



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**VYUŽITÍ MAGNETICKÝCH ČÁSTIC PRO IZOLACI A
PURIFIKACI DNA Z VÝROBKŮ PRO DĚTSKOU VÝŽIVU**

THE USE OF MAGNETIC PARTICLES FOR ISOLATION AND PURIFICATION OF DNA FROM PRODUCTS
FOR CHILDREN NUTRITION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Aneta Pešková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Aleš Kovařík, CSc.

BRNO 2018

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1241/2017
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Aneta Pešková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **RNDr. Aleš Kovařík, CSc.**
Akademický rok: 2017/18

Název diplomové práce:

Využití magnetických částic pro izolaci a purifikaci DNA z výrobků pro dětskou výživu

Zadání diplomové práce:

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

Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2018

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

Bc. Aneta Pešková
student(ka)

RNDr. Aleš Kovařík, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Izolace rostlinné DNA je komplikovaná z důvodu přítomnosti polyfenolů, polysacharidů a dalších metabolitů, které bývají izolovány současně s DNA. Tyto látky mohou mít vliv na výtěžek a kvalitu izolované DNA, a také mohou působit jako inhibitory PCR. Mezi moderní, jednoduché a rychlé metody izolace DNA v molekulárně biologických laboratořích patří magnetická separace, která využívá reverzní imobilizaci DNA na magnetické nosiče a umožňuje získání DNA ve vysoké kvalitě a čistotě.

V experimentální části byla provedena mikroizolace rostlinné DNA ze zeleniny (mrkev), ovoce (hruška, jablko, citron, mango) a z tepelně zpracovaných potravinových výrobků pro děti (Hami první mrkvička, Nestlé ovocná kapsička, dmBIO hruška mrkev jablko, Hello ovocná přesnídávka s jablky a Hello ovocná přesnídávka s mangem). K izolaci DNA byly využity magnetické mikročástice PGMA 2 mg/ml a magnetické nanočástice funkcionalizované poly-L-lysinem (PLL) 0,2 mg/ml. Byla porovnána metoda izolace magnetických částic s navázanou DNA magnetickým separátorem a magnetickou jehlou. Kvalita a množství izolované DNA byly zjištěny spektrofotometrickou analýzou a amplifikovatelnost izolované DNA byla ověřena konvenční polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) s primery specifickými pro rostlinnou ribosomální DNA (rDNA). Produkty PCR o velikosti 700, 350 a 220 bp byly detegovány agarózovou gelovou elektroforézou. Z tepelně zpracovaných potravinových výrobků pro děti byla pomocí magnetických nosičů izolována DNA v kvalitě vhodné pro PCR. Detegovány byly však pouze kratší PCR produkty o velikosti 220 bp, což svědčí o degradaci DNA. Specifita PCR produktů byla stanovena analýzou délky restričního fragmentu (RFLP). Experimentální výsledky odpovídaly teoretickým výsledkům restriční analýzy.

KLÍČOVÁ SLOVA

Izolace rostlinné DNA

Potravinové výrobky pro děti.

Magnetické částice

Polymerázová řetězová reakce (PCR)

ABSTRACT

Isolation of plant DNA is complicated due to the presence of polyphenols, polysaccharides and other metabolites, that are isolated together with DNA. These compounds can affect the yield and quality of DNA and can inhibit a polymerase chain reaction (PCR). A modern, simple, and fast method of DNA isolation in molecular biology laboratories is magnetic separation based on reversible DNA immobilization on magnetic particles. These methods allow to obtain DNA of high quality and purity.

In the experimental part, magnetic microparticles PGMA 2 mg/ml and magnetic nanoparticles functionalized by polylysine (PLL) 0,2 mg/ml were used for isolation of plant DNA from vegetables (carrots), fruits (pear, apple, lemon, mango) and heat treated food products for children (Hami first carrot, Nestlé fruit pocket, dmBIO pear carrot apple, Hello fruit snack with apples and Hello fruity snack with mango). The efficiency of separation of magnetic particles with bound DNA using a magnetic needle and a magnetic separator were compared. The quality and quantity of isolated DNA were verified by spectrophotometric analysis. The amplificability of isolated DNA was tested in a conventional PCR using primers specific for plant ribosomal DNA (rDNA). PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis. Major fluorescent bands were of 700, 350 and 220 bp corresponding to three different rDNA amplicons. DNA was isolated from heat treated food products for children in a PCR-ready quality. Only 220 bp long PCR products were detected, that indicated DNA degradation. The identity of PCR products was determined by restriction fragment length analysis (RFLP) using *NlaIII* enzyme cutting the rDNA subregion (ITS1) of *Daucus carota* (carrot). The digestion profiles were in a good agreement with those predicted from bioinformatic analysis confirming, thus, the specificity of the developed PCR method.

KEY WORDS

Isolation of plant DNA

Food products for children.

Magnetic particles

Polymerase chain reaction (PCR)

PEŠKOVÁ, A. *Využití magnetických částic pro izolaci a purifikaci DNA z výrobků pro dětskou výživu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 77 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Aleš Kovařík, CSc..

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce panu RNDr. Aleši Kovaříkovi, CSc. a své konzultantce paní doc. RNDr. Aleně Španové, CSc. ze odborné vedení, ochotu, cenné rady a čas, který mi věnovali při zpracování této práce.

OBSAH

1	Úvod.....	9
2	Teoretická část.....	10
2.1	Autenticita potravin	10
2.1.1	Metody používané pro ověření autenticity potravin.....	10
2.1.2	Potravinové výrobky pro děti	11
2.2	Deoxyribonukleová kyselina (DNA).....	11
2.2.1	Kondenzace DNA	12
2.2.2	Adsorpční a desorpční chování DNA.....	12
2.2.3	Agregace DNA	13
2.2.4	Poly(ethylenglykol) – PEG	13
2.3	Izolace rostlinné DNA	14
2.4	Magnetická separace DNA.....	14
2.4.1	Vlastnosti magnetických částic	16
2.5	Polymerázová řetězová reakce	17
2.5.1	Konvenční PCR.....	17
2.5.2	PCR v reálném čase.....	19
2.5.3	Inhibitory PCR	20
3	Cíl práce	21
4	Experimentální část.....	22
4.1	Materiál.....	22
4.1.1	Rostlinný materiál	22
4.1.2	Výrobky.....	22
4.1.3	Chemikálie	24
4.1.4	Magnetické částice	24
4.1.5	Komponenty pro PCR	25
4.1.6	Přístroje a pomůcky.....	25
4.1.7	Roztoky	26
4.2	Metody.....	27
4.2.1	Příprava vzorků pro analýzu.....	27
4.2.2	Příprava homogenátů.....	27
4.2.3	Izolace DNA pomocí magnetických mikro- a nanočástic.....	27
4.2.4	Zakoncentrování izolované DNA.....	28

4.2.5	Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA	28
4.2.6	Ověření kvality izolované DNA metodou PCR	28
4.2.7	Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR.....	30
4.2.8	Restrikční analýza produktů PCR	31
4.2.9	Bioinformační analýza	31
5	Výsledky.....	32
5.1	Izolace DNA z kořene mrkve magnetickými mikročásticemi PGMA	32
5.1.1	Ověření amplifikovatelnosti izolované DNA metodou PCR	34
5.2	Izolace DNA z čerstvé zeleniny a ovoce	36
5.2.1	Izolace DNA magnetickými mikročásticemi PGMA z homogenátů přečištěných isopropanolem	36
5.2.2	Izolace DNA z homogenátů přečištěných isopropanolem bez použití magnetických částic	38
5.3	PCR s primery <i>ZD_for</i> a <i>ZD_rev</i>	41
5.3.1	Testování teploty hybridizace v rozmezí 50–70 °C	41
5.3.2	Amplifikace DNA z kořene mrkve s teplotou hybridizace 60 °C.....	42
5.3.3	Testování jiné polymerázy a teploty hybridizace v rozmezí 50–70 °C.....	44
5.3.4	Testování primerů v PCR s bakteriální DNA <i>L. casei</i>	45
5.4	Optimalizace PCR pro amplikony o velikosti 700 bp	46
5.4.1	Ověření teploty hybridizace s primery <i>18S_for</i> a <i>5,8S_rev</i>	46
5.4.2	PCR s teplotou hybridizace 52 °C.....	48
5.5	Izolace DNA z výrobků pro děti.....	49
5.5.1	Množství DNA izolované z homogenátů přečištěných isopropanolem, separované magnetickými nanočásticemi PLL	49
5.5.2	Amplifikace s primery <i>18S_for</i> a <i>5,8S_rev</i>	52
5.5.3	Zakoncentrování DNA a amplifikace s primery <i>26S_for</i> a <i>26S_rev</i>	54
5.6	Ověření přítomnosti specifické DNA mrkve v amplikonu.....	57
5.6.1	Restrikční analýza PCR produktů mrkve	57
5.7	Porovnání různých metod izolace DNA magnetickými částicemi	61
5.7.1	Izolace DNA z čerstvé zeleniny a ovoce magnetickými mikročásticemi PGMA..	61
5.7.2	Izolace DNA z potravinových výrobků pro děti magnetickými nanočásticemi PLL	62
6	Diskuse	63

6.1	Ověření metody mikroizolace DNA a optimalizace podmínek pro izolaci DNA z kořene mrkve	63
6.2	Izolace DNA z homogenátů s CTAB z ovoce a zeleniny.....	64
6.3	PCR s primery <i>ZD_for</i> a <i>ZD_rev</i>	65
6.4	Optimalizace PCR s primery <i>18S_for</i> a <i>5,8S_rev</i>	65
6.5	Izolace rostlinné DNA z potravinových výrobků pro děti	65
6.6	Porovnání efektivity testovaných způsobů izolace DNA z různých typů vzorků	66
6.7	Ověření specifity amplikonu	66
7	Závěr.....	67
8	Seznam použitých zdrojů	68
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	77

1 ÚVOD

V současné době je aktuální téma autenticity potravin. Falšování potravin je známo již od doby, kdy začaly být vyráběny a využívány jako zdroj ekonomického zisku. Výživa hraje významnou roli především u dětí a složení stravy může pozitivně nebo negativně ovlivnit jejich vývoj. Z toho důvodu je nutné přísně kontrolovat přesné složení potravin a vyvíjet spolehlivé techniky pro jejich kontrolu. Mezi velmi využívané metody patří molekulárně diagnostické techniky a mikrobiologická analýza [1], [2].

Nejvíce využívanou metodou pro identifikaci mikroorganismů, rostlin i živočichů je metoda polymerázové řetězové reakce (PCR). Použití PCR analýzy vyžaduje izolaci DNA ve vysoké kvalitě a čistotě. Při analýze reálných vzorků může docházet ke vzniku falešně negativních výsledků vlivem mnoha organických a anorganických sloučenin koextrahovaných s DNA. Proto je věnována velká pozornost nejen vývoji rychlých a efektivních metod izolace DNA, ale také jednotlivým krokům při izolaci DNA a chování DNA při použití různých komponent a za různých experimentálních podmínek. Jedním ze způsobů odstranění vlivu inhibitorů je fenolová extrakce, která je však pracná, zdlouhavá a hrozí zde kontaminace z důvodu četnosti převodu fází.

V současné době je nejvyužívanější metodou izolace DNA reverzibilní adsorpce na pevné částice a kolonky. Mezi základní vlastnosti magnetických nosičů patří nejen paramagnetismus, velikost, tvar, stupeň polydisperzity, obsah funkčních skupin, ale nosič musí být také stabilní ve vodných roztocích (neagregovat), nepodléhat chemickým změnám a mít vysoký obsah magnetického plniva. Oproti jiným metodám je použití magnetických nosičů rychlé, nenáročné z hlediska použití chemikálií a možností automatizace. Minimalizuje se také účinek organických rozpouštědel na DNA [3], [4], [5], [6].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Autenticita potravin

Stále více spotřebitelů klade při stravování důraz na kvalitu potravin před kvantitou. Z toho důvodu roste také zájem o biopotraviny, funkční potraviny a produkty nebo potraviny s chráněným označením – chráněné označení původu (CHOP), chráněné zeměpisné označení (CHZO) a zaručená tradiční specialita (ZTS), které zaručují určitou kvalitu [7].

Kritérií určujících pravost potravin je mnoho. Jejich kontrola probíhá od dodavatelů jednotlivých surovin, pokračuje kontrolou výrobků a končí kontrolou prodejců. Falšování potravin je ale legislativně přísně ošetřeno jen v případě správného popisu a označení na etiketách. To je důležité pro spotřebitele, jelikož údaje uvedené na obalu potraviny jsou pro ně základním zdrojem informací o dané potravine. Správnost těchto údajů je regulována zákony, vyhláškami a nařízeními. Obecně platí, že informace uváděné na potravinách nesmějí uvádět spotřebitele v omyl, musí být čitelné, přesné a jasné, nesmějí připisovat potravine vlastnosti (nebo na ně odkazovat), které jsou schopny zabránit určité lidské nemoci, zmírnit ji nebo ji vyléčit a musí být ve srozumitelném jazyce. Za tyto informace je zodpovědný provozovatel potravinářského podniku, jehož jménem nebo obchodním názvem je potravina uváděna na trh [1], [7], [8].

Falšováním potravin můžeme rozumět nesprávné označení potraviny, úplné nebo částečné nahrazení suroviny levnější složkou, umělé vylepšení vlastností potraviny nebo nepravdivé označení původu. Nejčastěji dochází k falšování dražších potravin (lihoviny, víno, koření) nebo potravin prodávaných ve velkých množstvích (masné a mléčné výrobky, tuky, oleje a ovocné šťávy). Při konzumaci takovýchto potravin může dojít ke zdravotním problémům, nejčastěji k otravě nebo potravinovým alergiím, proto je nutné zajistit, aby všechny suroviny využívané při zpracování potravin splňovaly požadované normy, tedy bezpečnost potravin. Bezpečnost potravin zahrnuje hygienu jejich výroby, kontrolní mechanismy, monitorování potravinových řetězců, případně bezpečnost krmiv. Jejich kontrolu zajišťují státní organizace a instituce. Kritéria bezpečnosti potravin jsou platná po celou dobu trvanlivosti potravin uvedených na trh a jsou stanovena pro mikroorganismy a jejich toxiny nebo metabolity v různých potravinářských komoditách. Pokud dojde k jakémukoli porušení podmínek, provozovatel podniku buď nesmí umístit potraviny na trh nebo bude nucen tyto potraviny odstranit z trhu [1], [9], [10], [11].

2.1.1 Metody používané pro ověření autenticity potravin

S rostoucím zájmem spotřebitelů o bezpečnost a nutriční hodnotu potravin roste také poptávka po přesných a spolehlivých metodách ke zjištění jednotlivých složek v potravinách. Mnoho analytických a molekulárních metod je určeno k analýze čerstvých potravinářských produktů. Většina vzorků potravin je však do určité míry tepelně nebo jinak zpracována a DNA v nich může být fragmentována [9]. Zpracované produkty obvykle obsahují méně vody než čerstvé a je u nich také větší pravděpodobnost výskytu sekundárních metabolitů, které mohou působit jako inhibitory PCR. Ideální analytická metoda by měla zahrnovat jednostupňovou izolaci DNA, zakoncentrování a kvantitativní stanovení analytu, které jsou obvykle obsaženy ve stopových množstvích. Moderní metody ale nejsou vždy dostatečně citlivé pro přímou analýzu a analyt musí být nejprve upraven. Při vývoji metod je nutné

minimalizovat počet analytických kroků při přípravě vzorků, protože každý další krok v analytickém postupu zvyšuje pravděpodobnost ztráty analytu a kontaminaci vzorku [12].

