analyzovány dva vzorky v pevném stavu. Vzorek 5 byl ovocný čaj, který obsahoval nejnižší množství broskve a meruňky ze všech analyzovaných vzorků. Tento vzorek obsahoval také jablečnou složku a aditiva. U vzorku 5 byla stanovena pouze meruňka pomocí singleplex PCR, a jako u jediného vzorku také pomocí duplex PCR.

Poslední analyzovaným vzorkem byl vzorek 6, kterým byla müsli tyčinka. U tohoto vzorku byla stanovena pouze DNA meruňky, a to pouze při singleplex PCR. Tento vzorek neobsahoval broskev ve svém složení, obsahoval pouze malou část jablečné složky, ale obsahoval aditivní látky.

Z analýzy jednotlivých vzorků lze usuzovat hned několik možných závěrů, jaký má potravinová matrice vliv na analýzu. Zásadní vliv na analýzu má povaha vzorku, zda se jedná o kapalinu (pyré aj.), nebo pevnou látku (čaj, müsli tyčinka aj.). V případě kapalných vzorků je potřeba nejprve vzorky zlyofilizovat, ve srovnání s pevnými vzorky tak přibude v rámci analýzy časově náročný krok navíc. Zároveň by mohlo mít vliv i složení dané typem vzorku,

kdy některé vzorky jsou vyráběny z ovoce zbaveného slupek nebo semínek, čímž se DNA dostává do šťávy, ve které je volně rozmístěna a není nijak chráněna proti degradaci. Další vliv by rozhodně mohla mít přítomnost aditivních látek. V množství vzorků, které bylo v rámci diplomové práce analyzováno však nebylo potvrzeno, zda přítomnost aditivních látek hraje významnou roli při stanovení autenticity potravin či nikoli. Významnou roli však hraje přítomnost jablečné složky ve vzorku. V případě přítomnosti jablečné složky je nutno počítat s přítomností vyššího množství polysacharidů. Proto je nutné v rámci izolace nebo extrakce látek z výrobku zařadit krok, kterým lze polysacharidy odstranit. Dále pak hrálo významnou roli samotné složení vzorku, zejména pak množství ovocné složky ve výrobku.

5.2 Instrumentální část

Hlavním cílem instrumentální části práce byla optimalizace extrakce fenolických látek s jejich následnou detekcí pomocí HPLC/PDA. Instrumentální část práce byla zaměřena na analýzu fenolických látek ve vzorcích. Cílem práce bylo nalézt specifické látky, které by mohly pomoci při identifikaci analyzovaných ovocných druhů ve vzorcích, a zároveň by mohly být tyto látky používány pro stanovení autenticity, případně odhalení falšování potravin. V rámci této části práce byla provedena nejprve extrakce fenolických látek, a to dle postupu v kapitole 4.7.2. Takto vyextrahované fenolické látky byly analyzovány pomocí HPLC/PDA. Z důvodu obsahu rušivých látek, jako byly například polysacharidy však bylo obtížné takto připravené vzorky analyzovat.

Další metodou, která byla využita pro úpravy extraktu fenolických látek bylo srážení kontaminujících sacharidů ethanolem. To bylo provedeno dle postupu v kapitole 4.7.3. Takto připravený vzorek již bylo možné analyzovat pomocí HPLC/PDA. Z důvodu nízké koncentrace vyextrahovaných fenolických látek bylo provedeno zakoncentrování. To bylo provedeno dle postupu v kapitole 4.7.4. Takto zakoncentrované vzorky byly rovněž analyzovány pomocí HPLC/PDA.

Srovnání jednotlivých metod je ilustrováno na chromatogramech, které jsou součástí příloh (Obrázek 44, Obrázek 45). Při analýze nepřečištěného surového extraktu nebylo stanoveno takové množství látek, jako v případě přečištěných extraktů. V nepřečištěných surových extraktech však bylo identifikováno méně látek než u přečištěných a 2x a 10x zakoncentrovaných extraktů. Zároveň ale platí, že 10x koncentrované extrakty již byly příliš koncentrované, což se projevilo nerovností nulové linie a obtížnou identifikací jednotlivých fenolických látek. Jako nejvhodnější způsob přípravy vzorků HPLC byl tedy na základě výše zmíněných faktů zvolen postup s přečištěním surového extraktu ethanolem a dvojnásobným zakoncentrováním.

5.2.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Pomocí HPLC/PDA byly analyzovány extrakty fenolických látek, které sloužili pro detekci specifických látek, které by mohly sloužit pro stanovení autenticity potravin a případně odhalení falšování potravin. Výsledky analýzy jsou zpracovány v tabulkách (Tabulka 17, Tabulka 18 a Tabulka 19).

V rámci HPLC analýzy bylo v analyzovaných vzorcích detekováno celkem 16 fenolických látek. Nejčastěji detekovanou fenolickou látkou byl floridzin, dále pak katechin, kyselina ferulová nebo hesperidin. Zajímavý je právě častý výskyt hesperidinu, který se přirozeně vyskytuje jako antioxidant citrusových plodů [66]. Jeho výskyt ve vzorcích však mohl být způsoben složením vzorků, kdy zejména vzorky ve formě ovocného pyré obsahovaly citronovou šťávu. Hesperidin byl však detekován i ve vzorku 3, který žádné citrusy neobsahoval ani ve formě šťávy. Důvodem by mohla být kontaminace, či přídavek citronové šťávy. Dále je pak zajímavostí, že ve vzorku 5 (čaj) nebyl hesperidin vůbec detekován, přestože jeho deklarovanou součástí je pomerančová kůra. To bylo nejspíše způsobeno technologií výroby čaje, povahou vzorku, jelikož se jednalo o suchý vzorek, a tedy tím, že mohlo dojít k rozkladu této fenolické látky.

Nejčastěji detekovanou fenolickou látkou, jak již bylo zmíněno byl floridzin. Floridzin je fenolická látka přirozeně se vyskytující v jablkách [66]. Jablečná složka byla součástí 4 z celkových 6 vzorků. Vzorky 2 a 3 jablečnou složku uvedenou ve svém složení neměly. U vzorku 3 tato fenolická látka nebyla HPLC analýzou detekována. U vzorku 2 však tato látka detekována byla, to by mohlo svědčit o nahrazování některých složek jablečnou složkou a výskytu floridzinu v daném vzorku.

Významnými fenolickými látkami, které by mohly být obsaženy ve vzorcích obsahující broskev nebo meruňku jsou kyselina kávová, kyselina chlorogenová, quercetin, katechin nebo epikatechin [67], [68]. Všechny tyto fenolické látky byly alespoň v některém ze vzorků stanoveny. Z výše uvedených látek byl pak nejčastěji stanoven katechin a kyselina chlorogenová, nejedná se však o natolik specifické látky, aby mohly být využity pro stanovení autenticity potravin.

Asi nejzajímavější fenolickou látkou v rámci HPLC analýzy byl quercetin-3-glukosid. Ten je specifický právě pro analyzované druhy (broskev a meruňku) [69]. Tato fenolická látka však byla stanovena pouze v jednom z analyzovaných vzorků (vzorek 3). Mezi další látky, které byly ve větším množství vzorků stanoveny patří kyselina ferulová a genistein. I v případě těchto fenolických látek se však jedná o látky, které se vyskytují v běžných potravinách, jako je mléko, tofu nebo jogurt a nejedná se tak o specifické fenolické látky, které by bylo možné využít pro detekci broskve nebo meruňky ve vzorku [70].

Tabulka 17: Výsledky HPLC analýzy, v tabulce zaznamenán retenční čas [min], ve kterém byla látka detekována; n.d. - látka nebyla ve vzorku detekována, SE – surový extrakt, 2x – 2x koncentrovaný přečištěný extrakt, 10x – 10x koncentrovaný přečištěný extrakt

		Kyselina gallová	Kyselina chlorogenová	Kofein	Kyselina kávová	Katechin
Vzorek 1	SE	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2x	4,84	8,43	n.d.	11,86	n.d.
	10x	8,40	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Vzorek 2	SE	n.d.	8,04	n.d.	n.d.	n.d.
	2x	4,83	8,48	n.d.	n.d.	n.d.
	10x	4,91	8,44	9,42	n.d.	12,80
Vzorek 3	SE	n.d.	8,04	n.d.	n.d.	n.d.
	2x	n.d.	7,03	n.d.	n.d.	12,49
	10x	n.d.	8,45	9,43	n.d.	11,42
Vzorek 4	SE	n.d.	8,03	n.d.	n.d.	n.d.
	2x	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11,83
	10x	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11,83
Vzorek 5	SE	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	12,40
	2x	4,29	n.d.	n.d.	n.d.	12,76
	10x	n.d.	8,26	9,44	n.d.	n.d.
Vzorek 6	SE	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11,21
	2x	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11,50
	10x	4,87	n.d.	n.d.	n.d.	11,46