Běžně využívané metody sloužící k identifikaci rostlinných druhů a pravosti potravin jsou založeny na analýze bílkovin a metabolitů. Pro analýzu bílkovin jsou využívána imunologická stanovení (například ELISA) nebo elektroforetické metody, zatímco k analýze metabolitů slouží vysokoúčinná kapalinová chromatografie, nukleární magnetická rezonance a hmotnostní spektrometrie. Výsledky těchto metod jsou ovlivněny zemědělskými technikami, prostředím, klimatickými podmínkami a zpracováním produktů. Metody založené na analýze DNA jsou považovány za spolehlivější z důvodu stability DNA a umožňují kvantitativní stanovení. Tyto metody využívají toho, že DNA je přítomna ve všech buňkách organismu. Cílem těchto metod je extrakce DNA vhodné čistoty a množství pro PCR z analyzovaných potravin a amplifikovat fragmenty o požadované velikosti v PCR. Amplikony jsou dále analyzovány agarózovou gelovou elektroforézou, analýzou křivek tání (HRM), sekvencováním atd [1], [9], [11], [13], [14].

2.1.2 Potravinové výrobky pro děti

Výživu od narození do třetího roku dítěte můžeme rozdělit do tří období:

- Období od narození do konce 6. měsíce – výhradně mléčná výživa.
- Období od 6. měsíce do 12. měsíců – přechodové období.
- Období od jednoho do tří let – období smíšené stravy (upravená rodinná strava vhodná pro dítě) [2].

Aktuálně platná legislativa nestanovuje přesnou povahu potravin, která je označena jako „dětská“. Speciální požadavky však platí pro potraviny určené pro kojence a děti do 3 let (například mléčné výživy nebo příkrmy), ty totiž spadají do skupiny pro zvláštní výživu a požadavky pro ně stanovují speciální předpisy. Počáteční a pokračovací kojenecká výživa smí být uvedena na trh pouze v případě, pokud je v souladu s těmito předpisy [15], [16].

2.2 Deoxyribonukleová kyselina (DNA)

Deoxyribonukleová kyselina je dlouhý záporně nabitý heteropolymer, jehož základní stavební jednotkou je nukleotid. Jednotlivé nukleotidy jsou složeny z pentózy, dusíkaté báze a fosfátu a tvoří spolu řetězce. Dusíkaté báze jsou dvojího typu, pyrimidinové (thymin a cytosin) a purinové (adenin a guanin). Dva antiparalelní řetězce jsou propojeny vodíkovými vazbami, a to vždy pyrimidinovými a purinovými bázemi, čímž je dána komplementarita bází. Báze se párují cíleně, a to adenin s thyminem dvěma vodíkovými vazbami a guanin s cytosinem třemi vodíkovými vazbami. Dusíkaté báze také stabilizují dvoušroubovici DNA nekovalentními vazbami mezi aromatickými cykly dusíkatých bází tzv. stackovy interakce. Způsob spojení nukleotidů udává polaritu řetězce, což je důvodem pro označování jednoho konce řetězce DNA jako 3' (konec –OH skupiny sacharidu) a druhého 5' (konec je fosfátová skupina). Molekula DNA nese přibližně jeden elementární náboj na každých 0,17 nm délky dvoušroubovice a její průměr je 2 nm, přičemž délka při natažení molekuly může být až několik metrů v závislosti na typu organismu. Její struktura byla popsána roku 1953 pomocí Watson-Crickova modelu DNA [17], [18], [19].

2.2.1 Kondenzace DNA

Uchování a zpracování genetické informace kódované v DNA je dáno vlastnostmi mnoha sloučenin, které se vážou, ohýbají, modifikují DNA, shromažďují se na dvoušroubovici a vzájemně se rozpoznávají. Tyto děje jsou navíc komplikovány tím, že probíhají *in vivo* ve vysoce kompaktním tzv. kondenzovaném stavu. Kondenzace DNA bývá definována jako „kolaps“ řetězců DNA do kompaktních částic obsahujících jednu nebo několik molekul. Je úzce spojena s dehydratací DNA, a proto může být považována za komplexní koacervaci (fázové oddělení fáze bohaté a chudé na DNA). Kondenzaci lze vyvolat působením vnější síly (například osmotického tlaku vyvolaného působením neutrálního polymeru a monovalentní soli) nebo vyvoláním vzájemných přitažlivých interakcí mezi DNA segmenty. Ve vodných roztocích jsou pro kondenzaci DNA obvykle vyžadovány ionty s nábojem 3^+ a vyšším. Mezi typické ligandy patří ionty trojmocných kovů, anorganické kationty, polyaminy, přírodní a syntetické peptidy a monovalentní protiionty (Na^+). Typickým příkladem je využití polyethylenglykolu (PEG) v přítomnosti iontů Na^+ . Morfologie kondenzátů je závislá na vlastnostech roztoku a struktuře kondenzačního činidla. Podle délky DNA dochází ke kondenzaci buď jako monomolekulární kolaps nebo multimolekulární agregace [19], [20], [21].

V řadě teoretických prací bylo prokázáno, že helikální symetrie DNA vede k DNA-DNA interakcím závislým na sekvenci nukleových kyselin. Mechanické porozumění struktury vyžaduje kromě znalosti struktury kondenzovaných částic a jejich stabilizačních sil také znalost kinetiky jejich tvorby a rozpouštění. Kinetika kondenzace byla poprvé studována za využití rozptylu světla [20], [21].

Uplatnění kondenzace DNA na poli medicíny má využití především v genové terapii, problémem je ale rozpoznání cílů. Mimo jiné je také možnost praktického využití v biotechnologiích při konstrukci biosenzorů, případně jako citlivé nanosenzory kovových iontů na bázi DNA [19], [20], [21], [22].

2.2.2 Adsorpční a desorpční chování DNA

Při extrakci a purifikaci nukleových kyselin je nejběžnějším způsobem použití magnetických částic obsahujících aminoskupiny $-\text{NH}_2$, které dávají nosičům kladný náboj. Je nutné, aby po izolaci došlo k účinnému uvolnění DNA z nosičů a ta mohla být použita pro následnou PCR analýzu, ale ne všechna DNA je z částic eluována do pufru, obvykle 5–10 % adsorbované DNA zůstává na částicích i po eluci. Adsorpce a následná eluce je podmíněna kondenzací DNA, která se takto dostává do kulovitě-spirálového stavu. Pro získání tohoto stavu je nutná přítomnost polymerní látky polyethylenglykolu (PEG) v kombinaci s chloridem sodným, a tím je způsobena dehydratace molekuly DNA. Adsorpční a desorpční chování DNA závisí také na typu přítomných aniontů, změně solvatačního stavu, použitých typech rozpouštědel a dNTP s fosfátovým pufrům. V neposlední řadě záleží také na množství použitých magnetických částic. Použití příliš malého množství magnetických nosičů při izolaci DNA vede ke snížení účinnosti adsorpce. Naopak příliš velké množství vede k přednostnímu vychytávání nukleových kyselin s delšími řetězci. Při optimálních podmínkách je účinnost izolace fragmentů DNA pomocí magnetických částic přibližně 90 %. Účinky solvatace na adsorpci DNA na aminosilikátové magnetické částice jsou ovlivňovány použitím aprotických

(acetonitril, dimethylformamid) a protických (methanol, ethanol) rozpouštědel, přičemž adsorpce v aprotických rozpouštědlech je vyšší. Přidáním organických rozpouštědel se adsorpce DNA rovněž zvyšuje. Účinná adsorpce nastává při pH 8,0, ale již při pH 9,0 bylo prokázáno významné snížení z důvodu deprotonace aminoskupin, při pH nižším než 8,0 se aminoskupiny opět protonují [23], [24], [25], [26].

Desorpce je způsobena nahrazením DNA fosfátovými ionty. Nejvyšší desorpce, bez ohledu na Hofmeisterovu iontovou řadu, byla prokázána při použití fosfátového pufru (85 %) a zvyšuje se inkubací při teplotách 80 °C. Při využití jiných, než fosfátových iontů je desorpce zanedbatelná. Kompletní desorpce však bylo dosaženo až s použitím dNTP. Při použití fosfátového pufru roste množství desorbované DNA i s rostoucí koncentrací protických rozpouštědel [4], [23], [24], [25].

2.2.3 Agregace DNA

Dlouhé řetězce DNA vykazují strukturní přechody za přítomnosti iontů a jiných polymerů ve vodných roztocích. Tento mechanismus však nebyl úplně prozkoumán a pochopen. V řadě prací byl zkoumán vliv molekulové hmotnosti a koncentrace polyethylenglykolu (PEG) na interakce mezi přechodem kulovitě-spirálového stavu DNA a tvorbou agregátů. Bylo zjištěno, že ve zředěných roztocích DNA obsahujících polyethylenglykol (PEG) a monovalentní soli (multivalentní kationty a kationtové povrchově aktivní látky – spermidin³⁺ a spermin⁴⁺) se náhodně stočené řetězce DNA spontánně změny do tvaru kuličky, pokud jsou koncentrace PEG a/nebo soli větší než kritické hodnoty. Ale v koncentrovaných roztocích DNA vytvářejí řetězce DNA agregáty (podlouhlé struktury), ve kterých jsou řetězce baleny paralelně. Tato struktura je považována za podobnou struktuře kapalného krystalu [27], [28], [29].

Bylo zjištěno, že při nízké koncentraci soli, se DNA nachází ve formě náhodných cívek (kuliček). Kritická koncentrace soli pro přechody do kulovitě-spirálového tvaru a agregátů klesá se zvyšující se molekulovou hmotností polyethylenglykolu a kuličky koexistují s agregáty, pokud je koncentrace DNA vyšší. Do určité kritické koncentrace DNA jsou řetězce DNA většinou ve formě kuliček a těžko tvoří agregáty. Přechod nastává, když interakce vyčerpání přesáhne hodnotu elektrostatických interakcí. Tento model však nevysvětluje experimentální fakt, že kuličky stabilně koexistují s agregáty při vysoké koncentraci soli, proto byl formulován další model, nerovnovážený, pro tvorbu kuliček a agregátů [28], [29].

Z mnoha experimentů plyne, že elektrostatické interakce jsou nezbytné zejména pro vysvětlení účinků valence a koncentrace iontů. Byl navržen model, který vysvětluje stabilitu struktur, která je dána „konkurencí“ vyčerpání a elektrostatických interakcí [19], [27], [28], [29].

2.2.4 Poly(ethylenglykol) – PEG

Polyethylenglykol (PEG) je polymerní hydrofilní neutrální látka o různé molekulové hmotnosti, jejíž základní jednotkou je ethylenglykol. Je netoxický, rozpustný v mnoha organických rozpouštědlech (dichlormethan, tetrahydrofuran atd) a ve vodných roztocích. Byl schválen pro využití v potravinářství a medicíně. Nachází se v běžně dostupných kosmetických přípravcích, mýdle nebo lécích. V přítomnosti chloridu sodného dehydratuje molekuly DNA a způsobuje jejich agregaci. Má velký význam v potravinářské chemii, kosmetice a farmacii [30].

2.3 Izolace rostlinné DNA

Rostliny, buď surové nebo zpracované, tvoří základ lidské stravy. Pro izolaci rostlinné DNA bylo vyvinuto několik metod. Žádný publikovaný postup však není univerzální pro všechny druhy rostlin z důvodu biochemické a morfologické rozmanitosti. Metody izolace je nutno upravovat pro každý rostlinný druh, případně i tkáň [31], [32], [33], [34]. Pro izolaci DNA je nejvhodnější čerstvý rostlinný materiál, jelikož jakákoli tepelná úprava (vaření, zahřívání, zmrazování a rozmrazování) může vést k degradaci DNA. Pro krátkou úschovu mohou být vzorky skladovány při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, pro delší je nutno využít kapalného dusíku a vzorky musí být skladovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nejlepší volbou jsou lyofilizované tkáně, které mohou být uschovány po dobu několika let s nízkou ztrátou kvality. Na kvalitu izolované DNA má vliv také chemické zpracování, stáří a druh rostlinného pletiva a v neposlední řadě správná homogenizace [35], [36], [37], [38].

Izolace rostlinné DNA zahrnuje řadu problémů z důvodu přítomnosti různých znečišťujících látek jako jsou polyfenoly, polysacharidy, RNA, třísloviny, alkaloidy, silice a proteiny [32], [39], [40]. Čím je DNA čistší, tím spolehlivější informace o ní dostaneme. Kontaminovaná DNA nedokáže poskytnout přesné a reprodukovatelné výsledky [35]. Rychlou a spolehlivou extrakci DNA z rostlin obsahujících sekundární metabolity, které snižují výtěžek extrakce DNA, zajišťuje použití lyzačního roztoku s CTAB (cetyl trimethylammonium bromid). Základní lyzační roztok CTAB obsahuje 2% CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA a 100 mM tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)-HCl. Postupně byl protokol modifikován a byly přidávány další látky k odstranění inhibitorů jako proteináza K, 2-merkaptoethanol, polyvinylpyrrolidon (PVP) a jiné [37], [41].

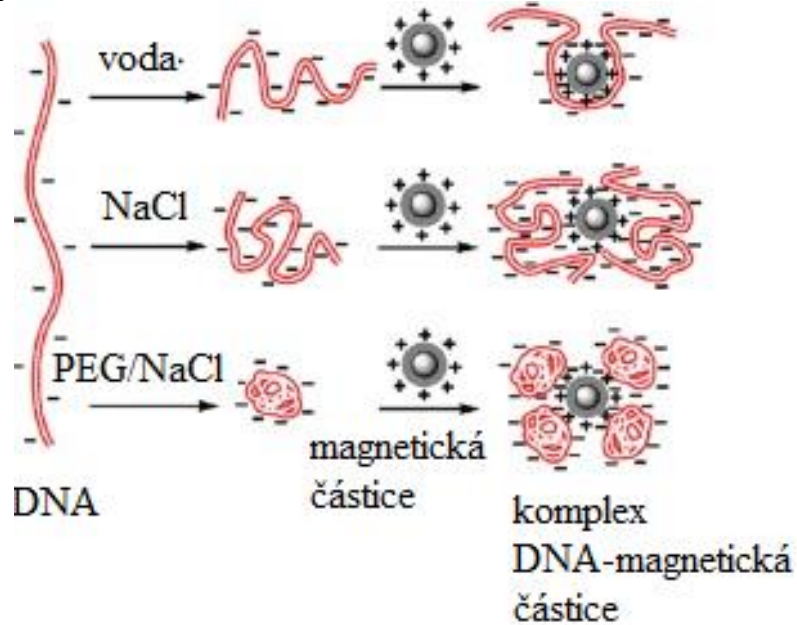
Polysacharidy ovlivňují viskozitu roztoku a mohou inhibovat aktivitu DNA polymerázy a restrikčních enzymů. K jejich odstranění se využívá vyšší koncentrace CTAB a solí (NaCl) [41]. Polyfenoly můžeme rozeznat na základě hnědého zbarvení, které vzniká díky oxidované formě kovalentně vázané na DNA. Pro odstranění polyfenolů je k lyzačnímu roztoku s CTAB přidáván polyvinylpyrrolidon (PVP) [33], [35], [42], [43]. Polysacharidy a polyfenoly při izolaci nevratně interagují s DNA a omezují využití izolované DNA pro PCR, restrikční analýzu a sekvencování inhibicí aktivity polymeráz a endonukleáz [44]. K deproteinaci, případně k odstranění pigmentů a barviv je využíván chloroform-oktanol v poměru 24:1. RNA můžeme odstranit srážením chloridem lithným nebo ji degradovat přídatkem RNázy, vzorek zbavujeme proteinů například přídatkem proteinázy K [45]. Pro přečištění DNA a zakoncentrování DNA do menšího objemu je využíván isopropanol [33], [41].

2.4 Magnetická separace DNA

Magnetická separace je využívána od 70. let minulého století, často v kombinaci s jinou separační metodou. Od té doby četnost jejího využití stále narůstá a v současné době patří k nejrozšířenějším metodám. Využívá se především v mikrobiologii, buněčné a molekulární biologii, lékařství, biochemii, biotechnologiích a ekologii. Oproti jiným, nemagnetickým, metodám má spoustu výhod, především omezuje možnosti kontaminace vzorku a mechanické namáhání vzorku a umožňuje automatizaci procesu.

Principem magnetické separace DNA je reverzibilní adsorpce DNA na magnetické nosiče. DNA se naváže na magnetické částice a vzniká komplex DNA-magnetická částice (Obrázek

1). Komplex je umístěn do magnetického pole, tím dočasně získá magnetický moment a může být odseparován od dalších molekul. Komplex je několikrát promyt, aby došlo k odstranění nežádoucích látek, které by mohly inhibovat PCR a magnetické částice jsou odseparovány pomocí magnetického separátoru. Schéma průběhu magnetické separace je znázorněno na Obrázku 2. Adsorpci DNA na magnetické nosiče ovlivňuje délka molekuly DNA, koncentrace použité soli, velikost a funkcionizace částic a další [46], [47], [48], [49], [50].



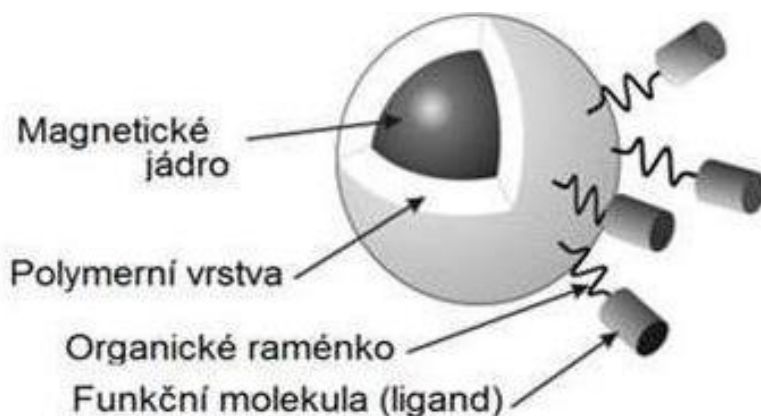
Obrázek 1 Schématické znázornění adsorpce DNA na magnetické částice. Upraveno dle [51].



Obrázek 2 Schéma průběhu magnetické separace DNA. Upraveno dle [52].

2.4.1 Vlastnosti magnetických částic

Při využití magnetických materiálů jsou důležité jejich vlastnosti – magnetizace, struktura, velikost, stupeň polydisperzity a další. Z praktického hlediska je nejvýhodnější kulový tvar částic o mikrometrové velikosti. Magnetické částice jsou tvořeny anorganickým magnetickým jádrem, ochranným polymerním pláštěm a funkčním povrchem (Obrázek 3).



Obrázek 3 Stavba magnetického nosiče. Převzato z [21].

Magnetické jádro je obvykle tvořeno oxidy železa magnetitem (Fe_3O_4 , $\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$) a maghemitem ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Nemají tak dobré magnetické vlastnosti jako třeba kobalt a nikl, ale nejsou toxické. Magnetické jádro musí vykazovat paramagnetické vlastnosti díky kterým v přítomnosti vnějšího magnetického pole vykazuje magnetické vlastnosti. Povrch částic je z polymerního materiálu a jeho úkolem je stabilizace částic, ochrana jádra před interakcemi s analytem a funkcionalizace povrchu. Běžně využívanými povrchovými materiály jsou polyethylenglykol (PEG), poly-L-mléčné kyseliny (PLA), oxid křemičitý (SiO_2) nebo polysacharidy. Povrchové materiály jsou diamagnetické a mohou být funkcionalizovány. Vhodný funkční povrch zajišťuje navázání cílové molekuly na magnetické částice. Mezi funkční skupiny patří aminové, karboxylové, ale také aldehydové a thiolové skupiny [50], [53], [54], [55], [56]. Využívané funkční skupiny a jejich vlastnosti jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1 Přehled funkčních skupin. Převzato z [55].

Funkční skupina	Vzorec	Vlastnosti	Cílové biomolekuly
Aminová	-NH ₂	Pozitivně nabité. Tvoří amidové vazby s -COOH.	proteiny, nukleové kyseliny
	-NHR		
	-NHR ₂		
Karboxylová	-COOH	Negativně nabité. Tvorba amidové vazby s -NH ₂ a esterové s -OH.	proteiny
Aldehydová	-CHO	Tvorba imidové vazby s -NH ₂ .	proteiny
Thiolová	-SH	Tvorba disulfidických můstků (-S-S-) s dalšími -SH skupinami.	proteiny obsahující cystin

2.4.1.1 Příprava magnetických částic

Pro přípravu magnetických částic bylo vyvinuto mnoho technik například srážení reaktantů, termický rozklad, chemická redukce v roztoku, syntéza aerosolu, hydrotermální syntéza, chemické napařování a další. Žádný způsob však není univerzální pro všechny typy částic [57], [58].

2.5 Polymerázová řetězová reakce

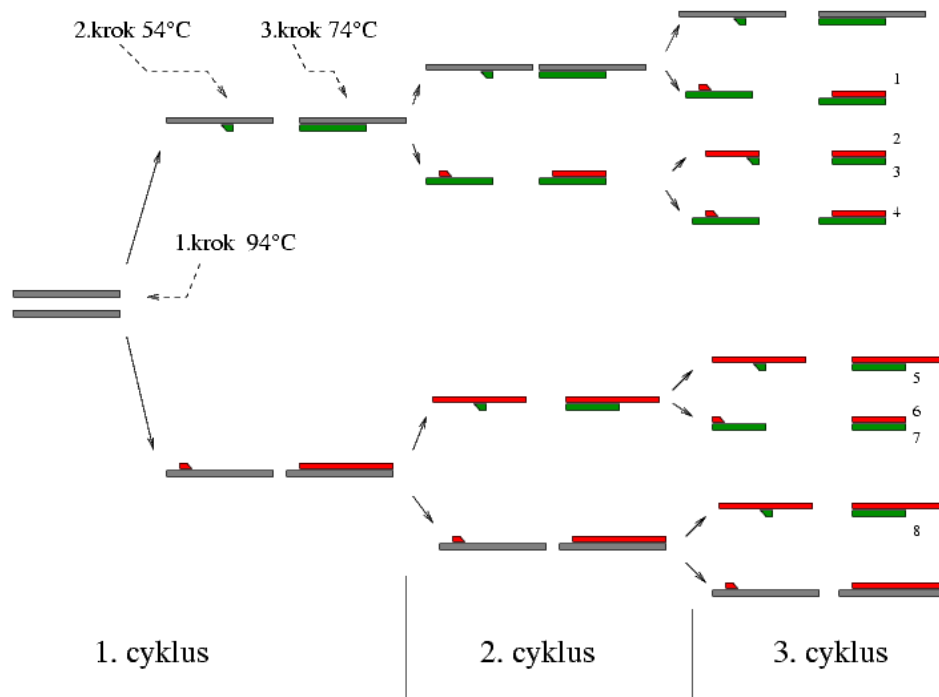
Zkratka PCR pochází z anglického překladu Polymerase Chain Reaction. Tato metoda byla jako laboratorní technika koncipována Karry Mullisem v roce 1983 (Nobelova cena za chemii), a poté automatizována pro rutinní využívání v laboratořích po celém světě. Díky citlivosti a specifitě má v dnešní době široké využití nejen ve výzkumu a lékařské diagnostice, ale i v dalších odvětvích, například při kontrole potravin. PCR umožňuje amplifikaci specifického úseku DNA, přičemž využívá obecných rysů replikace.

2.5.1 Konvenční PCR

Konvenční PCR probíhá v termocykleru. Jejím principem je cyklicky se opakující enzymatická syntéza určitého úseku DNA pomocí příslušné termostabilní DNA polymerázy v úseku vymezeném krátkými syntetickými oligonukleotidy (primery) [59], [60].

V závislosti na teplotě je cyklus složen ze tří opakujících se kroků (Obrázek 4):

- V prvním kroku je templát denaturován při teplotě 94–97 °C. Porušením vodíkových vazeb komplementárních bází dvouvláknové DNA (dsDNA) dochází k rozpletení na dva jednovláknové řetězce (ssDNA), na které mohou v dalším kroku nasedat primery.
- Reakční směs je ochlazená na 50–65 °C a primery se při hybridizují k odděleným řetězcům DNA na specifické sekvence. Vhodná teplota závisí na zastoupení A+T a G+C párů a na délce oligonukleotidu.
- Ve třetím kroku probíhá elongace, tedy syntéza nových řetězců DNA podle původního vlákna. Reakci katalyzuje termostabilní *Taq* DNA polymeráza, která umožňuje vytvoření požadované kopie sekvence DNA při teplotě 65–75 °C. DNA polymeráza musí být teplotně stabilní, jelikož v prvním kroku cyklu dochází k denaturaci DNA za vysoké teploty [59], [60], [61], [62].



Obrázek 4 Princip amplifikace v PCR. Převzato z [63].

Tento cyklus se opakuje v závislosti na množství přítomné DNA. Po 30 cyklech tak lze exponenciálně (2^n ; n = počet cyklů) vytvořit až 10^9 kopií vybraného úseku. Optimální počet cyklů závisí na kvalitě polymerázy a koncentraci templátové DNA – obvykle 25–35 cyklů. Výsledným produktem jsou amplikony definované délky o velikosti obvykle 100–1 000 párů bází (bp). Přítomnost amplikonů ve směsi bývá nejčastěji dokazována agarózovou gelovou elektroforézou, kde dochází k separaci fragmentů DNA na základě velikosti a náboje (kvalitativní stanovení). Vizualizace probíhá v UV světle po interakci s chemickými látkami (například ethidium bromidem nebo dalšími interkalujícími barvivy) [9], [59], [61], [64].

2.5.1.1 Komponenty pro přípravu PCR směsi

Reakční směs pro PCR má obvykle objem 25–100 μ l. Ke správnému průběhu reakce je nutná přítomnost těchto komponent:

- **Voda pro PCR** se využívá k doplnění PCR směsi na požadovaný objem. Nesmí obsahovat specifické ionty, organické látky a musí být sterilní. Nejvhodnější je voda pro injekce ČSL 4.
- **PCR pufr** je využíván k vytvoření správného pH prostředí pro DNA polymerázu. Do pufru jsou přidávány Mg^{2+} ionty, které jsou kofaktorem DNA polymerázy, ovlivňují specifitu i výtěžek PCR a udržují enzymatickou aktivitu DNA polymerázy. Koncentrace Mg^{2+} iontů je pro každé primery jiná, proto je obvykle dodávána výrobcem společně s polymerázou. PCR pufr obvykle obsahuje 10 mM Tris-HCl (pH 8,3–8,8), 50 mM KCl a 1,5 mM $MgCl_2$.
- **2'-deoxynukleosid-5'-trifosfáty (dNTP)** jsou směsí všech čtyř deoxyribonukleotidů (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), které slouží jako stavební kameny pro syntézu nového

řetězce DNA. Optimální koncentrace je 200 μM . Vysoká koncentrace působí inhibičně, jelikož vyvazuje hořčnaté ionty.

- **Primery** jsou krátké synteticky připravené oligonukleotidy komplementární k sekvencím ohraničujícím amplifikovaný úsek DNA templátu. Teplota tání primerů by měla být přibližně stejná a pohybuje se v rozmezí 55–80 °C v závislosti na délce oligonukleotidového řetězce a obsahu GC. Při této teplotě dochází k připojení primerů k DNA templátu. Primery nejčastěji obsahují 40–60 % G+C párů a 18–30 nukleotidů. Optimální koncentrace jednoho primeru v reakci je 0,1–0,6 μM .
- **Termostabilní DNA polymeráza** je enzym, který syntetizuje novou DNA ve směru 5' → 3' podle sekvence nukleotidů v DNA templátu od 3' konce primeru.
- **Templát (DNA matrice)** je makromolekula DNA, podle které jsou komplementárně syntetizovány nové řetězce DNA. Obsahuje cílová místa pro primery. Amplifikována bývá i ne příliš čistá DNA [59], [61], [64], [65].

2.5.2 PCR v reálném čase

PCR v reálném čase je metoda založená na konvenční PCR. Reakce probíhá ve speciálním termocykleru, který umožňuje měření fluorescence. Jelikož je zde mimo kvality možnost stanovit i kvantitu, je tato metoda označována jako kvantitativní PCR (qPCR). Hlavní rozdíl spočívá v tom, že po skončení konvenční PCR jsou produkty detegovány elektroforeticky, zatímco real-time PCR umožňuje sledování množství amplikonů v každém cyklu v průběhu reakce pomocí fluorescenčních látek – fluorescenčních barviv, primerů nebo sond. Intenzita fluorescenčního signálu se měří v každém cyklu PCR a je přímo úměrná množství amplikonů přítomných v reakční směsi [14], [50], [60], [66], [67].

Interkalační barvivo SYBR Green I se váže do malého žlábků dvouřetězcové DNA a se zvyšujícím se množstvím amplikonů roste i množství barviva. Vazba není sekvenčně specifická a SYBR Green I se váže i na nespecifické produkty PCR nebo dimery primerů. Fluorescenčně značené sondy jsou jednořetězcové DNA o délce asi 30 bází a jsou komplementární k té části templátové DNA, která se nachází mezi primery, a mají vyšší hodnotu teploty tání (T_m) asi o 10 °C, než je T_m primerů. Na jednom konci sondy (5' konec) je navázán fluorochrom a na druhém (3' konec) zhášecí pohlcující fluorescenci. Zhášecí je v blízkosti fluorochromu a díky tomu pohlcuje fluorescenci emitovanou fluorescenční látkou. Během amplifikace dochází k odbourání sondy aktivitou specifické *Taq* DNA polymerázy. Když dojde k odbourání sondy, nedochází již ke zhášení fluorescenčního barviva, ale k emisi fluorescence. Sondy detegují výhradně specifické produkty, ale jsou drahé a jejich optimalizace je komplikovaná. Fluorescenčně značené primery fungují na podobném principu jako fluorescenčně značené sondy [14], [60], [66], [67].

Kvantifikace se provádí matematickou analýzou tzv. amplifikačních křivek vzniklých vynesemím naměřené fluorescence proti pořadovému číslu příslušného cyklu. Křivky jsou složeny ze třech částí – fáze pozadí, exponenciální fáze, plató fáze. Nejdůležitějším bodem amplifikační křivky je C_t („threshold cycle“). Tato hodnota odpovídá cyklu, při kterém byla překročena měřitelná fluorescence od pozadí. Hodnota C_t je zařazena do exponenciální fáze a platí, že čím vyšší je počáteční koncentrace templátu v reakční směsi, tím dříve je detegována zvyšující se fluorescence produktu, a tím nižší je hodnota C_t produktu. [14], [60], [68], [67].