Tabulka 18: Výsledky HPLC analýzy, v tabulce zaznamenán retenční čas [min], ve kterém byla látka detekována; n.d. - látka nebyla ve vzorku detekována, SE – surový extrakt, 2x – 2x koncentrovaný přečištěný extrakt, 10x – 10x koncentrovaný přečištěný extrakt

		Epikatechin	Rutin	Kyselina ferulová	Quercetin-3-glukosid	Hesperidin	Floridzin
Vzorek 1	SE	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2x	n.d.	15,12	n.d.	n.d.	16,21	17,21
	10x	12,78	n.d.	15,58	n.d.	16,20	17,26
Vzorek 2	SE	n.d.	n.d.	15,02	n.d.	16,57	17,24
	2x	n.d.	15,13	n.d.	n.d.	16,60	17,30
	10x	14,73	n.d.	15,70	n.d.	16,58	17,27
Vzorek 3	SE	11,2	n.d.	n.d.	n.d.	16,69	n.d.
	2x	13,49	14,43	15,28	15,85	n.d.	n.d.
	10x	14,82	n.d.	15,69	n.d.	16,73	n.d.
Vzorek 4	SE	n.d.	n.d.	15,52	n.d.	16,17	17,24
	2x	n.d.	n.d.	16,21	n.d.	16,76	17,30
	10x	12,98	n.d.	16,74	n.d.	n.d.	n.d.
Vzorek 5	SE	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	17,78
	2x	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	15,98
	10x	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	18,71
Vzorek 6	SE	n.d.	n.d.	15,08	n.d.	n.d.	17,24
	2x	n.d.	n.d.	15,13	n.d.	n.d.	17,30
	10x	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	17,28

Tabulka 19: Výsledky HPLC analýzy, v tabulce zaznamenán retenční čas [min], ve kterém byla látka detekována; n.d. - látka nebyla ve vzorku detekována, SE – surový extrakt, 2x – 2x koncentrovaný přečištěný extrakt, 10x – 10x koncentrovaný přečištěný extrakt

		Epikatechin gallát	Kyselina sinapová	Resveratrol	Naringenin	Genistein
Vzorek 1	SE	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2x	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	23,26
	10x	17,70	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Vzorek 2	SE	19,09	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2x	19,00	n.d.	n.d.	n.d.	23,27
	10x	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	23,26
Vzorek 3	SE	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2x	n.d.	n.d.	19,54	21,29	23,31
	10x	n.d.	n.d.	18,11	21,25	23,26
Vzorek 4	SE	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2x	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	23,24
	10x	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Vzorek 5	SE	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2x	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	10x	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	23,27
Vzorek 6	SE	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2x	n.d.	19,01	19,50	n.d.	23,27
	10x	n.d.	n.d.	18,98	20,48	23,26

6 ZÁVĚR

Diplomová práce na téma stanovení autenticity různých typů potravinářských produktů s ovocnou složkou pomocí molekulárních a instrumentálních technik byla zaměřena na simultánní stanovení broskve a meruňky v komerčních vzorcích.

V rámci práce byly řešeny dílčí úlohy jako vypracování literární rešerše na zadané téma, optimalizace extrakce DNA a molekulárních metod na bázi multiplex PCR k simultánnímu stanovení ovocných druhů v potravinách. Dále pak optimalizace stanovení charakteristických obsahových složek ovoce pomocí HPLC/PDA a na závěr byl sledován vliv různých typů potravinové matrice na výsledek stanovení autenticity potravin s ovocnou složkou pomocí molekulárních a instrumentálních technik.

V první části práce byly využity různé molekulární techniky pro analýzu. Nejprve byla vyizolována DNA. Pro izolaci byl zvolen kit EliGene Plant DNA Isolation kit. Z důvodu přítomnosti inhibičních látek, jako jsou polysacharidy aj., ve vzorku byl izolační protokol upraven. V rámci izolace byl zařazen krok inkubace s pektinázou, který sloužil pro odstranění polysacharidů inhibujících DNA polymerázu, zejména pektinu. Pektin ve vzorcích pocházel zejména z jablek, které byly součástí většiny vzorků, u některých vzorků mohl pocházet i z jiných ovocných druhů. Takto vyizolovaná DNA byla podrobena polymerázové řetězové reakci s využitím ITS2 primerů specifických pro rostlinnou DNA pro ověření amplifikovatelnosti této DNA. Zároveň byla provedena analýza křivek tání a následně gelová elektroforéza amplikonů. Pomocí upraveného izolačního protokolu s využitím pektinázy byla úspěšně vyizolována amplifikovatelná DNA, která byla v práci použita pro další analýzy.

V rámci práce byla provedena jak singleplex, tak duplex PCR. U obou těchto technik byla ověřena citlivost. Citlivost singleplex PCR byla stanovena na $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ pro primery BAS1 a $11 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ pro primery Pa3LTP. V případě duplex PCR nebyla limitní koncentrace DNA stanovena, jelikož byla duplex PCR provedena s koncentrací DNA z jednotlivých ovocných druhů $3,5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Ani v jednom případě nedošlo při této koncentraci DNA u duplex PCR ke vzniku specifického produktu. Z toho vyplývá, že citlivost singleplex PCR byla vyšší než citlivost duplex PCR. To bylo ovlivněno jak přítomností více primerů, tak přítomností více druhů DNA ve vzorku.

U duplex PCR byla navíc stanovena specifita primerů BAS1 a Pa3LTP. Pomocí HRM byla ověřena specifita navržených primerů. Přestože tyto primery tvoří nespecifické produkty s podobnou teplotou tání a velikostí jako má specifický produkt, zejména pak v případě primerů Pa3LTP specifických pro meruňku, pomocí HRM analýzy bylo tyto produkty možné od sebe odlišit a lze tyto primery považovat za dostatečně specifické pro detekci DNA broskve a meruňky.

V závěru molekulární části práce pak byly analyzovány samotné vzorky. Pomocí singleplex PCR nebyla stanovena broskve ani v jednom z analyzovaných vzorků. V případě meruňky pak byla tato DNA stanovena u všech vzorků kromě vzorku 2. U duplex PCR pak byla broskve stanovena pouze ve vzorku 2. Meruňka pak byla v případě duplex PCR stanovena pouze u vzorku 5. I v tomto případě lze pozorovat změnu citlivosti mezi singleplex a duplex PCR. Zajímavostí je, že broskve, která u vzorku 2 nebyla pomocí singleplex PCR detekována, byla detekována pomocí duplex PCR. To by mohlo být ovlivněno tím, že nebyla detekována DNA

meruňky a pokud bylo ve vzorku více DNA broskve, tak v případě duplex PCR bylo pro analýzu použito 2 μ l a tím by bylo v PCR směsi vyšší množství DNA broskve.

V instrumentální části byla nejprve optimalizována metoda extrakce fenolických látek. Pro extrakci byla využita extrakce směsí ethanolu s vodou, která byla okyselená HCl na pH 2. Takto vyextrahované fenolické látky byly analyzovány pomocí HPLC/PDA. Kvůli obsahu rušivých látek, kterými v tomto případě byly opět polysacharidy, musely být extrakty přečištěny. Zároveň byly tyto extrakty zakoncentrovány pro získání vyšších koncentrací fenolických látek, které by mohly být analyzovány. Přečištění extraktu pomohlo a umožnilo lepší analýzu a detekci fenolických látek. Nejvhodnější bylo zakoncentrování 2x, kdy bylo možné fenolické látky v extraktu analyzovat.

V extraktech bylo pomocí HPLC/PDA stanoveno celkem 16 fenolických látek. Jednalo se převážně o nespecifické látky vyskytující se ve více druzích ovoce současně. Jako specifickou fenolickou látku lze označit quercetin-3-glukosid, který by mohl být využit pro stanovení autenticity broskve a meruňky ve vzorku. Touto metodou však byly detekovány i látky, které patří jiným ovocným druhům, jako je hesperidin nebo floridzin. HPLC analýza by tedy mohla být do budoucna využívána spíše jako nástroj pro odhalení falšování potravin než jako nástroj pro potvrzení přítomnosti analyzovaného druhu. I tuto metodu však lze využít pro stanovení autenticity potravin.

V rámci práce byl nakonec sledován i vliv potravinové matrice. Bylo dosaženo závěru, že potravinová matrice má značný vliv na celkovou analýzu. Významnou roli hrála povaha vzorku (kapalný nebo suchý vzorek), dále pak složení (obsah jablečné složky), ale také druh vzorku a jeho výroba. V této diplomové práci nebyl prokázán vliv aditiv na stanovení.