Metoda absolutní kvantifikace se odvíjí od lineárního vztahu mezi logaritmem výchozího počtu templátových kopií N_0 a hodnotou C_t příslušné amplifikační křivky a umožňuje přímé stanovení výchozího počtu kopií cílové DNA. Výchozí koncentraci můžeme zjistit porovnáním s kalibrační přímkou, kterou získáme amplifikací série standardů o známé koncentraci DNA [69].

2.5.3 Inhibitory PCR

PCR je citlivá metoda, která vyžaduje práci ve sterilním prostředí [59]. DNA izolovaná z reálných vzorků může obsahovat inhibitory PCR. Jejich přítomnost ovlivňuje citlivost metody, případně může způsobit falešně negativní výsledky. Mechanismus působení inhibitorů je různý. Mohou se adsorbovat ze stěny nádob, ve kterých probíhá extrakce DNA, reagují s nukleovými kyselinami a ovlivňují enzymatickou funkci nebo degradují DNA polymerázu [70], [71].

Inhibitory jsou chemické látky různé povahy. Typickým příkladem anorganických látek jsou ionty vápníku, ale většina známých inhibitorů jsou organické sloučeniny (například žlučové soli, močovina, ethanol, huminové kyseliny a další (Tabulka 2)) [70]. Jejich přítomnost je dána buď povahou vzorku nebo mohou být do PCR směsi přeneseny během zpracování a manipulace se vzorkem. Jedna určitá matrice může obsahovat mnoho různých inhibičních látek a stejné inhibitory můžeme najít v mnoha různých matricích. Přítomnost inhibitorů lze eliminovat výběrem vhodné metody izolace DNA, případně ředěním, čímž se ale sníží koncentrace DNA a může dojít ke snížení citlivosti PCR. Pro odstranění inhibitorů během přípravy vzorků bylo vyvinuto několik postupů, nicméně v komplexních vzorcích nelze zaručit jejich nepřítomnost [37], [72], [73].

Tabulka 2 Seznam některých inhibitorů PCR a možnosti jejich eliminace. Převzato z [37].

Inhibitory	Minimalizace inhibice
CTAB	Promytí 70% ethanolem.
EDTA	Snížení koncentrace EDTA nebo Tris-HCl.
Ethanol	Vysušení vzorku a resuspendace.
Tuky	Přídavek lipázy nebo hexanu. Případně použití chloroformové extrakce.
Isopropanol	Vysušení vzorku a resuspendace.
Fenol	Použití PVP, PVP/acetátu amonného.
Polysacharidy	CTAB roztok a extrakce chloroformem.
Proteiny	SDS, CTAB, proteináza K
SDS	Promytí 70% ethanolem.
Octan sodný	Promytí 70% ethanolem.
NaCl	Promytí 70% ethanolem.

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo testovat využití magnetických mikro- a nanočástic pro izolaci DNA v kvalitě vhodné pro PCR z tepelně upravených potravinových výrobků pro děti. Celkem bylo analyzováno 6 výrobků pro děti a zelenina a ovoce (5 druhů), které byly použity pro jejich přípravu. K tomu bylo testováno:

- Příprava homogenátů a izolace DNA pomocí magnetických mikro- a nanočástic z vybrané zeleniny, ovoce a z potravinových výrobků pro děti.
- Srovnání separace magnetických mikro- a nanočástic s navázanou DNA s využitím magnetického separátoru a magnetické jehly.
- Amplifikace izolované DNA z výrobků pro dětskou výživu pomocí PCR.
- Průkaz specifity produktů PCR.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Rostlinný materiál

K izolaci rostlinné DNA byla použita zelenina a ovoce vypěstované na zahrádce, případně zakoupené v běžné komerční síti. Izolace byla provedena z kořene mrkve (*Daucus carota*) a dužiny plodu hrušky (*Pyrus communis*), plodu jablka (*Malum domestica*), plodu citronu (*Citrus limon*) a plodu manga (*Mangifera indica*). Vzorčky byly skladovány při 8 °C.

4.1.2 Výrobky

K izolaci DNA z výrobků byly použity potravinové výrobky pro děti běžně dostupné a zakoupené v komerční síti: Hami první mrkvička; dmBio hruška, mrkev, jablko; Nestlé ovocná kapsička; Hamánek Svačinka s meruňkami; Hello ovocná přesnídávka s jablky a Hello ovocná přesnídávka s mangem (Obrázek 5). Složení a popis všech použitých výrobků jsou uvedeny v Tabulce 3. Po otevření byly výrobky skladovány při 8 °C.



Obrázek 5 Hami – První Mrkvička; dmBio hruška, mrkev, jablko; Nestlé ovocní kapsička; Hamánek svačinka s meruňkami; Hello ovocná přesnídávka s jablky; Hello ovocná přesnídávka s mangem.

Tabulka 3 Použité potravinové výrobky pro děti, jejich popis a složení

	Název výrobku	Popis	Složení výrobku
1	Hami první mrkvička	Zelenina vařená v páře, bez přidané soli. Bez lepku.	Mrkev 90 %, voda.
2	dmBio hruška, mrkev, jablko	Ovocno-mrkvový příkrm v sáčku od 1. roku věku dítěte. Určeno pro zvláštní výživu kojenců a malých dětí. Neobsahuje lepek. Bez přídavku: cukru, mléka, mléčných složek a zahušťujících látek. Sterilováno.	Jablečné pyré 60 %, hruškové pyré 20 %, mrkvové pyré 20 %, koncentrát citronové šťávy z biologického zemědělství. Obsahuje přirozeně se vyskytující cukr.
3	Nestlé ovocná kapsička	Ovocno-zeleninová přesnídávka. Pasterovaná. Od ukončení 6. měsíce. Bez přídavku cukrů. Bez konzervantů. Bez lepku.	Jablečné pyré 49,9 %, mrkvové pyré 30 %, pyré z manga 20 % z koncentrátu, citronová šťáva z koncentrátu, vitamin C. Obsahuje přirozeně se vyskytující cukry.
4	Hamánek Svačinka s meruňkami	Zpracované ovoce. Ovocné protlaky – směsi, neslazené. Bez přidaného cukru. Ovocný příkrm od dokončeného 4. měsíce. Sterilováno. Bez lepku.	Jablka 80 % hm., meruňky 20 % hm., antioxidant kyselina askorbová. Ve 100 g výrobku je obsaženo 12 g přírodních sladidel.
5	Hello ovocná přesnídávka s jablky	Zpracované ovoce. Ovocný protlak jednodruhový slazený. Příkrm je určený pro děti od dokončeného 4. měsíce. Sterilováno. Neobsahuje lepek.	Jablečná dřev 85 % hm., voda, cukr, modifikovaný škrob E 1422, antioxidant: kyselina askorbová, vitamin C.
6	Hello ovocná přesnídávka s mangem	Zpracované ovoce. Ovocný protlak smíšený slazený. Příkrm je určený pro děti od dokončeného 8. měsíce. Sterilováno. Neobsahuje lepek.	Ovoce 85 % hm. (jablečná dřev 52 % hm., mangová dřev 33 % hm.), voda, cukr, modifikovaný škrob E 1422, antioxidant: kyselina askorbová, vitamin C.

4.1.3 Chemikálie

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

- Ethanol (Penta, Chrudim)
- Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Chloroform (PENTA, Praha, ČR)
- Kyselina boritá (PENTA, Praha, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (PENTA, Praha, ČR)
- Cetyl triethylamonium bromid (CTAB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- β -merkapt ethanol (2-ME) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- Chlorid sodný (PENTA, Praha, ČR)
- Polyethylenglykol 6 000 (PEG 6 000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Isopropanol (PENTA, Praha, ČR)
- Octan sodný 3M (PENTA, Praha, ČR)
- Polyethylenglykol 6 000 (PEG 6 000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- DNA *Nicotiana tabacum* (RNDr. A. Kovařík, CSc.)
- DNA *Lactobacillus casei* (doc. RNDr. A. Španová, CSc.)
- DNA *Brasica oleracea* (RNDr. A. Kovařík, CSc.)
- Agaróza pro elektroforézu DNA (Serva, Heidelberg, SRN)
- Midori Green Advanced DNA Stain (*E. coli*, Bratislava, SR)
- Nanášecí pufr Yellow load (Top-Bio, Praha, ČR)
- DNA standard 100 bp žebříček (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- Ethidium bromide 5 ng/ml (Top-Bio, Praha, ČR)

4.1.4 Magnetické částice

Pro práci byly použity magnetické mikročástice PGMA a magnetické nanočástice PLL, syntetizované Ing. D. Horákem, CSc. na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i. v Praze. Vlastnosti nosičů jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 4 Vlastnosti magnetických polymerních mikročástic PGMA a magnetických nanočástic PLL

Polymer	c [mg/ml]	Fe [% hm]	Průměr nosiče [μ m]	PDI	Funkcionalizace
PGMA	2	5,36	0,7	1,16	0,67 -COOH [mM/g]
PLL/F79	0,2	4	0,007	0,52	poly(L-lysine)

PGMA – polyglycidyl methakrylát, PLL – poly(L-lysine), PDI – index polydisperzity (poměr hmotnosti a počtu nosičů o průměrné velikosti)

4.1.5 Komponenty pro PCR

- Voda pro PCR (Top-Bio, Praha, ČR)
- 10x koncentrovaný PCR Blue Buffer kompletní (Top-Bio, Praha, ČR)
- PCR pufr kompletní (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery: 18S_for, 5,8S_rev, ZD_for, ZD_rev, 26S_for, 26S_rev (GENERI BIOTECH, Hradec Králové, ČR) – Tabulka 5
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Směs dNTP (10 mM) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Taq polymeráza 5 U/μl (Top-Bio, Praha, ČR)
- Taq polymeráza 1.1 (1 U/μl) (Top-Bio, Praha, ČR)
- LA polymeráza 5 U/μl (Top-Bio, Praha, ČR)

Tabulka 5 Použité primery 18S_for, 5,8S_rev, ZD_for, ZD_rev, 26S_for, 26S_rev.

Specifická PCR	Primer	Sekvence 5'–3'	Velikost produktu PCR [bp]	Citace
Rostlinná DNA	18S_for	GCG CTA CAC TGA TGT ATT CAA C GA G	700	[74]
	5,8S_rev	CGC AAC TTG CGT TCA AAG ACT C GA		
	ZD_for	RNDr. A. Kovařík, CSc. nepublikované výsledky	350	
	ZD_rev	RNDr. A. Kovařík, CSc. nepublikované výsledky		
	26S_for	GAA TTC ACC CAA GTG TTG GGA T	220	[74]
	26S_rev	AGA GGC GTT CAG TCA TAA TC		

4.1.6 Přístroje a pomůcky

- Centrifuga MINI Spin 14 500 ot/min (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Centrifuga Spectafuge Mini (Labnet Int., New Jersey, USA)
- Laboratorní váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New Jersey, USA)
- Magnetický separátor Dyna Mag (Invitrogen, Oslo, Norsko)
- Mikropipety Discovery HTL, objem 10, 20, 200 a 1 000 μl (PZ HTL, Varšava, Polsko)
- Mikrovlnná trouba SMW 2 320 (Sencor, ČR)
- Spektrofotometr NanoDrop 2 000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA)
- Termostat BT 120 (Praha, ČR)
- Thermal cycler DNA Engine (BIO-RAD Lab, USA)
- Thermocycler Minicycler™ (BIO-RAD Lab, USA)
- Transiluminátor TVR 3 121 (Spectroline, Albany, USA)
- Zařízení pro elektroforézu Easy (Owl Scientific, USA)
- Zdroj el. napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet Int., Woodbridge, USA)
- Eppendorfovy zkumavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Běžné laboratorní sklo, pomůcky (kopisty, skalpel, buničina), špičky z umělé hmoty

4.1.7 Roztoky

Většina roztoků byla připravena dle návodů z Analýzy vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie [59].

4.1.7.1 Roztoky pro izolaci a purifikaci rostlinné DNA

- **0,5 M EDTA, pH 8,0** – 186,1 g EDTA bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody za současného zahřívání na 68 °C. pH bylo upraveno na 8,0, roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 1 l a sterilizován v autoklávu (121 °C/20 min).
- **1 M Tris-HCl, pH 7,8** – 120,1 g Tris-báze se rozpustilo v 70 ml destilované vody a pH bylo upraveno na 7,8. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 100 ml a sterilizován (121 °C/20 min).
- **TE pufr, pH 7,8** – roztok byl připraven sterilně z 1 ml zásobního roztoku 1 M Tris-HCl (pH 7,8), 200 µl zásobního roztoku 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 98,8 ml destilované vody.
- **Směs chloroform-oktanol** – roztoky chloroformu a oktanolu byly smíchány v poměru 24:1.
- **70% ethanol** – bylo smícháno 70 ml 96% ethanolu s 26 ml destilované vody.
- **Roztok NaCl (5 M)** – Navážka 87,66 g NaCl byla rozpuštěna v 300 ml destilované vody.
- **Roztok 40% PEG 6 000** – navážka 40 g PEG 6 000 byla rozpuštěna v 60 ml destilované vody. Objem byl doplněn na 100 ml destilovanou vodou.
- **Lyzační roztok CTAB 3%** – 1,6 g cetyl triethylamonium bromidu byl rozpuštěn v 10 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 8,0), 16 ml 5 M NaCl, 2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 42 ml destilované vody. Připraveno Dr. A. Kovaříkem, CSc.

4.1.7.2 Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu

- **0,5x koncentrovaný TBE pufr** – 54 g Tris-báze a 27,5 g kyseliny borité bylo rozpuštěno v 600 ml destilované vody. Poté bylo přidáno 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a doplněno destilovanou vodou do 1 l. Před použitím byl TBE pufr 10x vyředěn na výslednou koncentraci.
- **Agarózový gel (1,2%)** – 0,85 g (1,2 g; 1,44 g; 1,68 g) agarózy byla rozvařeno v 70 ml (100 ml; 120 ml; 140 ml) 0,5x koncentrovaného TBE pufru.
- **Nanášecí pufr Yellow load (6x koncentrovaný, obsahuje barvivo orange G)** – roztok byl před použitím smíchán se vzorkem DNA v poměru 1:5.
- **DNA standard, 100 bp žebříček** – obsahuje fragmenty délky 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1 000, 1 200 a 1 500 bp.
- **Barvicí lázeň** – 100 µl roztoku ethidiumbromidu (2,5 mg/ml) bylo zředěno 500 ml destilované vody.

4.2 Metody

4.2.1 Příprava vzorků pro analýzu

4.2.1.1 Rostlinný materiál

Rostlinný materiál (mrkev, hruška, jablko, citron, mango) byl očištěn a otřen ethanolem, sterilním skalpelem nakrájen na malé kousky a do 1,5 ml Eppendorfových zkumavek bylo naváženo 0,1–0,5 g (mrkev) a 0,2 g (mrkev, hruška, jablko, citron, mango). Vzorky byly obvykle naváženy ve dvou, čtyřech nebo osmi opakováních.

4.2.1.2 Výrobky

Do 2 ml Eppendorfových zkumavek bylo napipetováno a odváženo 0,5 g výrobku ve čtyřech nebo v šesti opakováních.