Hlavním přínosem diplomové práce bylo srovnání multiplex PCR, která by byla použitelná pro stanovení autenticity potravin, s metodami, které jsou běžně používány, jako je singleplex PCR nebo HPLC analýza. Multiplex PCR je použitelnou metodou pro stanovení autenticity potravin. Je však potřeba počítat s nižší citlivostí této metody, než je tomu v případě singleplex PCR. Na druhou stranu se tyto metody liší i v době trvání, kdy v rámci multiplex PCR jsme schopni provést stanovení více druhů najednou a není tak nutné provádět několik různých PCR. Je tedy potřeba počítat s některými obtížemi, jako je nižší citlivost, vyšší riziko kontaminace atd., zároveň ale dojde k urychlení samotné analýzy.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] JIMÉNEZ-CARVELO, Ana M., Sandra MARTÍN-TORRES, Fidel ORTEGA-GAVILÁN a J. CAMACHO. PLS-DA vs sparse PLS-DA in food traceability. A case study: Authentication of avocado samples. *Talanta* [online]. 2021, 224 [cit. 2021-5-17]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2020.121904
- [2] ARRIZABALAGA-LARRAÑAGA, Ane, Guillem CAMPMAJÓ, Javier SAURINA, Oscar NÚÑEZ, Francisco Javier SANTOS a Encarnación MOYANO. Determination of capsaicinoids and carotenoids for the characterization and geographical origin authentication of paprika by UHPLC–APCI–HRMS. *LWT* [online]. 2021, 139 [cit. 2021-5-17]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2020.110533
- [3] Podvody v oblasti potravin - Informace a rady spotřebitelům. Státní zemědělská a potravinářská inspekce [online]. 27.2.2015 [cit. 2021-5-17]. Dostupné z: <https://www.szpi.gov.cz/clanek/podvody-v-oblasti-potravin-informace-a-rady-spotrebitelum.aspx>
- [4] SONG, Weiran, Nanfeng JIANG, Hui WANG a Jordan VINCENT. Use of smartphone videos and pattern recognition for food authentication. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2020, 304 [cit. 2021-5-17]. ISSN 09254005. Dostupné z: doi:10.1016/j.snb.2019.127247
- [5] GAŇOVÁ, Martina, Haoqing ZHANG, Hanliang ZHU, Marie KORABEČNÁ a Pavel NEUŽIL. Multiplexed digital polymerase chain reaction as a powerful diagnostic tool. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2021, 181 [cit. 2021-5-17]. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2021.113155
- [6] PEREIRA, Leonor, Sónia GOMES, Cláudia CASTRO, José Eduardo EIRAS-DIAS, João BRAZÃO, António GRAÇA, José R. FERNANDES a Paula MARTINS-LOPES. High Resolution Melting (HRM) applied to wine authenticity. *Food Chemistry* [online]. 2017, 216, 80-86 [cit. 2021-5-17]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2016.07.185
- [7] MENDOZA, Llyza, Thilina GUNAWARDHANA, Warren BATCHELOR a Gil GARNIER. Nanocellulose for gel electrophoresis. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2019, 540, 148-154 [cit. 2021-5-17]. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcis.2019.01.017
- [8] MIHAILOVA, Alina, Simon D. KELLY, Olivier P. CHEVALLIER, Christopher T. ELLIOTT, Britt M. MAESTRONI a Andrew CANNAVAN. High-resolution mass spectrometry-based metabolomics for the discrimination between organic and conventional crops: A review [online]. 2021, 110, 142-154 [cit. 2021-5-17]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2021.01.071
- [9] SUN, Jiahui, Shuo SHI, Jinlu LI, Jing YU, Ling WANG, Xueying YANG, Ling GUO a Shiliang ZHOU, 2018. Phylogeny of Maleae (Rosaceae) Based on Multiple Chloroplast Regions: Implications to Genera Circumscription. *BioMed Research International* [online]. 2018, 1-10 [cit. 2022-01-12]. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2018/7627191
- [10] MILCZAREK, Agnieszka, Michał SÓJKA a Robert KLEWICKI, 2021. Transfer of ellagitannins to unclarified juices and purees in the processing of selected fruits of the

- Rosaceae family. *Food Chemistry* [online]. 344 [cit. 2022-01-12]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2020.128684
- [11] WANG, Xia, Shengjun LIU, Hao ZUO, et al., 2021. Genomic basis of high-altitude adaptation in Tibetan Prunus fruit trees. *Current Biology* [online]. 31(17), 3848-3860.e8 [cit. 2022-01-12]. ISSN 09609822. Dostupné z: doi:10.1016/j.cub.2021.06.062
- [12] RISTIVOJEVIĆ, Petar, Filip ANDRIĆ, Vesna VASIĆ, Dušanka Milojković OPSENICA a Gertrud MORLOCK, 2022. Fast detection of apricot product frauds by added pumpkin via planar chromatography and chemometrics: Greenness assessment by analytical eco-scale. *Food Chemistry* [online]. 374 [cit. 2022-01-12]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2021.131714
- [13] YIĞIT, D., N. YIĞIT a A. MAVI, 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of bitter and sweet apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernels. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* [online]. 42(4), 346-352 [cit. 2022-01-12]. ISSN 0100-879X. Dostupné z: doi:10.1590/S0100-879X2009000400006
- [14] DIMITROV, Martin, Ivan ILIEV, Krum BARDAROV, Dimitrina GEORGIEVA a Teodora TODOROVA, 2021. Phytochemical characterization and biological activity of apricot kernels' extract in yeast-cell based tests and hepatocellular and colorectal carcinoma cell lines. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 279 [cit. 2022-01-12]. ISSN 03788741. Dostupné z: doi:10.1016/j.jep.2021.114333
- [15] GUO, Chongting, Jinfeng BI, Xuan LI, Jian LYU, Ye XU a Jiaying HU, 2021. Investigation on the phenolic composition, related oxidation and antioxidant activity of thinned peach dried by different methods. *LWT* [online]. 147 [cit. 2022-01-12]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2021.111573
- [16] AUBERT, Christophe a Guillaume CHALOT, 2020. Physicochemical characteristics, vitamin C, and polyphenolic composition of four European commercial blood-flesh peach cultivars (*Prunus persica* L. Batsch). *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 86 [cit. 2022-01-12]. ISSN 08891575. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfca.2019.103337
- [17] ZHOU, Dandan, Qiang LIU, Jing PENG, Sicong TU, Leiqing PAN a Kang TU, 2020. Metabolic analysis of phenolic profiles reveals the enhancements of anthocyanins and procyanidins in postharvest peach as affected by hot air and ultraviolet C. *Postharvest Biology and Technology* [online]. 167 [cit. 2022-01-12]. ISSN 09255214. Dostupné z: doi:10.1016/j.postharvbio.2020.111227
- [18] ČÍŽKOVÁ, H., R. ŠEVČÍK, A. RAJCHL a M. VOLDŘICH. Nutritional Quality of Commercial Fruit Baby Food. *Czech Journal of Food Sciences* [online]. 2009, 27(Special 1), S134-S137 [cit. 2021-5-17]. ISSN 12121800. Dostupné z: doi:10.17221/616-CJFS
- [19] SEIDEL, Kathrin, Johannes KAHL, Flavio PAOLETTI, Ines BIRLOUEZ, Nicolaas BUSSCHER, Ursula KRETZSCHMAR, Marjo SÄRKKÄ-TIRKKONEN, Randi SELJÅSEN, Fiorella SINESIO, et al. Quality assessment of baby food made of different pre-processed organic raw materials under industrial processing conditions. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2015, 52(2), 803-812 [cit. 2021-5-17]. ISSN 0022-1155. Dostupné z: doi:10.1007/s13197-013-1109-5
- [20] PATRAS, Ankit, Nigel BRUNTON, Sara DA PIEVE, Francis BUTLER a Gerard DOWNEY. Effect of thermal and high pressure processing on antioxidant activity and