4.2.2 Příprava homogenátů

4.2.2.1 Homogenizace lyzačním roztokem s CTAB a merkptoethanolem

K rostlinnému materiálu bylo přidáno 500 μ l 3% lyzačního roztoku CTAB a 2 μ l merkptoethanolu (2-ME). Ve vymraženém termobloku byla provedena homogenizace pomocí kopistu. Směsi byly dány inkubovat na 30 minut při 60 °C, poté byly promíchány a centrifugovány 5 minut při 14 500 ot/min. Po separaci byl z každé směsi odebrán supernatant pro izolaci DNA magnetickými částicemi a uschován při teplotě –20 °C.

4.2.2.2 Přídavek chloroform-oktanolu

Dle postupu v kapitole 4.2.2.1 bylo po inkubaci k 500 μ l 3% lyzačního roztoku CTAB a 2 μ l merkptoethanolu přidáno 500 μ l chloroform-oktanolu (24:1). Směsi byly homogenizovány 2 minuty při laboratorní teplotě a centrifugovány 5 minut při 14 500 ot/min. Poté byl odebrán supernatant pro izolaci DNA magnetickými částicemi nebo magnetickou jehlou a uschován při teplotě –20 °C.

4.2.2.3 Přečištění isopropanolem

Dle postupu v kapitole 4.2.2.2 byla po přidavku 500 μ l chloroform-oktanolu (24:1) a centrifugaci při 14 500 ot/min 5 minut odebrána vodná fáze s DNA, ke které bylo přidáno 0,6 objemu isopropanolu. Směs byla promíchána a ponechána 5 minut inkubovat při laboratorní teplotě a poté byla centrifugována 10 minut při 14 500 ot/min. Následně byl slit supernatant, sediment DNA promyt 500 μ l 70% ethanolu a směs byla centrifugována 5 minut při 14 500 ot/min. Opět byl slit supernatant, sediment vysušen v exsikátoru a rozpuštěn ve 100 μ l TE pufru (pH 7,8). DNA byla použita jako matrice pro PCR, případně ponechána pro izolaci DNA magnetickými částicemi a uschována při teplotě –20 °C.

4.2.3 Izolace DNA pomocí magnetických mikro- a nanočástic

K izolaci rostlinné DNA byly použity magnetické mikročástice PGMA o koncentraci 2 mg/ml a magnetické nanočástice PLL o koncentraci 0,2 mg/ml. Byly připraveny separační směsi, jejichž přesné složení a pořadí přidání komponent je uvedeno v Tabulce 6. Výsledná koncentrace PEG 6 000 byla 16% a výsledná koncentrace NaCl byla 1,5 M. Směsi byly ponechány inkubovat 15 minut při laboratorní teplotě.

Tabulka 6 Komponenty na přípravu separačních směsí pro izolaci DNA.

	Komponenta	0,1–0,4 g rostlinného materiálu
1	NaCl (5 M)	150
2	Lyzát buněk (DNA)	100
3	PEG 6 000 (40%)	200
4	magnetické částice	50
Výsledný objem (μl)		500

4.2.3.1 Separace částic pomocí magnetického separátoru

Po inkubaci proběhla separace částic s navázanou DNA pomocí magnetického separátoru 5 minut a byl odebrán supernatant. Magnetické částice s navázanou DNA byly promyty 500 μl 70% ethanolu a opět separovány magnetem 5 minut. Po odebrání supernatantu byly Eppendorfovy zkumavky vysušeny při laboratorní teplotě a DNA z magnetických částic eluována do 100 μl TE pufru po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Poté byly magnetické částice odseparovány a DNA byla uschována při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.3.2 Separace částic pomocí magnetické jehly

Po inkubaci proběhla separace částic s navázanou DNA magnetickou jehlou. Magnetické částice s navázanou DNA byly odseparovány nejprve do 500 μl 70% ethanolu (promytí), a poté do 100 μl TE pufru. Eluce DNA probíhala 15 minut při laboratorní teplotě a DNA byla uschována při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.4 Zakoncentrování izolované DNA

Ke 400 μl DNA bylo přidáno 20 μl 3 M octanu sodného a 1 ml 96% ethanolu vychlazeného na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. DNA byla srážena při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ asi 15 minut a směs poté centrifugována 10 minut při 14 500 ot/min. Supernatant byl opatrně slit, sediment vysušen v exsikátoru asi 10 minut a DNA byla rozpuštěna v 50 μl TE pufru.

4.2.5 Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA

Na spektrofotometru NanoDrop 2 000 byla měřena absorbance při vlnových délkách 230–320 nm. Byla odečtena hodnota poměru absorbance při vlnových délkách 260 nm/280 nm a 260 nm/230 nm. Z hodnoty absorbance $A_{260\text{ nm}}$ byla vypočtena koncentrace DNA a z poměrů hodnot $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ a $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ byla určena čistota vzorku DNA.

Čočka byla 2x očištěna destilovanou vodou (2x 2 μl) a na očištěnou čočku byly nanесeny 2 μl TE pufru jako blank, poté byly postupně nanášeny 2 μl řádně promíchaných vzorků DNA. Po provedení měření byla čočka přístroje opět očištěna 2x destilovanou vodou (2x 2 μl).

4.2.6 Ověření kvality izolované DNA metodou PCR

Izolovaná DNA neředěná (u některých vzorků i 10x ředěná a 100x ředěná) byla použita na PCR. Jednotlivé složky PCR směsi byly nejprve dobře promíchány a centrifugovány, a poté byla připravena směs Master Mix pro počet vzorků o jeden větší. Komponenty byly

míchány v množství a pořadí dle Tabulky 7. Směsi pro PCR se lišily množstvím a typem primerů a polymerázy.

Byla připravena negativní kontrola, kde místo 2 μl matrice byly použity 2 μl vody pro PCR a pro pozitivní kontrolu byla použita DNA buď *N. tabacum* nebo *B. oleracea* (1 ng/ μl). Následně byla provedena polymerázová řetězcová reakce dle programů uvedených v Tabulkách 8 a 9. V Tabulce 10 jsou uvedeny teploty hybridizace testované v programech ZDGRA a ZDŽ1. Produkty PCR byly detegovány pomocí agarózové gelové elektroforézy.

Tabulka 7 Komponenty na přípravu PCR směsí (I–IV) pro konvenční PCR

	Komponenta	I	II	III	IV
		1x [μl]	1x [μl]	1x [μl]	1x [μl]
1	Voda pro PCR	16,5	17,5	18,8	18,1
2	Reakční pufr kompletní	2,5	2,5	2,5	2,5
3	DMSO	–	–	–	0,5
4	Primer 1	1,0	0,5	0,5	0,5
5	Primer 2	1,0	0,5	0,5	0,5
6	Směs dNTP	1,0	1,0	0,5	0,5
7	DNA <i>Taq</i> polymeráza 1.1	1,0	1,0	–	–
8	DNA <i>Taq</i> polymeráza 5 U	–	–	0,2	–
9	LA polymeráza 5 U	–	–	–	0,4
10	DNA templát	2	2	2	2
Výsledný objem (μl)		25	25	25	25

Tabulka 8 Programy PCR

	Program	700 ROST		52 ROST		220RO40	
	Krok	T [$^{\circ}\text{C}$]	t [s]	T [$^{\circ}\text{C}$]	t [s]	T [$^{\circ}\text{C}$]	t [s]
1	Počáteční denaturace	95	300	95	600	95	300
2	Denaturace	95	40	95	40	95	40
3	Hybridizace primerů	57	40	52	40	57	40
4	Syntéza DNA	72	80	72	80	72	80
5	Opakování	34x opakovat od kroku č. 2		34x opakovat od kroku č. 2		39x opakovat od kroku č. 2	
6	Poslední cyklus	72	600	72	600	72	600
7	Chlazení	10	∞	10	∞	10	∞

Tabulka 9 Programy PCR II

	Program	ZDGRA	ZD21	350 ROST	t [s]
	Krok	T [°C]	T [°C]	T [°C]	
1	Počáteční denaturace	94	94	94	600
2	Denaturace	94	94	94	30
3	Hybridizace primerů	50–60	50–70	60	30
4	Syntéza DNA	72	72	72	30
5	Opakování	29x opakovat od kroku č. 2		34x opakovat od kroku č. 2	
6	Poslední cyklus	72	72	72	300
7	Chlazení	10	10	10	∞

Tabulka 10 Teploty hybridizace testované v programech ZDGRA a ZD21 (gradienty).

Komůrka č.	Množství DNA* [ng] / PCR směs	ZDGRA	ZD21
		T [°C]	T [°C]
1	2	50,0	50,0
2		50,3	50,5
3		50,9	51,7
4		51,7	53,2
5		52,8	55,5
6		54,3	58,4
7		56,0	61,8
8		57,4	64,6
9		58,5	66,8
10		59,3	68,4
11		59,8	69,6
12		60,0	70,0

*Jako DNA matrice byla použita DNA *N. tabacum* 1 ng/μl, *B. oleracea* 1 ng/μl a *L. casei* 1 ng/μl.

4.2.7 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR

Byl připraven 1,2% agarózový gel (0,48 g agarózy a 40 ml 0,5x TBE pufru, 0,85 g agarózy a 70 ml 0,5x TBE pufru, 1,2 g a 100 ml 0,5x TBE pufru, 1,44 g agarózy a 120 ml 0,5x TBE pufru nebo 1,68 g agarózy a 140 ml 0,5x TBE pufru). Po zchlazení byl do gelu přimíchán 1 μl fluorescenčního barviva Midori Green Advanced DNA Stain. Gel byl nalit do elektroforetické vaničky s hřebínkem, ponechán 30 minut tuhnout, a poté byl hřebínek opatrně vyjmut. Vzorky

byly do komůrek nanášeny spolu s nanášecím pufrem. Každých 25 μl PCR produktů bylo smícháno s 5 μl nanášecího pufru a do komůrek na ztuhlém gelu bylo naneseno celých 30 μl této směsi. Poté byl gel opatrně vložen do elektroforetické vany, zalit 0,5x TBE pufrem asi 5 mm nad povrch gelu a zapojen zdroj tak, aby záporně nabitá DNA migrovala od katody k anodě.

Podmínky gelové elektroforézy byly nastaveny podle velikosti použité vany:

- malá vana při 60 V asi 1,5 hodiny a při 70 V asi 1 hodinu a 15 minut,
- střední vana při 60 V asi 2 hodiny a při 70 V asi 1 hodinu a 45 minut,
- velká vana při 60 V asi 2,5 hodiny a při 70 V asi 2 hodiny a 15 minut.

Po skončení elektroforézy byl gel dán na transiluminátor a vyhodnocen v UV světle při vlnové délce $\lambda = 305 \text{ nm}$. V případě potřeby byl gel dobarvován v roztoku ethidium bromidu. Gel byl dokumentován fotograficky pomocí fotoaparátu zabudovaném v mobilním telefonu Lenovo Vibe P1.

4.2.8 Restrikční analýza produktů PCR

Produkty PCR byly štěpeny restriktázami *NlaIII* a *EcoRV*. Komponenty pro restrikční štěpení byly smíchány v množství uvedeném v Tabulce 11. Reakce probíhala při 37 °C min. 2 hodiny. Produkty restrikčního štěpení byly smíchány s 5 μl nanášecího pufru a detegovány pomocí agaróзовé gelové elektroforézy na 1,2% gelu.

Tabulka 11 Komponenty pro restrikční analýzu PCR produktů

	Komponenta	1x [μl]
1	Produkt PCR	5
2	Restrikční pufr	2
3	Voda pro PCR	12,5
4	Restrikční enzym	0,5
Výsledný objem (μl)		20

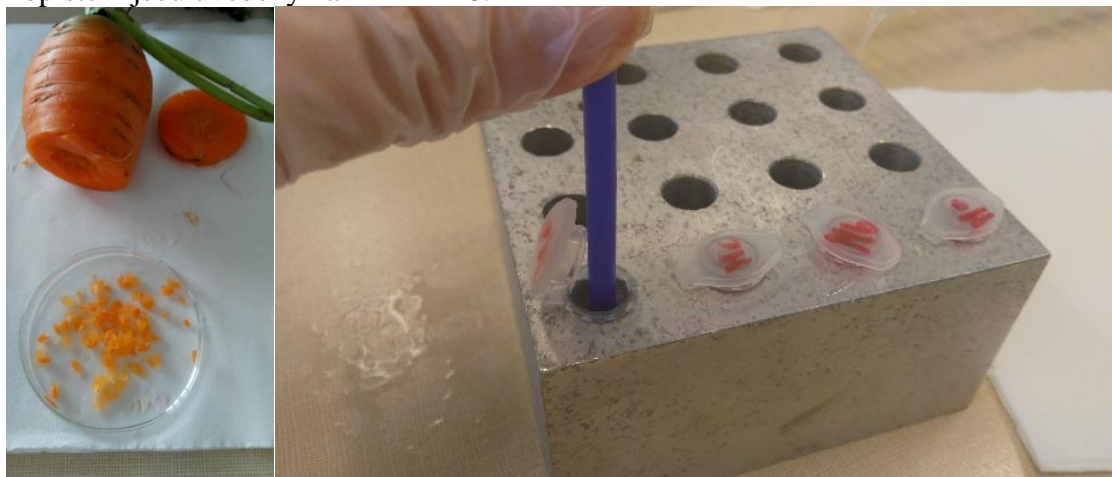
4.2.9 Bioinformační analýza

Se sekvencí ampliconu získanou od RNDr. Kovaříka, CSc. byla provedena RFLP (restriction fragment length polymorphism), která probíhala v programu Nebcutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) *in silico*. Sekvence byla zkopírována do okna a příkazem *search restriction size* byly nalezeny vhodné restrikční endonukleázy štěpící fragment DNA v oblasti ITS1, která je variabilní, díky čemuž můžeme na základě štěpených produktů identifikovat DNA.

5 VÝSLEDKY

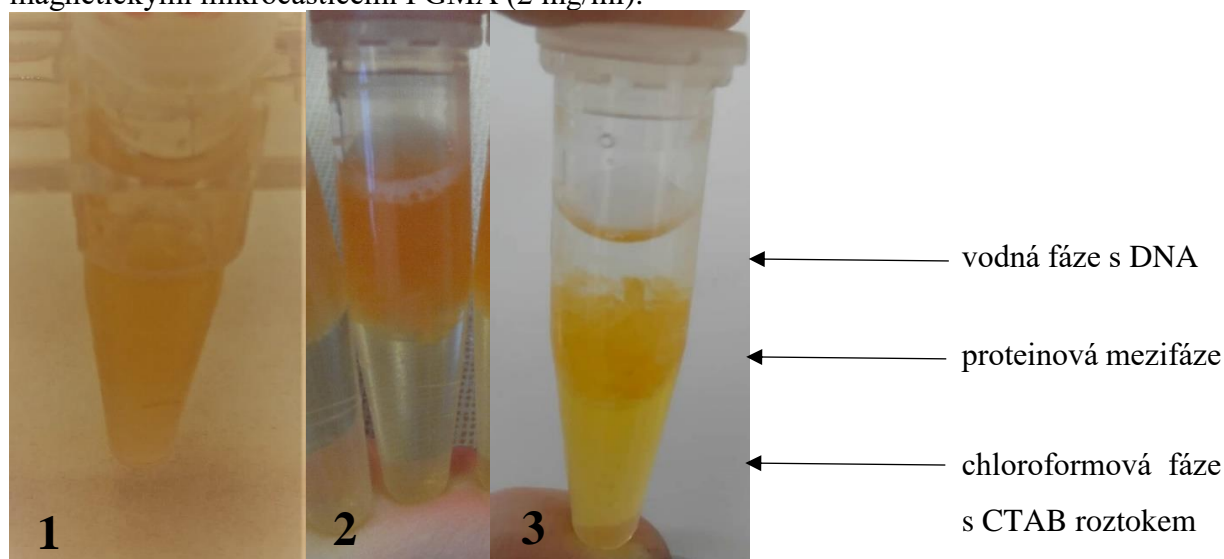
5.1 Izolace DNA z kořene mrkve magnetickými mikročásticemi PGMA

Byly připraveny vzorky pro analýzu z různého množství kořene mrkve dle kapitoly 4.2.1.1 (0,1 g, 0,2 g, 0,3 g a 0,4 g), každý ve čtyřech opakováních. Příprava vzorku a homogenizace kopistem jsou uvedeny na Obrázku 6.