- instrumental colour of tomato and carrot purées [online]. 2009, 10(1), 16-22 [cit. 2021-5-17]. ISSN 14668564. Dostupné z: doi:10.1016/j.ifset.2008.09.008
- [21] FALGUERA, Víctor, Ferran GATIUS, Miquel PASCUAL, Josep M. VILLAR, Miguel Ángel CUBERO, Albert IBARZ a Josep RUFAT. Influence of fresh and processed fruit quality attributes on peach purée consistency index. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2012, 45(2), 123-131 [cit. 2021-5-17]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2011.09.002
- [22] PATRAS, Ankit, Nigel P. BRUNTON, Sara DA PIEVE a Francis BUTLER. Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées [online]. 2009, 10(3), 308-313 [cit. 2021-5-17]. ISSN 14668564. Dostupné z: doi:10.1016/j.ifset.2008.12.004
- [23] KADLEC, Pavel, 2002. *Technologie potravin*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 80-708-0509-9.
- [24] COSSIGNANI, L., L. POLLINI a F. BLASI. Invited review: Authentication of milk by direct and indirect analysis of triacylglycerol molecular species. *Journal of Dairy Science* [online]. 2019, 102(7), 5871-5882 [cit. 2021-5-17]. ISSN 00220302. Dostupné z: doi:10.3168/jds.2019-16318
- [25] WALKER, G. Stewart. Food authentication and traceability: An Asian and Australian perspective. *Food Control* [online]. 2017, 72, 168-172 [cit. 2021-5-17]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2016.01.028
- [26] LOGAN, Bridgette G., David L. HOPKINS, Leigh M. SCHMIDTKE a Stephanie M. FOWLER. Authenticating common Australian beef production systems using Raman spectroscopy. *Food Control* [online]. 2021, 121 [cit. 2021-5-17]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2020.107652
- [27] NAVARRO, Meritxell, Oscar NÚÑEZ, Javier SAURINA, Santiago HERNÁNDEZ-CASSOU a Lluís PUIGNOU. Characterization of Fruit Products by Capillary Zone Electrophoresis and Liquid Chromatography Using the Compositional Profiles of Polyphenols: Application to Authentication of Natural Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2014, 62(5), 1038-1046 [cit. 2021-5-17]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf404776d
- [28] Zákon č. 110/1997 Sb.: Zákon o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů. In: *Sbírka zákonů ČR*. 1997, 38/1997. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1997-110>
- [29] NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 178/2002. In: *Úřední věstník Evropské unie*. 2002, L 31/1. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=celex%3A32002R0178>
- [30] SMĚRNICE EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY 2000/13/ES. In: *Úřední věstník Evropské unie*. 2000, L 109/29. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=celex%3A32000L0013>
- [31] Vyhláška č. 417/2016 Sb.: Vyhláška o některých způsobech označování potravin. In: *Sbírka zákonů ČR*. 2016, 170/2016. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2016-417/zneni-20170101#f5962505>

- [32] NAŘÍZENÍ RADY (ES)č. 510/2006. In: Úřední věstník Evropské unie. 2006, L 93/12. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A32006R0510>
- [33] Vyhláška č. 76/2003 Sb.: Vyhláška, kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony. In: Sbírka zákonů ČR. 2003, 32/2003. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2003-76>
- [34] Zákon č. 321/2004 Sb.: Zákon o vinohradnictví a vinařství a o změně některých souvisejících zákonů (zákon o vinohradnictví a vinařství). In: Sbírka zákonů ČR. 2004, 105/2004. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2004-321>
- [35] Vyhláška č. 69/2016 Sb.: Vyhláška o požadavcích na maso, masné výrobky, produkty rybolovu a akvakultury a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich. In: Sbírka zákonů ČR. 2016, 26/2016. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2016-69/zneni-20160801#p24-1-1>
- [36] Vyhláška č. 248/2018 Sb.: Vyhláška o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí. In: Sbírka zákonů ČR. 2018, 125/2018. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2018-248/zneni-20181201#p39-1-1>
- [37] Vyhláška č. 330/1997 Sb.: Vyhláška Ministerstva zemědělství, kterou se provádí §18 písm. a), d), j) a k) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro čaj, kávu a kávoviny. In: Sbírka zákonů ČR. 1997, 110/1997. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1997-330>
- [38] Vyhláška č. 157/2003 Sb.: Vyhláška, kterou se stanoví požadavky pro čerstvé ovoce a čerstvou zeleninu, zpracované ovoce a zpracovanou zeleninu, suché skořápkové plody, houby, brambory a výrobky z nich, jakož i další způsoby jejich označování. In: Sbírka zákonů ČR. 59/2003. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2003-157>
- [39] SOBOLEV, Anatoly P, Simone CIRCI, Donatella CAPITANI, Cinzia INGALLINA a Luisa MANNINA. Molecular fingerprinting of food authenticity. *Current Opinion in Food Science* [online]. 2017, 16, 59-66 [cit. 2021-5-17]. ISSN 22147993. Dostupné z: doi:10.1016/j.cofs.2017.08.002
- [40] AMARAL, Joana S., Cristina G. SANTOS, Vitor S. MELO, Joana COSTA, M. Beatriz P.P. OLIVEIRA a Isabel MAFRA. Identification of duck, partridge, pheasant, quail, chicken and turkey meats by species-specific PCR assays to assess the authenticity of traditional game meat Alheira sausages. *Food Control* [online]. 2015, 47, 190-195 [cit. 2021-5-17]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2014.07.009
- [41] PEGELS, Nicolette, Isabel GONZÁLEZ, Teresa GARCÍA a Rosario MARTÍN. Authenticity testing of wheat, barley, rye and oats in food and feed market samples by real-time PCR assays. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2015, 60(2), 867-875 [cit. 2021-5-17]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2014.10.049
- [42] AFIFA KHATUN, Mst., Arzina HOSSAIN, Md. Shakhawat HOSSAIN, M. KAMRUZZAMAN MUNSHI a Roksana HUQUE. Detection of species adulteration in meat products and Mozzarella-type cheeses using duplex PCR of mitochondrial cyt b gene: A food safety concern in Bangladesh. *Food Chemistry: Molecular Sciences*

- [online]. 2021, 2 [cit. 2021-5-17]. ISSN 26665662. Dostupné z: doi:10.1016/j.fochms.2021.100017
- [43] FERREIRA, Thiago, Adriana FARAH, Tatiane C. OLIVEIRA, Ivanilda S. LIMA, Felipe VITÓRIO a Edna M.M. OLIVEIRA. Using Real-Time PCR as a tool for monitoring the authenticity of commercial coffees. *Food Chemistry* [online]. 2016, 199, 433-438 [cit. 2021-5-17]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2015.12.045
- [44] AMANE, Dhanashree a Laxmi ANANTHANARAYAN. Detection of adulteration in black gram-based food products using DNA barcoding. *Food Control* [online]. 2019, 104, 193-200 [cit. 2021-5-17]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2019.04.041
- [45] AKBAR, Azra, Muhammad SHAKEEL, Sami AL-AMAD, Abrar AKBAR, Abdulmohsen K. ALI, Rita RAHMEH, Mohammad ALOTAIBI, Salwa AL-MUQATEA, Syeda AREEBA, et al. A simple and sensitive NGS-based method for pork detection in complex food samples. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2021, 14(5) [cit. 2021-5-17]. ISSN 18785352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2021.103124
- [46] BARRIAS, Sara, José R. FERNANDES, José Eduardo EIRAS-DIAS, João BRAZÃO a Paula MARTINS-LOPES. Label free DNA-based optical biosensor as a potential system for wine authenticity. *Food Chemistry* [online]. 2019, 270, 299-304 [cit. 2021-5-17]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2018.07.058
- [47] LI, Xuegang, Linh V. NGUYEN, Kelly HILL, Heike EBENDORFF-HEIDEPRIEM, Erik P. SCHARTNER, Yong ZHAO, Xue ZHOU, Yanan ZHANG a Stephen C. WARREN-SMITH. All-fiber all-optical quantitative polymerase chain reaction (qPCR). *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2020, 323 [cit. 2021-5-17]. ISSN 09254005. Dostupné z: doi:10.1016/j.snb.2020.128681
- [48] KRÁLOVÁ, Blanka, 2001. *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 80-708-0449-1.
- [49] GANOPOULOS, Ioannis, Anagnostis ARGIRIOU a Athanasios TSAFTARIS. Microsatellite high resolution melting (SSR-HRM) analysis for authenticity testing of protected designation of origin (PDO) sweet cherry products. *Food Control* [online]. 2011, 22(3-4), 532-541 [cit. 2021-5-17]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2010.09.040
- [50] PEREIRA, Leonor, Sónia GOMES, Sara BARRIAS, José Ramiro FERNANDES a Paula MARTINS-LOPES. Applying high-resolution melting (HRM) technology to olive oil and wine authenticity. *Food Research International* [online]. 2018, 103, 170-181 [cit. 2021-5-17]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2017.10.026
- [51] SAJJADI, Sayyed Hashem, Elaheh K. GOHARSHADI a Hossein AHMADZADEH. Heat dissipation in slab gel electrophoresis: The effect of embedded TiO₂ nanoparticles on the thermal profiles. *Journal of Chromatography B* [online]. 2019, 1118-1119, 63-69 [cit. 2021-5-17]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2019.04.030
- [52] DESCALLAR, Faith Bernadette A. a Shingo MATSUKAWA. Change of network structure in agarose gels by aging during storage studied by NMR and electrophoresis. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2020, 245 [cit. 2021-5-17]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2020.116497