Obrázek 6 Příprava rostlinného materiálu – nakrájení kořene mrkve na malé kousky skalpelem a homogenizace kořene mrkve v roztoku s CTAB pomocí kopistu ve vymraženém termobloku.

Navážky byly homogenizovány 3% lyzačním roztokem s CTAB a 2 μ l merkaptoethanolu dle postupu v kapitole 4.2.2.1. Dva vzorky od každé hmotnosti byly homogenizovány 3% lyzačním roztokem s CTAB, 2 μ l merkaptoethanolu a byly přečišťovány přidavkem chloroform-oktanolu dle postupu v kapitole 4.2.2.2. Po přidavku chloroform-oktanolu a centrifugaci došlo k oddělení fází – vodná fáze s DNA, proteinová mezifáze a fáze s CTAB roztokem a chloroformem (Obrázek 7). Horní fáze s DNA byla odebrána pro izolaci DNA magnetickými mikročásticemi PGMA (2 mg/ml).

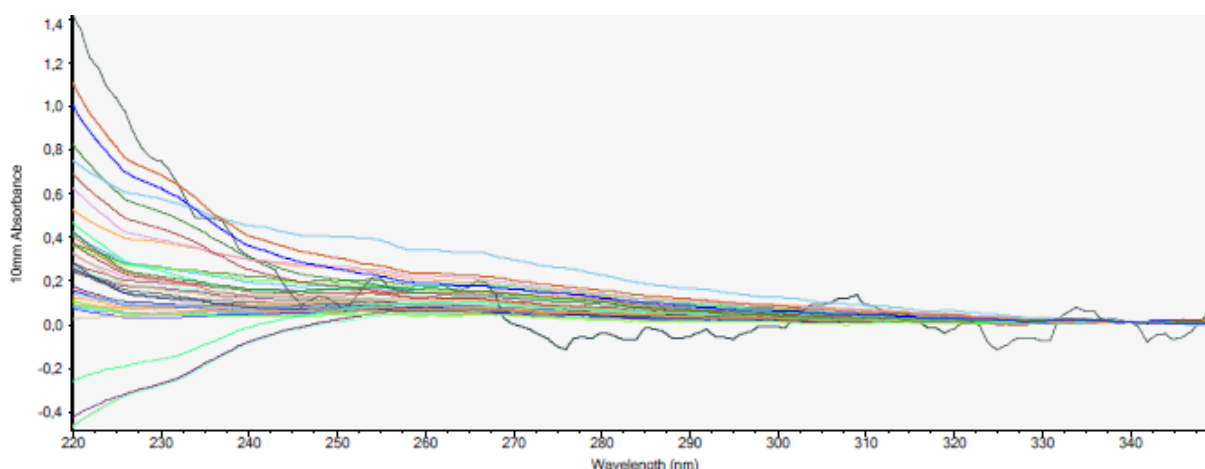


Obrázek 7 Homogenát kořene mrkve v CTAB roztoku 1) po inkubaci; 2) s přidáním chloroform-oktanolu; 3) oddělení fází po centrifugaci

DNA byla izolována dle kapitoly 4.2.3.1 a následná eluce DNA z magnetických mikročásteček PGMA proběhla do 100 μ l TE pufru. Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA bylo provedeno dle kapitoly 4.2.5. Výsledky spektrofotometrického měření jsou uvedeny v Tabulce 12. Absorpční spektra jsou uvedena na Obrázku 8.

Tabulka 12 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované magnetickými mikročástečkami PGMA (2 mg/ml) z homogenátů s CTAB připravených z 0,1 g, 0,2 g, 0,3 g a 0,4 g mrkve. Homogenáty byly připraveny s přidavkem a bez přidavku chloroform-oktanolu (CHCl_3 -okt) ve dvou opakováních.

m mrkve [g]	Homogenát s CTAB	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	A _{260/230}	c [ng/ μ l]	mDNA [ng]
0,1	S CHCl_3 -okt	0,224	0,145	1,54	0,33	11,2	1 120
		0,086	0,058	1,49		4,3	430
	Bez CHCl_3 -okt	0,111	0,067	1,66	0,26	5,6	560
		0,096	0,058	1,65	2,99	4,8	480
0,2	S CHCl_3 -okt	0,332	0,214	1,55	0,58	16,6	1 660
		0,195	0,124	1,57	0,53	9,8	980
	Bez CHCl_3 -okt	0,131	0,081	1,62	0,26	6,6	660
		0,050	0,029	1,71		2,5	250
0,3	S CHCl_3 -okt	0,163			0,22	8,2	820
		0,149	0,091	1,63	0,59	7,4	740
	Bez CHCl_3 -okt	0,134	0,093	1,43	0,71	6,7	670
		0,090	0,049	1,82	0,56	4,5	450
0,4	S CHCl_3 -okt	0,138	0,090	1,53	0,55	6,9	690
		0,168	0,114	1,48	0,66	8,4	840
	Bez CHCl_3 -okt	0,131	0,094	1,40	0,72	6,6	660
		0,102	0,058	1,77	1,59	5,1	510



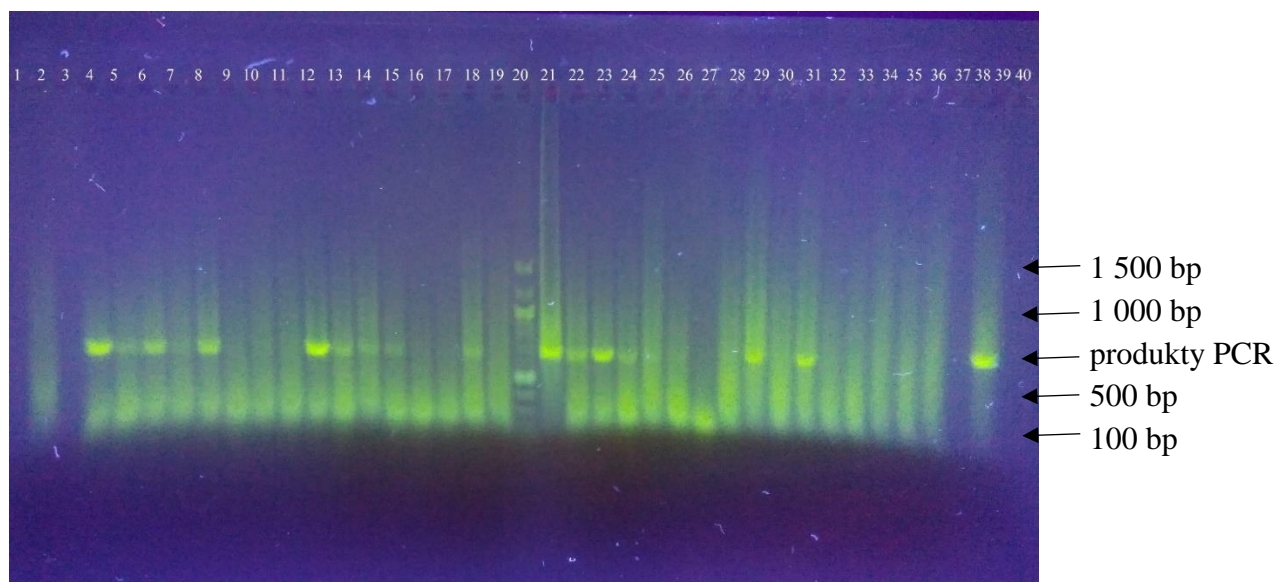
Obrázek 8 Absorpční spektra DNA izolované z homogenátů s CTAB s přidavkem a bez přidavku chloroform-oktanolu připravených z kořene mrkve (0,1 g, 0,2 g, 0,3 g, 0,4 g).

Množství DNA izolované z homogenátů s CTAB připravených z 0,1–0,4 g mrkve bez použití chloroform-oktanolu se pohybovalo v rozmezí 2,5–6,7 ng/μl. Množství DNA izolované z homogenátů s CTAB připravených z 0,1–0,4 g mrkve s použitím chloroform-oktanolu se pohybovalo v rozmezí 4,3–16,6 ng/μl. Nejvyšší množství DNA bylo izolováno z 0,2 g kořene mrkve za přídavku chloroform-oktanolu. Absorpční spektra a poměry $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ a $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ ukazují, že izolovaná DNA je znečištěna.

5.1.1 Ověření amplifikovatelnosti izolované DNA metodou PCR

DNA uvedená v Tabulce 12 byla použita jako matrice DNA pro PCR v množství 2 μl. PCR byla provedena dle kapitoly 4.2.6. Byla připravena směs Master Mix pro 36 vzorků (PCR směs I, viz Tabulka 7). Produkty PCR o délce asi 700 bp byly detegovány pomocí agarózové gelové elektroforézy na 1,2% gelu (Obrázek 9).

Obrázek 9 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti asi 700 bp. Amplifikována byla neředěná a 10x ředěná DNA izolovaná ve čtyřech opakováních z homogenátů s CTAB a s přídavkem nebo bez přídavku chloroform-oktanolu připravených z 0,1–0,4 g mrkve.



Běh č.	Množství mrkve [g]	Homogenát s CTAB	Ředění DNA	Množství DNA [ng]/PCR směs	Detekce produktu PCR
1					
2		NK			–
3					
4	0,1	S CHCl ₃ -okt		22,4	++
5			10x		+
6				8,6	++
7			10x		+
8		Bez CHCl ₃ -okt		11,2	++
9			10x		–
10				9,6	+
11			10x		–

Běh č.	Množství mrkve [g]	Homogenát s CTAB	Ředění DNA	Množství DNA [ng]/PCR směs	Detekce produktu PCR
12	0,2	S CHCl ₃ -okt		33,2	+++
13			10x		+
14				19,6	+
15			10x		+
16		Bez CHCl ₃ -okt		13,2	–
17			10x		–
18				5,0	+
19			10x		–
20	DNA standard 100 bp žebříček				
21	0,3	S CHCl ₃ -okt		16,4	+++
22			10x		+
23				14,8	+++
24			10x		+
25		Bez CHCl ₃ -okt		13,4	+
26			10x		+
27				9,0	–
28			10x		–
29	0,4	S CHCl ₃ -okt		13,8	++
30			10x		–
31				16,8	++
32			10x		–
33		Bez CHCl ₃ -okt		13,2	–
34			10x		–
35				10,2	–
36			10x		–
37					
38		PK – <i>N. tabacum</i> 1 ng/μl		2	+++
39					
40					

+, ++, +++ detekce produktu PCR o různé intenzitě; – produkt PCR nedetegován;
NK – negativní kontrola; PK – pozitivní kontrola – *N. tabacum* 1 ng/μl

Poměrně intenzitní produkty PCR byly detegovány po amplifikaci DNA izolované z homogenátů s CTAB z 0,1 g, 0,2 g a 0,3 g mrkve s přidavkem chloroform-oktanolu. Produkty PCR získané po amplifikaci DNA izolované z 0,4 g mrkve a DNA izolovaná z homogenátů s CTAB bez přidavku chloroform-oktanolu byly nižší intenzity nebo nebyly detegovány. Pro další postup byla vybrána navážka 0,2 g rostlinného materiálu a přidavek chloroform-oktanolu k homogenátu.

5.2 Izolace DNA z čerstvé zeleniny a ovoce

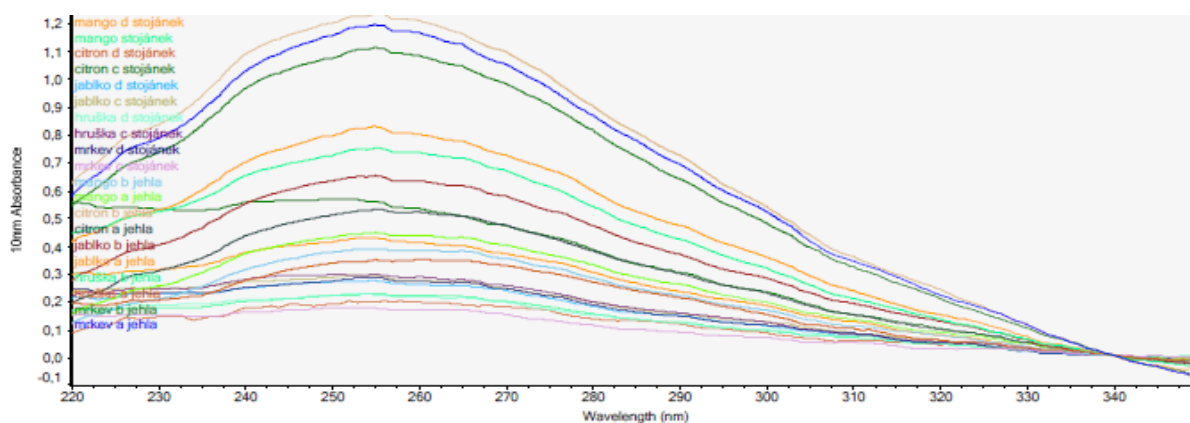
5.2.1 Izolace DNA magnetickými mikročásticemi PGMA z homogenátů přečištěných isopropanolem

Vzorky zeleniny (mrkve) a ovoce (hrušky, jablka, citronu a manga) byly připraveny dle kapitoly 4.2.1.1 ve čtyřech opakováních (a, b, c, d). Pro přípravu homogenátů bylo použito 0,2 g rost. materiálu s přidavkem chloroform-oktanolu (4.2.2.2). Homogenáty byly dle kapitoly 4.2.2.3 přečištěny isopropanolem, DNA byla izolována magnetickými mikročásticemi PGMA (2 mg/ml) a eluována do 100 μ l TE pufru. Mikročástice PGMA s navázanou DNA byly separovány magnetickou jehlou (vzorky a, b) dle 4.2.3.2 a magnetickým separátorem (vzorky c, d) dle 4.2.3.1. Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA bylo provedeno dle kapitoly 4.2.5. Hodnoty absorbancí a celková množství izolované DNA jsou uvedeny v Tabulce 13. Grafické znázornění absorbancí je uvedeno na Obrázku 10. Dle kapitol 4.2.6 a 4.2.7 byla provedena polymerázová řetězová reakce (PCR směs III, viz Tabulka 7) a agarózová gelová elektroforéza produktů PCR. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 11.

Tabulka 13 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované magnetickými mikročásticemi PGMA z homogenátů s CTAB za přidavku chloroform-oktanolu a přečištěných isopropanolem připravených z 0,2 g mrkve, hrušky, jablka, citronu a manga ve 4 opakováních (a,b,c,d).