- [53] MAN, Ka-Yi, Chi-On CHAN, Hok-Him TANG, Nai-ping DONG, Francesco CAPOZZI, Ka-Hing WONG, Kevin Wing Hin KWOK, Hing Man CHAN a Daniel Kam-Wah MOK. Mass spectrometry-based untargeted metabolomics approach for differentiation of beef of different geographic origins. *Food Chemistry* [online]. 2021, 338 [cit. 2021-5-17]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2020.127847
- [54] LACALLE-BERGERON, Leticia, David IZQUIERDO-SANDOVAL, Juan V. SANCHO, Francisco J. LÓPEZ, Félix HERNÁNDEZ a Tania PORTOLÉS. Chromatography hyphenated to high resolution mass spectrometry in untargeted metabolomics for investigation of food (bio)markers. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2021, 135 [cit. 2021-5-17]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2020.116161
- [55] BÖHME, Karola, Pilar CALO-MATA, Jorge BARROS-VELÁZQUEZ a Ignacio ORTEA. Recent applications of omics-based technologies to main topics in food authentication. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2019, 110, 221-232 [cit. 2021-5-17]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2018.11.005
- [56] PENG, Tian-Qin, Xiao-Li YIN, Hui-Wen GU, Weiqing SUN, Baomiao DING, Xian-Chun HU, Li-An MA, Shu-Dong WEI, Zhi LIU, et al. HPLC-DAD fingerprints combined with chemometric techniques for the authentication of plucking seasons of Laoshan green tea. *Food Chemistry* [online]. 2021, 347 [cit. 2021-5-17]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2020.128959
- [57] NAGORI, R., P. SHARMA, N. HABIBI a S. D. PUROHIT, 2014. An Efficient Genomic DNA Extraction Protocol for Molecular Analysis in *Annona reticulata*. *National Academy Science Letters* [online]. 37(2), 137-140 [cit. 2022-01-12]. ISSN 0250-541X. Dostupné z: doi:10.1007/s40009-013-0213-4
- [58] LV, Ya-Na, Chun-Yong YANG, Lin-Chun SHI, Zhong-Lian ZHANG, An-Shun XU, Li-Xia ZHANG, Xue-Lan LI a Hai-Tao LI, 2020. Identification of medicinal plants within the Apocynaceae family using ITS2 and psbA-trnH barcodes. *Chinese Journal of Natural Medicines* [online]. 18(8), 594-605 [cit. 2022-03-02]. ISSN 18755364. Dostupné z: doi:10.1016/S1875-5364(20)30071-6
- [59] NIU, Liang, Lei PAN, Wenfang ZENG, et al., 2018. Dynamic transcriptomes of resistant and susceptible peach lines after infestation by green peach aphids (*Myzus persicae* Sülzer) reveal defence responses controlled by the Rm3 locus. *BMC Genomics* [online]. 19(1) [cit. 2022-04-29]. ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/s12864-018-5215-7
- [60] FIALOVÁ, L.; LANGOVÁ, D.; PRACHÁROVÁ, A.; MÁROVÁ, I. *Development of a Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of Closely Related Fruit Species in Food*. Studentská odborná konference CHEMIE JE ŽIVOT 2021 Sborník abstraktů. 2021. s. 34-35. ISBN: ISBN 978-80-214-6002.
- [61] KITTUR, Farooqahamed S., Acharya B. VISHU KUMAR a Rudrapatnam N. THARANATHAN, 2003. Low molecular weight chitosans—preparation by depolymerization with *Aspergillus niger* pectinase, and characterization. *Carbohydrate Research* [online]. 338(12), 1283-1290 [cit. 2022-05-03]. ISSN 00086215. Dostupné z: doi:10.1016/S0008-6215(03)00175-7

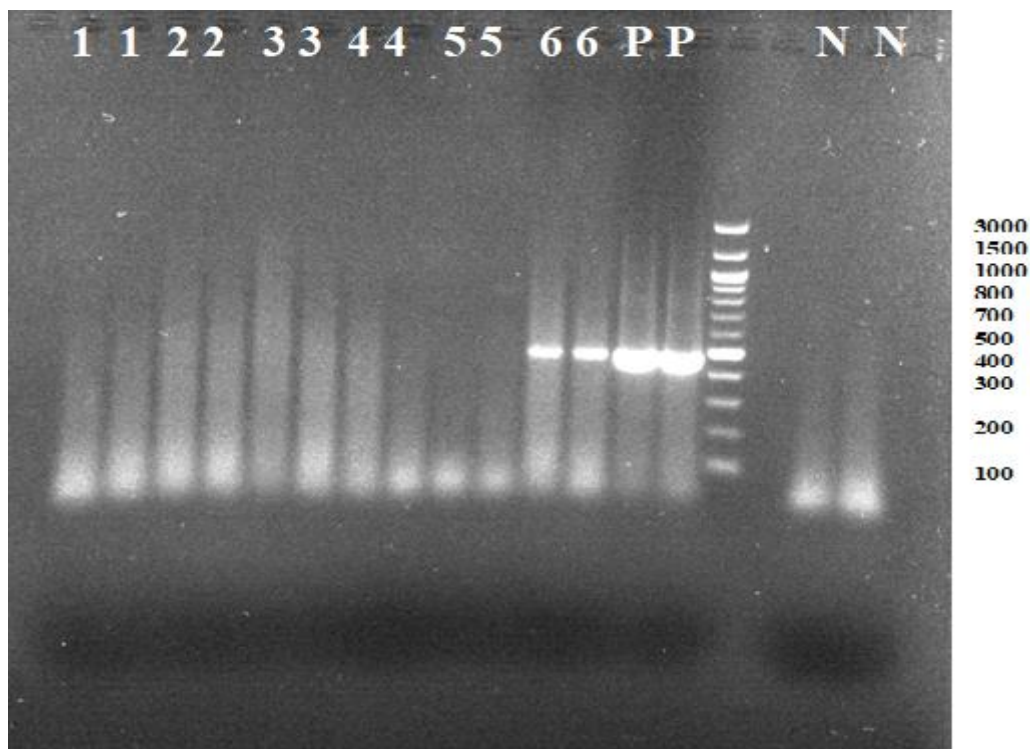
- [62] PINTO, Diana, Elsa F. VIEIRA, Andreia F. PEIXOTO, Cristina FREIRE, Vitor FREITAS, Paulo COSTA, Cristina DELERUE-MATOS a Francisca RODRIGUES, 2021. Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from chestnut shells by subcritical water extraction using response surface methodology. *Food Chemistry* [online]. **334** [cit. 2022-05-03]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2020.127521
- [63] ANTHON, Gordon E. a Diane M. BARRETT, 2008. Combined enzymatic and colorimetric method for determining the uronic acid and methylester content of pectin: Application to tomato products. *Food Chemistry* [online]. **110**(1), 239-247 [cit. 2022-05-04]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2008.01.042 LOUREIRO, S., A. AMORIM, L. CAINÉ, B. SILVA a I. GOMES, 2019. Evaluation of two DNA/RNA co-extraction methods for body fluid identification in forensics. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* [online]. **7**(1), 250-252 [cit. 2022-05-03]. ISSN 18751768. Dostupné z: doi:10.1016/j.fsigss.2019.09.096
- [64] XU, Jun, Rui-Qi YUE, Jing LIU, Hing-Man HO, Tao YI, Hu-Biao CHEN a Quan-Bin HAN, 2014. Structural diversity requires individual optimization of ethanol concentration in polysaccharide precipitation. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. **67**, 205-209 [cit. 2022-05-04]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.03.036
- [65] AFSHAR-MOHAMMADIAN, Mansour, Mohammad Hossein REZADOOST a Seyyed Fatemeh FALLAH, 2018. Comparative analysis and innovation of a simple and rapid method for high-quality RNA and DNA extraction of kiwifruit. *MethodsX* [online]. **5**, 352-361 [cit. 2022-05-03]. ISSN 22150161. Dostupné z: doi:10.1016/j.mex.2018.03.008
- [66] YOUSEFIAN, Mozhdeh, Neda SHAKOUR, Hossein HOSSEINZADEH, A Wallace HAYES, Farzin HADIZADEH a Gholamreza KARIMI, 2019. The natural phenolic compounds as modulators of NADPH oxidases in hypertension. *Phytomedicine* [online]. **55**, 200-213 [cit. 2022-05-04]. ISSN 09447113. Dostupné z: doi:10.1016/j.phymed.2018.08.002
- [67] KHANAM, Sheema, Dr. Anuradha MISHRA, Arshiya SHAHID a Neelkanth Mani PUJARI, 2022. Therapeutic indication of Phloridzin: A new Gleam for metabolic disorders. *Phytomedicine Plus* [online]. **2**(1) [cit. 2022-05-04]. ISSN 26670313. Dostupné z: doi:10.1016/j.phyplu.2021.100200
- [68] DERARDJA, Ala eddine, Matthias PRETZLER, Ioannis KAMPATSIKAS, Milena RADOVIC, Anna FABISIKOVA, Martin ZEHL, Malika BARKAT a Annette ROMPEL, 2022. Polyphenol oxidase and enzymatic browning in apricot (*Prunus armeniaca* L.): Effect on phenolic composition and deduction of main substrates. *Current Research in Food Science* [online]. **5**, 196-206 [cit. 2022-05-04]. ISSN 26659271. Dostupné z: doi:10.1016/j.crf.2021.12.015
- [69] MOKRANI, Abderrahmane, Stéphanie CLUZET, Khodir MADANI, Elena PAKINA, Anvar GADZHURBANOV, Marc MESNIL, Arnaud MONVOISIN a Tristan RICHARD, 2019. HPLC-DAD-MS/MS profiling of phenolics from different varieties of peach leaves and evaluation of their antioxidant activity: A comparative study.