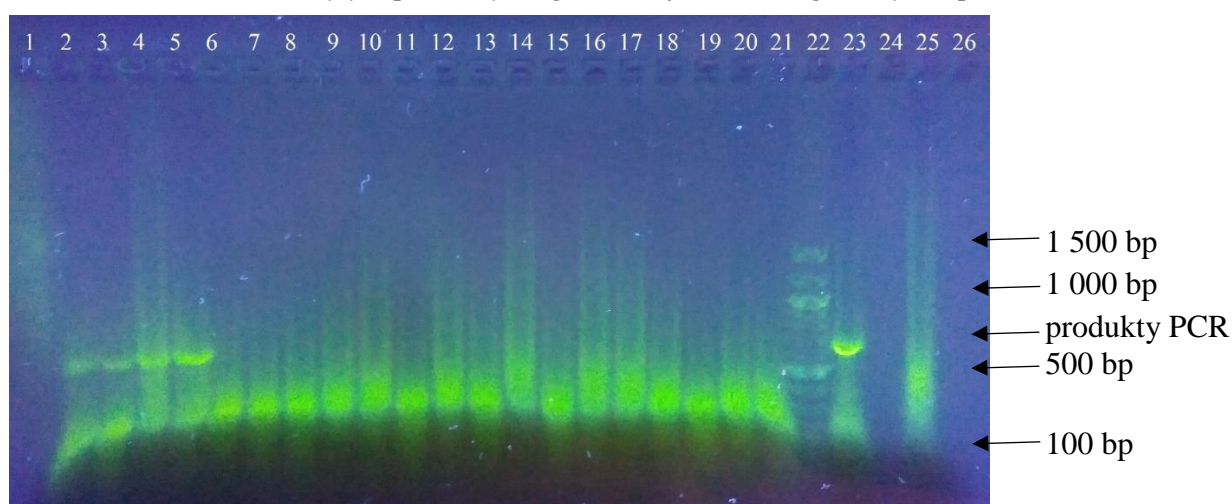
Rostlinný materiál	Způsob separace magnetických částic	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	A _{260/230}	c [ng/ μ l]	mDNA [ng]
Mrkev	J	1,162	0,865	1,34	1,49	58,1	5 810
		1,079	0,811	1,33	1,49	54,0	5 400
	S	0,163	0,108	1,51	1,14	8,2	820
		0,267	0,182	1,47	1,20	13,4	1 340
Hruška	J	0,344	0,263	1,31	1,74	17,2	1 720
		0,731	0,536	1,36	1,42	36,5	3 650
	S	0,281	0,192	1,46	1,19	14,1	1 410
		0,210	0,145	1,45	1,15	10,5	1 050
Jablko	J	0,797	0,594	1,34	1,53	39,9	3 990
		0,629	0,467	1,35	1,58	31,4	3 140
	S	0,271	0,191	1,41	1,11	13,5	1 350
		0,255	0,176	1,44	1,15	12,7	1 270
Citron	J	0,515	0,375	1,37	1,70	25,7	2 570
		1,205	0,899	1,34	1,45	60,3	6 030
	S	0,528	0,381	1,38	1,00	26,4	2 640
		0,191	1,131	1,45	1,39	9,5	950
Mango	J	0,432	0,326	1,33	1,74	21,6	2 160
		0,378	0,279	1,36	1,88	18,9	1 890
	S	0,217	0,150	1,45	1,27	10,9	1 090
		0,408	0,299	1,36	1,32	20,4	2 040

J – magnetická jehla; S – magnetický separátor



Obrázek 10 Absorpční spektra DNA izolované z homogenátů s CTAB připravených z 0,2 g mrkve, hrušky, jablka, citronu a manga s přidavkem chloroform-oktanolu a přečištěných isopropanolem. Izolace DNA proběhla pomocí magnetických mikročástic PGMA (2 mg/ml) separovaných pomocí magnetického separátoru a magnetické jehly.

Obrázek 11 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti asi 700 bp izolovaných z homogenátů s CTAB s přidavkem chloroform-oktanolu, přečištěných isopropanolem a připravených z 0,2 g mrkve, hrušky, jablka, citronu a manga. Izolace DNA byla provedena pomocí magnetických mikročástic PGMA, které byly separovány magnetickou jehlou a magnetickým separátorem.



Běh č.	DNA	Způsob separace magnetických částic	Množství DNA [ng]/PCR směs	Intenzita produktu PCR
1				
2	mrkev	J	116,0	+
3			108,0	+
4		S	16,4	++
5			26,8	++
6	hruška	J	34,4	-
7			73,0	-
8		S	28,2	-
9			21,0	-

Běh č.	Množství mrkve [g]	Homogenát s CTAB	Ředění DNA	Množství DNA [ng]/PCR směs
10	jablko	J	79,8	–
11			62,8	–
12		S	27,0	–
13			25,4	–
14	citron	J	51,4	–
15			120,6	–
16		S	52,8	–
17			19,0	–
18	mango	J	43,2	–
19			37,8	–
20		S	21,8	–
21			40,4	–
22	DNA standard 100 bp žebříček			
23				
24	PK – <i>N. tabacum</i> 1 ng/μl		2	+++
25				
26	NK			–

J – magnetická jehla; S – magnetický separátor

+, ++, +++ detekce produktu PCR o různé intenzitě; – produkt PCR nedetegován;

NK – negativní kontrola; PK – pozitivní kontrola – *N. tabacum* 1 ng/μl

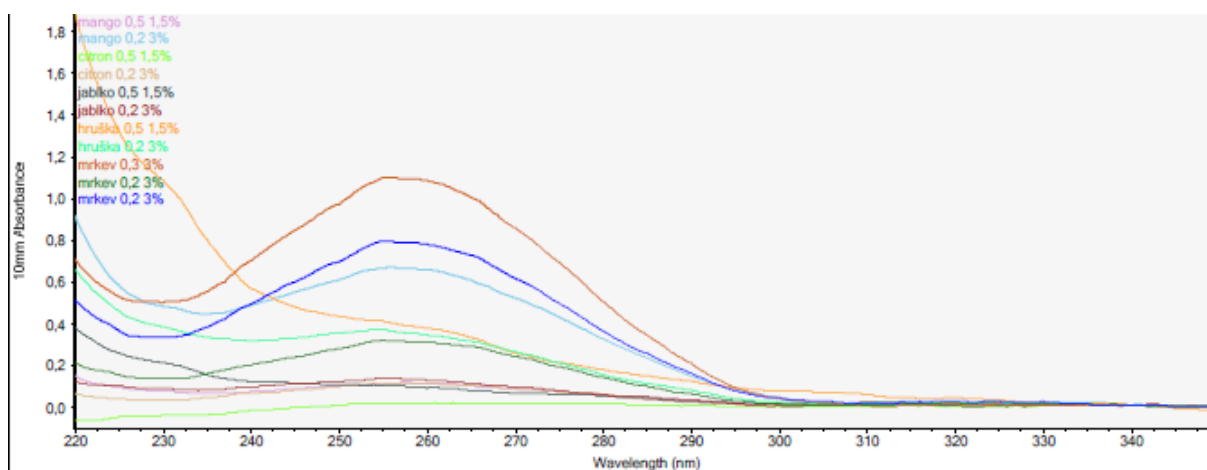
Při separaci magnetických částic magnetickou jehlou bylo izolováno větší množství DNA. DNA byla znečištěná. Pouze u mrkve byly amplifikovány a detegovány produkty PCR o velikosti asi 700 bp. Intenzivnější produkty PCR byly detegovány po amplifikaci DNA izolované magnetickým separátorem. Menší množství DNA pravděpodobně obsahuje menší množství inhibitorů PCR.

5.2.2 Izolace DNA z homogenátů přečištěných isopropanolem bez použití magnetických částic

Vzorky byly připraveny dle kapitoly 4.2.1.1 ve čtyřech opakováních. Pro přípravu homogenátů bylo použito 0,2 g ovoce (hruška, jablko, citron a mango) a 0,2 g zeleniny (mrkev) s přidavkem chloroform-oktanolu. Homogenáty byly dle kapitoly 4.2.2.3 přečištěny isopropanolem a získaná DNA byla rozpuštěna ve 100 μl TE pufru. Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA bylo provedeno dle kapitoly 4.2.5. Hodnoty absorbancí a celková množství izolované DNA jsou uvedeny v Tabulce 14. Grafické znázornění absorbancí je uvedeno na Obrázku 12. Byla provedena PCR dle kapitoly 4.2.6 a agarózová gelová elektroforéza dle kapitoly 4.2.7. Výsledky PCR a agarózové gelové elektroforézy jsou uvedeny na Obrázku 13.

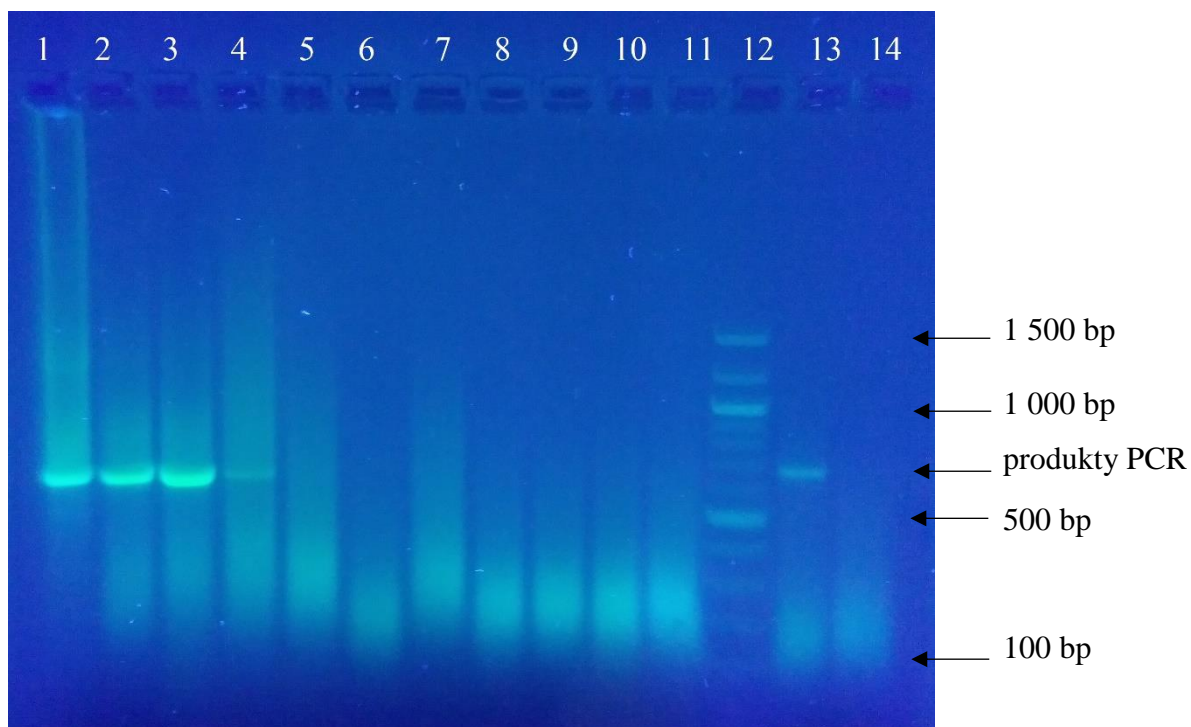
Tabulka 14 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované bez použití magnetických částic z homogenátů s CTAB s přidavkem chloroform-oktanolu, přečištěných isopropanolem a připravených z 0,2 g mrkve (ve 3 opakováních), hrušky, jablka, citronu, manga (ve 2 opakováních).

Rostlinný materiál	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	A _{260/230}	c [ng/μl]	mDNA [ng]
Mrkev	0,770	0,355	2,17	2,39	38,5	3 850
	0,297	0,132	2,26	2,35	14,5	1 450
	1,075	0,497	2,16	2,19	53,8	5 380
Hruška	0,333	0,144	2,32	0,89	16,7	1 670
	0,367	0,168	2,18	0,34	18,3	1 830
Jablko	0,118	0,046	2,57	1,55	5,9	590
	0,081	0,041	1,96	0,40	4,0	400
Citron	0,100	0,049	2,06	4,59	5,0	500
	0,007	0,005	1,37		0,3	30
Mango	0,649	0,317	2,05	1,37	32,5	3 250
	0,105	0,048	2,18	1,61	5,2	520



Obrázek 12 Absorpční spektra DNA izolované z homogenátů připravených z 0,2 g mrkve, hrušky, jablka, citronu a manga s použitím homogenátů s CTAB 3%, chloroform-oktanolu a přečištěných isopropanolem. Izolace proběhla bez použití magnetických částic.

Obrázek 13 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti asi 700 bp. DNA izolovaná z homogenátů s CTAB s přidavkem chloroform-oktanolu přečištěných isopropanolem připravených z 0,2 g mrkve, hrušky, jablka, citronu a manga.



Běh č.	DNA	Množství DNA [ng]/PCR směs	Intenzita produktu PCR
1	Mrkev	77	++
2		29	++
3		107,6	++
4	Hruška	33,4	+
5		36,6	–
6	Jablko	11,8	–
7		8,0	–
8	Citron	10,0	–
9		0,6	–
10	Mango	65	–
11		10,4	–
12	DNA standard 100 bp žebříček		
13	PK – <i>N. tabacum</i> 1 ng/μl	2	+
14	NK		–

+, ++, +++ detekce produktu PCR o různé intenzitě; – produkt PCR nedetegován;
NK – negativní kontrola; PK – pozitivní kontrola – *N. tabacum* 1 ng/μl

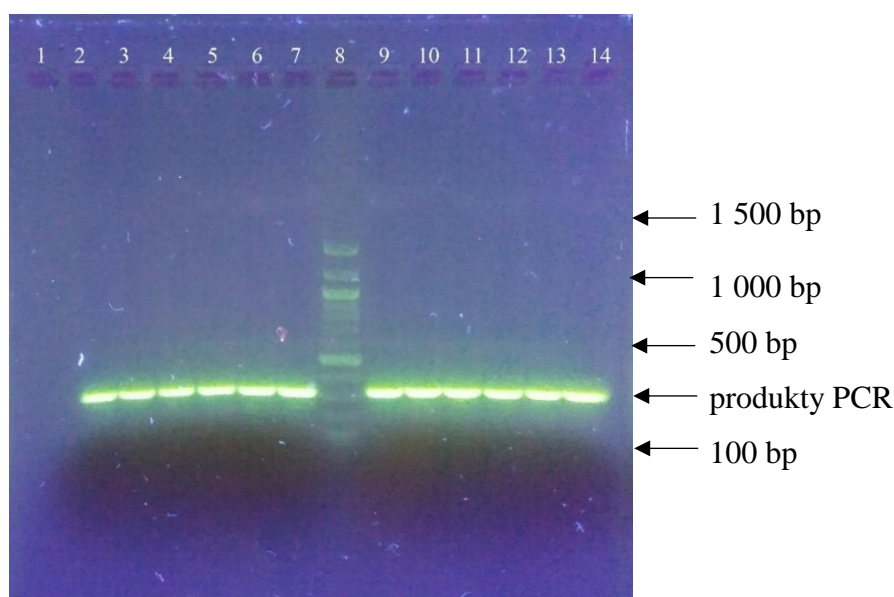
Z různých plodů bylo izolováno různé množství DNA (0,3–53,8 mg/ml) bez použití magnetických částic. Byly detegovány produkty PCR o velikosti 700 bp po amplifikaci DNA izolované z mrkve a jednoho vzorku hrušky. Ostatní PCR produkty nebyly detegovány.