- International Journal of Mass Spectrometry* [online]. **445** [cit. 2022-05-04]. ISSN 13873806. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijms.2019.116192
- [70] GEDÜK, Aysun Şener a Selma ATSIZ, 2022. LC-MS/MS phenolic composition of peach (*Prunus persica* L. Batsch) extracts and an evaluation of their antidiabetic, antioxidant, and antibacterial activities. *South African Journal of Botany* [online]. **147**, 636-645 [cit. 2022-05-04]. ISSN 02546299. Dostupné z: doi:10.1016/j.sajb.2022.02.026
- [71] *Free Radical Biology and Medicine* [online], 2022. 183. [cit. 2022-05-04]. ISSN 08915849. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584922001241>

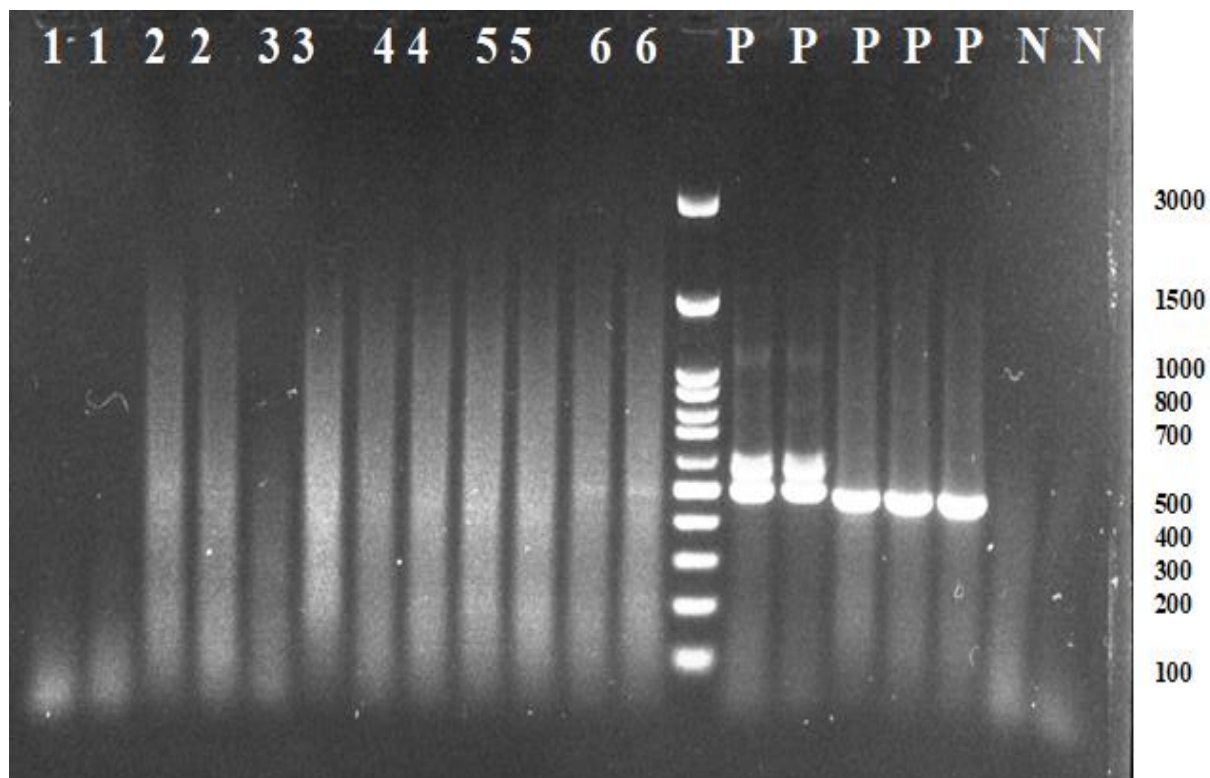
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

DNA, dsDNA	Deoxyribonukleová kyselina, double-strand (dvou řetězcová) DNA
RNA	Ribonukleová kyselina
PCR	Polymerázová řetězová reakce
qRT-PCR	kvantitativní real-time PCR
HRM	Vysokorozlišovací analýza křivek tání
G, C, A, T	nukleotidy, guanin, cytosin, adenin, thymin
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialové záření
PDA	photodiode array, detektor diodového pole
MS, HRMS	hmotnostní spektrometrie, vysokorozlišovací MS
NMR	nukleární magnetická rezonance
TOF	time of flight, MS detektor
RAPD	náhodná amplifikace polymorfni DNA
ARMS	amplifikační refrakční mutační systém
SCAR	amplifikovaná oblast charakterizována sekvencí
SSR	jednoduché opakování sekvence
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
SNP	jednonukleotidový polymorfismus

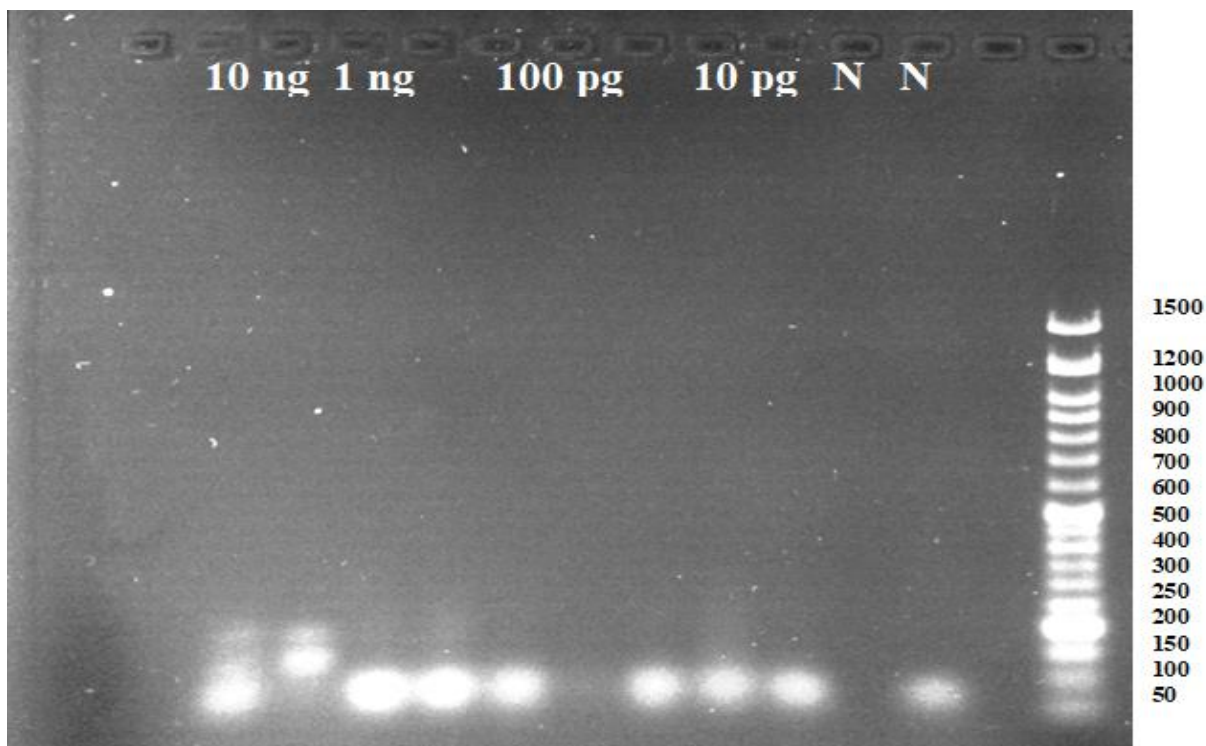
9 PŘÍLOHY



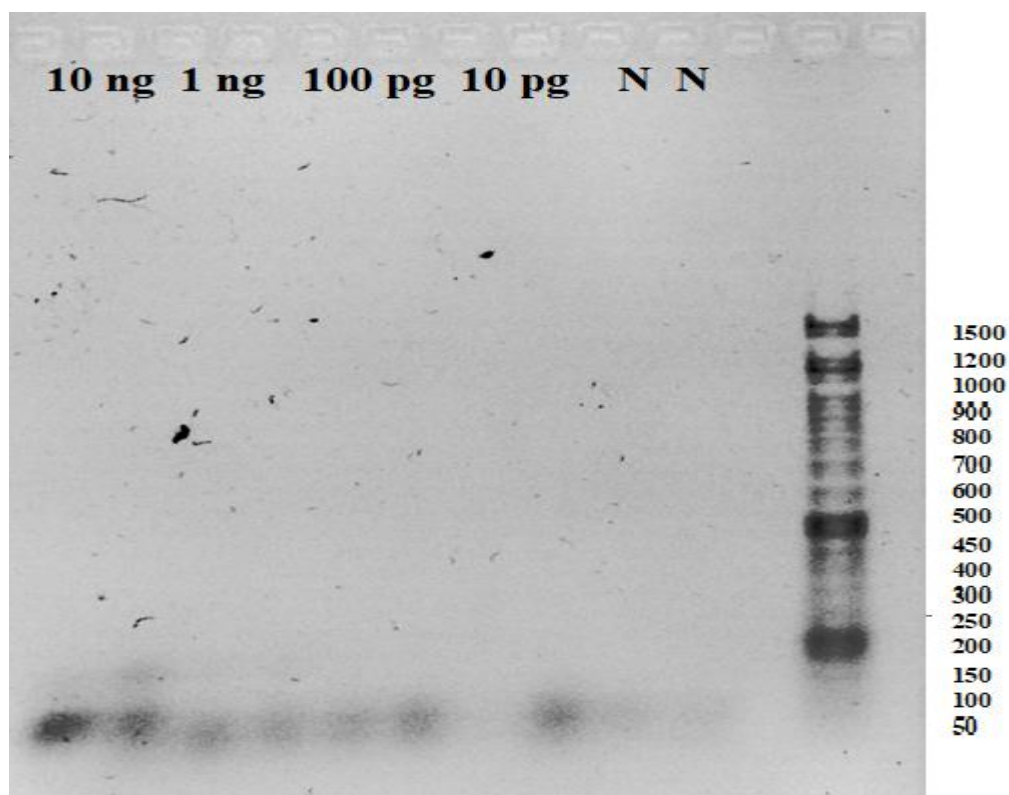
Obrázek 37: Elektroforetický gel, ověření amplifikovatelnosti DNA vyizolované z komerčních vzorků bez použití pektinázy (1-6 – vzorky, P – pozitivní kontrola, N – negativní kontrola)



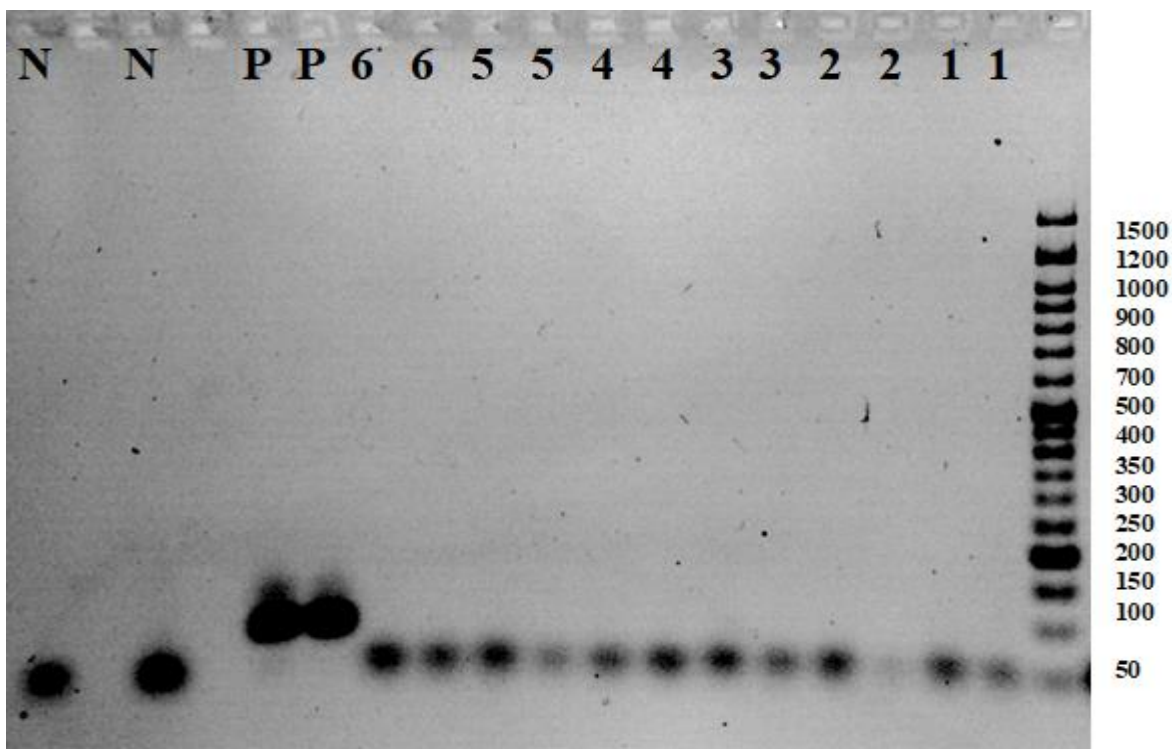
Obrázek 38: Elektroforetický gel, ověření amplifikovatelnosti DNA vyizolované z komerčních vzorků s použitím pektinázy (1-6 – vzorky, P – pozitivní kontrola, N – negativní kontrola)



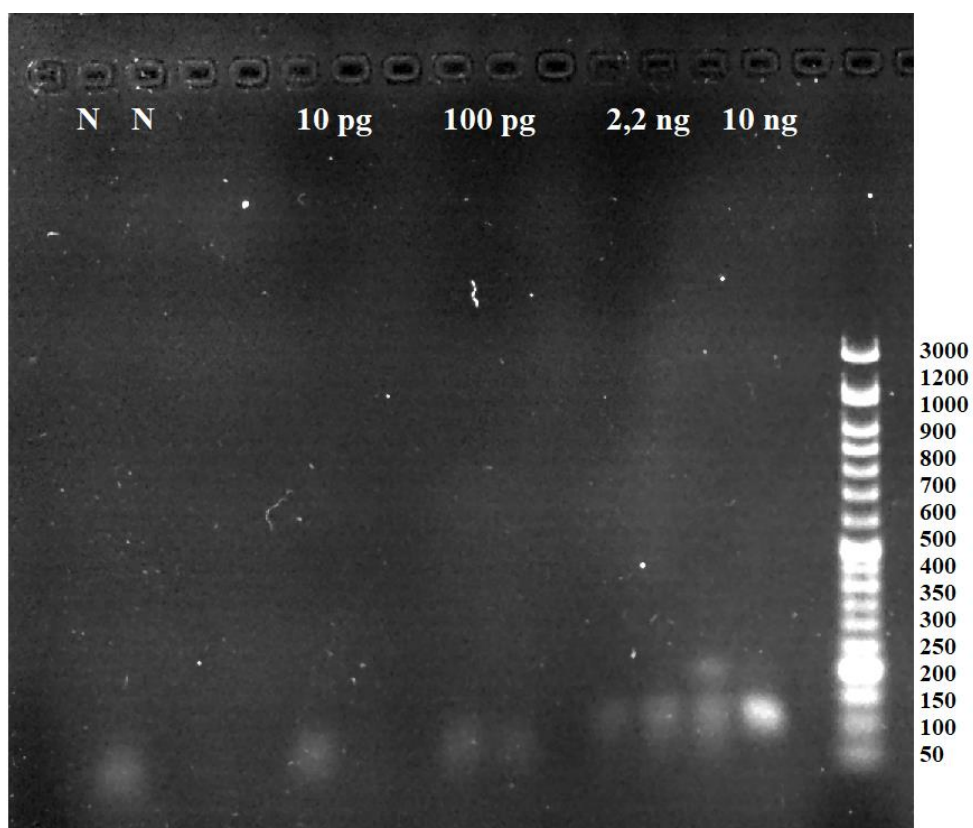
Obrázek 39: Elektroforetický gel, Stanovení citlivosti druhově specifických primerů BAS1 o koncentraci $100 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ v reakční směsi (10 ng – 10 pg – rozsah koncentrací, N – negativní kontrola)



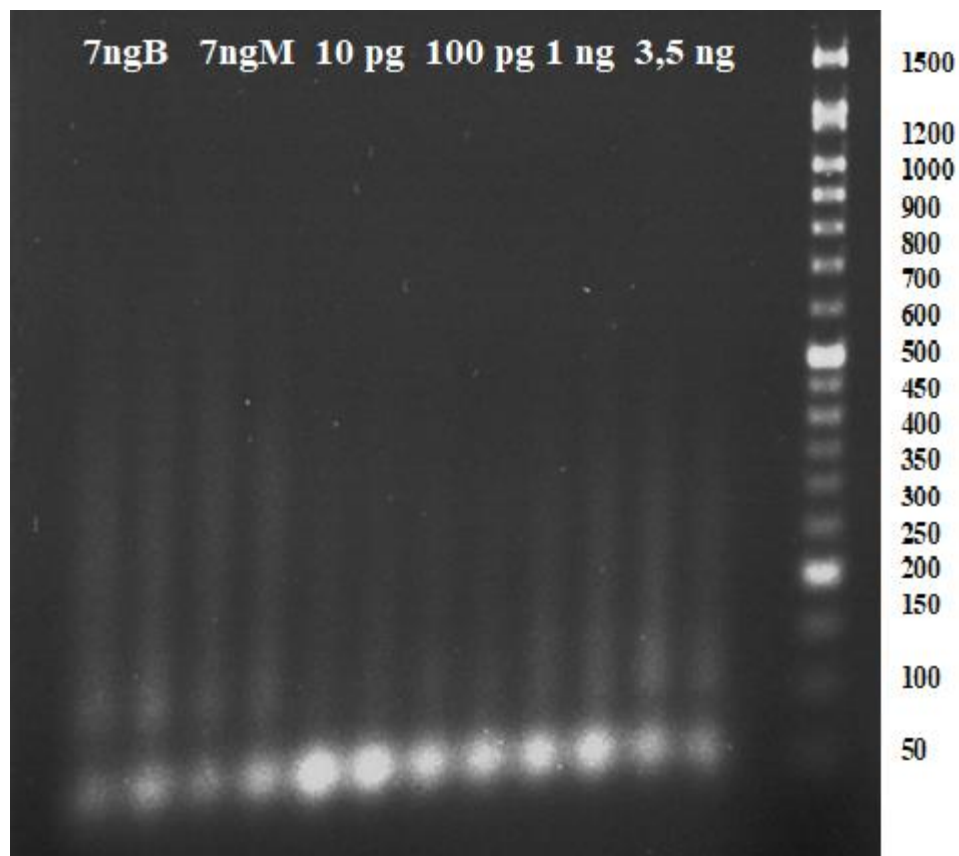
Obrázek 40: Elektroforetický gel, Stanovení citlivosti druhově specifických primerů BAS1 o koncentraci $200 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ v reakční směsi (10 ng – 10 pg – rozsah koncentrací, N – negativní kontrola)



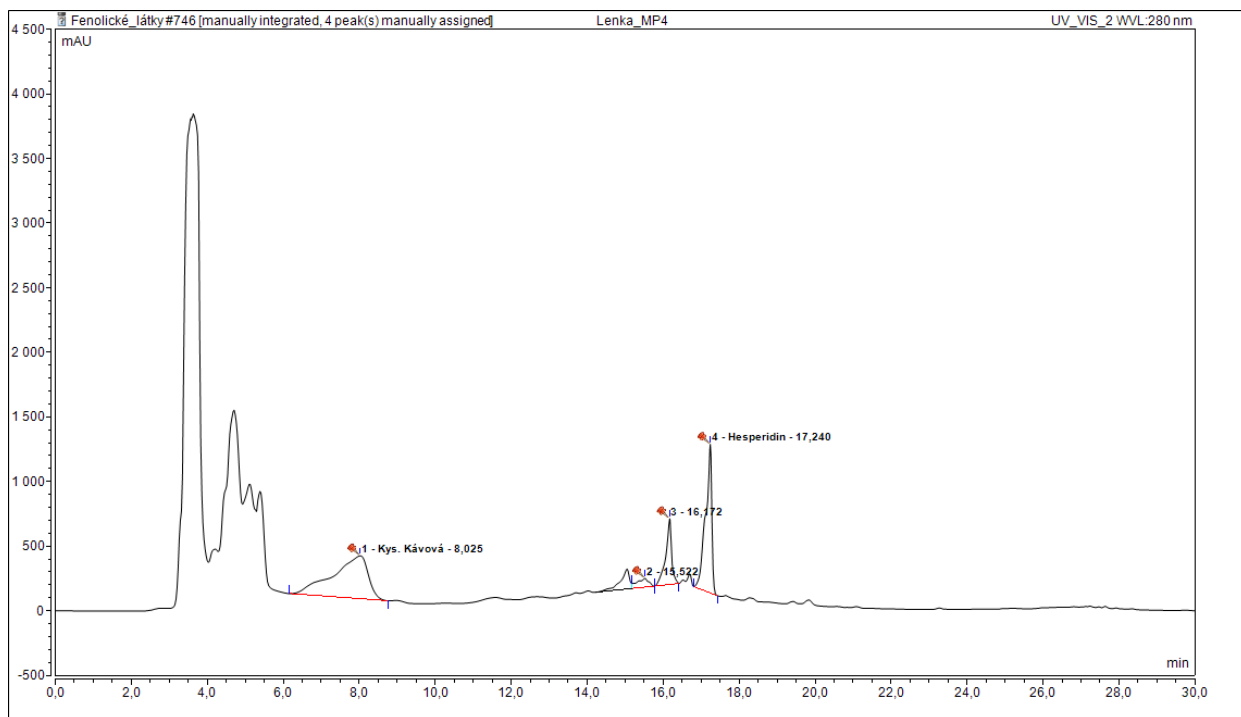
Obrázek 41: Elektroforetický gel, detekce DNA broskve v komerčních vzorcích pomocí druhově specifických primerů BAS1 (N- negativní kontrola, P – pozitivní kontrola, 1-6 – vzorky)



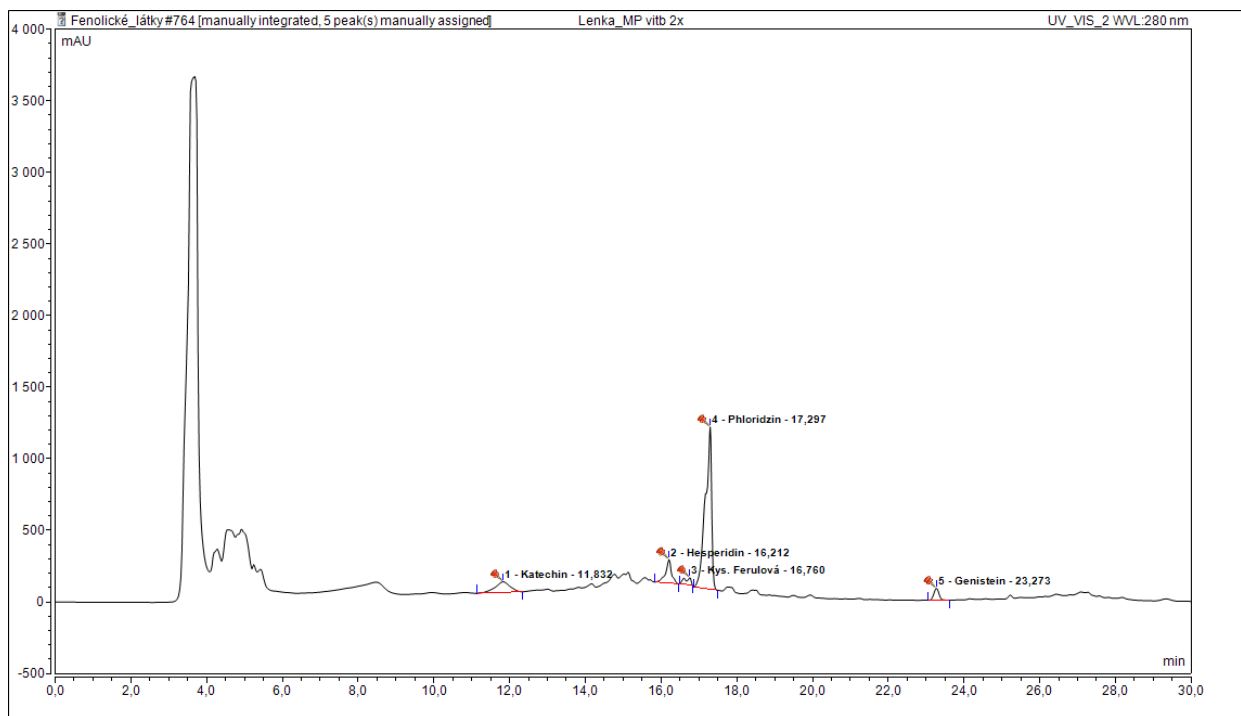
Obrázek 42: Elektroforetický gel, Stanovení citlivosti druhově specifických primerů Pa3LTP (N – negativní kontrola, 10 ng – 10 pg – rozsah koncentrací)



Obrázek 43: Elektroforetický gel, Stanovení citlivosti druhově specifických primerů BAS1 a Pa3LTP při duplex PCR (7ngB – DNA broskev 7 ng, 7ngM – DNA meruňky 7 ng, 3,5 ng – 10 pg – rozsah koncentrací)



Obrázek 44: Chromatogram, surový extrakt, vzorek 4



Obrázek 45: Chromatogram, 2x koncentrovaný přečištěný extrakt, vzorek 4