5.3 PCR s primery ZD_for a ZD_rev

5.3.1 Testování teploty hybridizace v rozmezí 50–70 °C

Primery ZD_for a ZD_rev umožňují získat produkt PCR o délce asi 350 bp. Produkt PCR této délky je vhodný pro sekvencování s cílem porovnání sekvencí. Postup byl proveden dle kapitoly 4.2.6 a 4.2.7. Byla připravena směs Master Mix pro 13 vzorků (PCR směs II, Tabulka 7). Jako DNA matrice byla použita kontrolní DNA *N. tabacum* 1 ng/μl. Výsledky jsou uvedeny na Obrázcích 14 a 15.

Obrázek 14 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti asi 350 bp. Amplifikována byla DNA z pozitivní kontroly *N. tabacum* 1 ng/μl s teplotou hybridizace 50–60 °C.

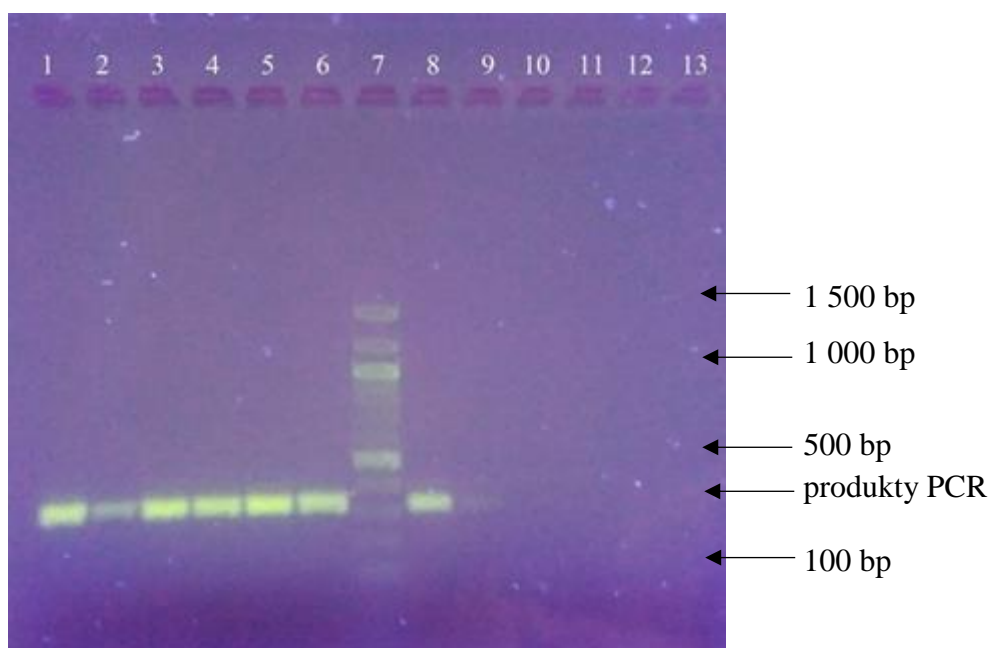


Běh č.	DNA	Množství DNA [ng]/PCR směs	T [°C]	Detekce produktu PCR
1				
2	<i>N. tabacum</i> 1 ng/μl	2	50	+
3		2	50,3	+
4		2	50,9	+
5		2	51,7	+
6		2	52,8	+
7		2	54,3	+
8		DNA standard 100 bp žebříček		
9	<i>N. tabacum</i> 1 ng/μl	2	56	+
10		2	57,4	+
11		2	58,5	+
12		2	59,3	+
13		2	59,8	+
14		2	60	+

+, ++, +++ detekce produktu PCR o různé intenzitě; – produkt PCR nedetegován;

NK – negativní kontrola; PK – pozitivní kontrola – *N. tabacum* 1 ng/μl

Obrázek 15 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti asi 350 bp. Amplifikována byla DNA pozitivní kontroly *N. tabacum* 1 ng/μl s teplotou hybridizace 50–70 °C.



Běh č.	DNA	Množství DNA [ng]/PCR směs	T [°C]	Detekce produktu PCR
1	<i>N. tabacum</i> 1 ng/μl	2	50	+++
2		2	50,5	++
3		2	51,7	+++
4		2	53,2	+++
5		2	55,5	+++
6		2	58,4	+++
7	DNA standard 100 bp žebříček			
8	<i>N. tabacum</i> 1 ng/μl	2	61,8	++
9		2	64,6	+
10		2	66,8	–
11		2	68,4	–
12		2	69,6	–
13		2	70	–

+, ++, +++ detekce produktu PCR o různé intenzitě; – produkt PCR nedetegován;
NK – negativní kontrola; PK – pozitivní kontrola – *N. tabacum* 1 ng/μl

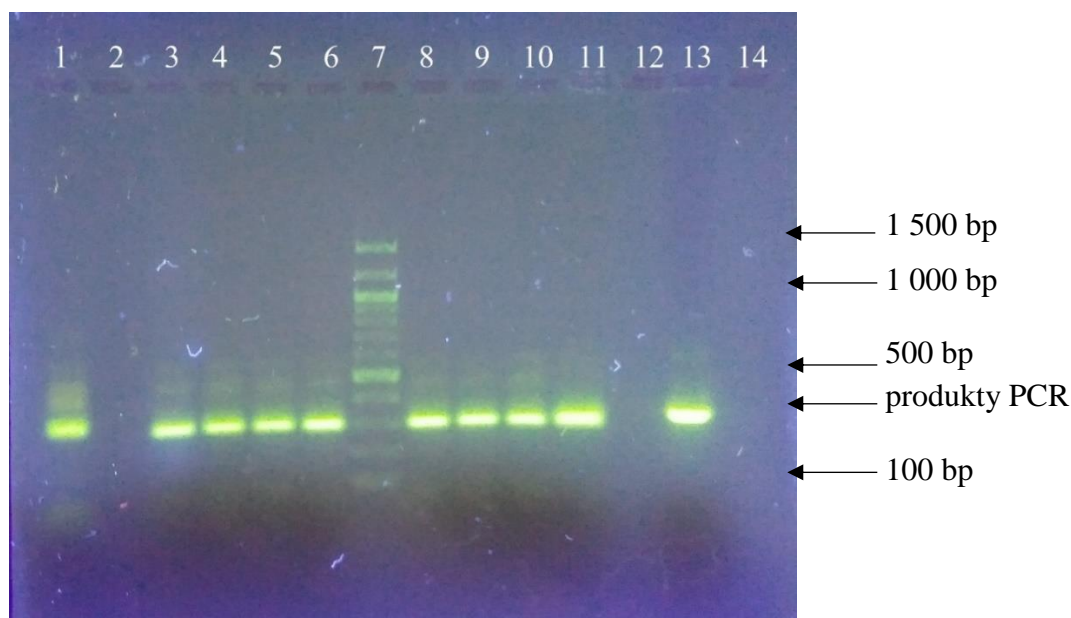
Produkt PCR o velikosti asi 350 bp byl amplifikován a detegován v rozmezí teplot hybridizace 50–64,6 °C.

5.3.2 Amplifikace DNA z kořene mrkve s teplotou hybridizace 60 °C

Postup byl proveden dle kapitol 4.2.6 a 4.2.7 s teplotou hybridizace 60 °C. Byla využita DNA izolovaná magnetickými mikročásticemi PGMA z homogenátů s CTAB s přídavkem

chloroform-oktanolu připravených z 0,1–0,4 g mrkve (Tabulka 12). Výsledky agarózové gelové elektroforézy jsou uvedeny na Obrázku 16.

Obrázek 16 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (asi 350 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná z homogenátů s CTAB s přidavkem chloroform-oktanolu připravených z 0,1–0,4 g mrkve ve 2 opakováních. Teplota hybridizace byla 60 °C.



Běh č.	Navážka mrkve [g]	Množství DNA [ng]/PCR směs	Detekce produktu PCR
1	NK		+
2			
3	0,1	22,4	++
4		8,6	++
5	0,2	33,2	++
6		5,0	++
7	DNA standard 100 bp žebříček		
8	0,3	16,4	+++
9		14,8	+++
10	0,4	13,8	+++
11		16,8	+++
12			
13	PK – <i>N. tabacum</i> 1 ng/μl	2	+++
14			

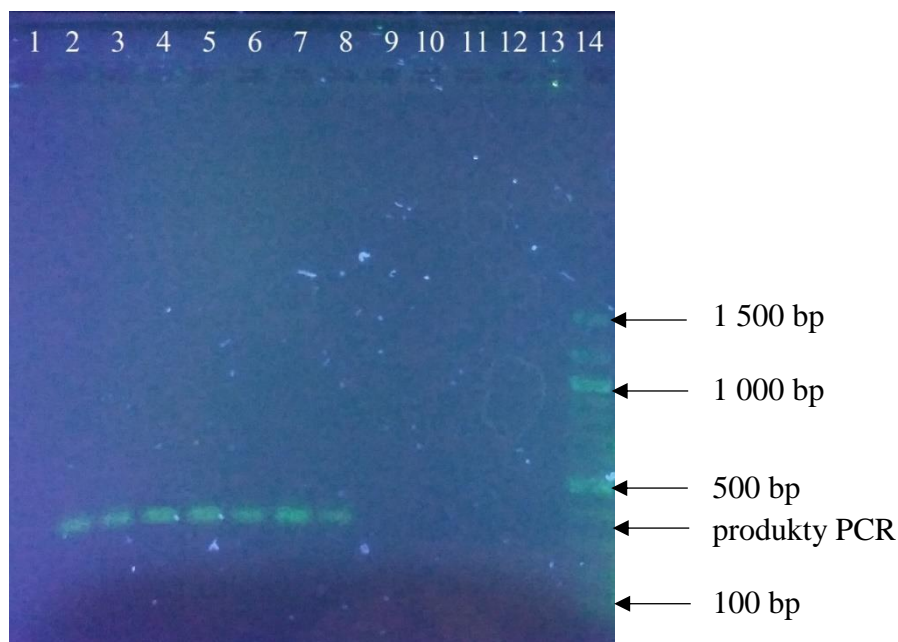
+, ++, +++ detekce produktu PCR o různé intenzitě; – produkt PCR nedetegován;
NK – negativní kontrola; PK – pozitivní kontrola – *N. tabacum* 1 ng/μl

Byly detegovány PCR produkty o velikosti 350 bp. Produkt PCR byl detegován i v negativní kontrole (ve směsi pro PCR byla PCR voda místo DNA). Nedostatečně přečištěná DNA polymeráza může obsahovat zbytky DNA buněk, ze kterých byla izolována.

5.3.3 Testování jiné polymerázy a teploty hybridizace v rozmezí 50–70 °C

S cílem ověřit amplifikaci DNA v negativní kontrole byly namíchany směsi pro PCR bez DNA matrice. Postup byl proveden dle kapitoly 4.2.6, program PCR ZD21 viz Tabulka 9. Byla připravena směs Master Mix pro 13 vzorků (PCR směs III, viz Tabulka 7). V této směsi byla testována DNA polymeráza 5 U/μl speciálně přečištěná (informace od výrobce Top-Bio). Místo DNA matrice byla použita PCR voda. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 17.

Obrázek 17 Kontrolní agarózová gelová elektroforéza pro testování hybridizace v rozmezí 50–70 °C. Místo DNA matrice byla použita PCR voda.



Běh č.	DNA	T [°C]	Detekce produktu PCR
1			
2	NK	50	+
3		50,5	+
4		51,7	+
5		53,2	+
6		55,5	+
7		58,4	+
8		61,8	+
9		64,6	–
10		66,8	–
11		68,4	–
12		69,6	–
13		70	–
14		DNA standard 100 bp	

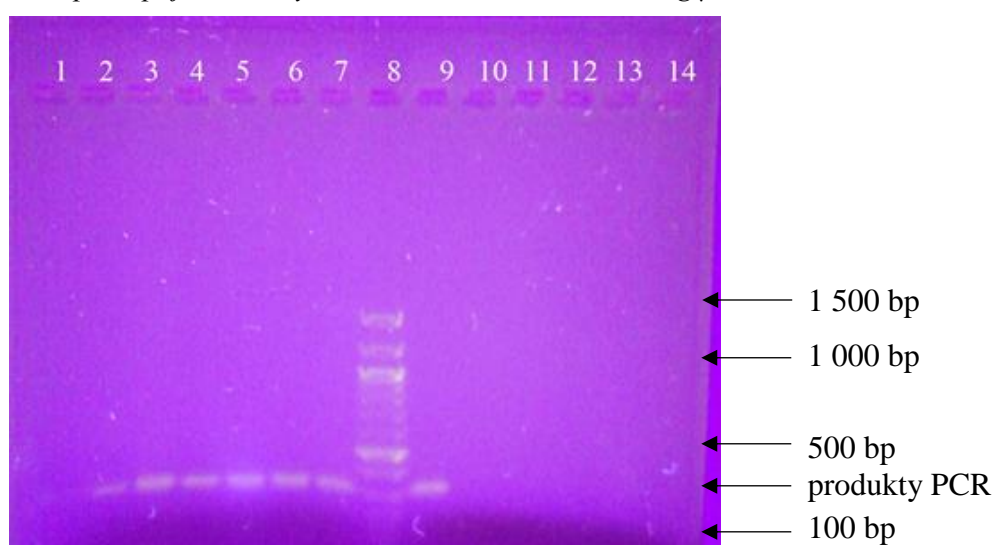
+, ++, +++ detekce produktu PCR o různé intenzitě; – produkt PCR nedetegován;
 NK – negativní kontrola; PK – pozitivní kontrola – *N. tabacum* 1 ng/μl

Byl amplifikován a detegován produkt PCR o stejné intenzitě a velikosti asi 350 bp v rozmezí teplot hybridizace 50–61,8 °C. Negativní kontrola u PCR s produkty o velikosti 350 bp nebyla negativní z důvodu vyšší citlivosti a specifity PCR a využití *Taq* polymerázy, která nebyla 100% přečištěná a mohla obsahovat stopy bakteriální DNA. Metodu je nutné dále optimalizovat.

5.3.4 Testování primerů v PCR s bakteriální DNA *L. casei*

Dle postupů uvedených v kapitolách 4.2.6 a 4.2.7 byla provedena PCR (program ZD21, viz Tabulka 9) s bakteriální DNA *L. casei* 1 ng/μl (separační směs III viz Tabulka 7) a agarózový gelová elektroforéza. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 18.

Obrázek 18 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR. Detegován byl produkt PCR o velikosti 350 bp. Amplifikována byla bakteriální DNA *L. casei* 1 ng/μl.



Běh č	DNA	Množství DNA [ng]/PCR směs	T [°C]	Detekce produktu PCR
1				
2	<i>L. casei</i> 1 ng/μl	2	50	+
3			50,5	+
4			51,7	+
5			53,2	+
6			55,5	+
7			58,4	+
8	DNA standard 100 bp žebříček			
9	<i>L. casei</i> 1 ng/μl	2	61,8	+
10			64,6	–
11			66,8	–
12	<i>L. casei</i> 1 ng/μl	2	68,4	–
13			69,6	–
14			70	–

+, ++, +++ detekce produktu PCR o různé intenzitě; – produkt PCR nedetegován;
NK – negativní kontrola; PK – pozitivní kontrola – *N. tabacum* 1 ng/μl

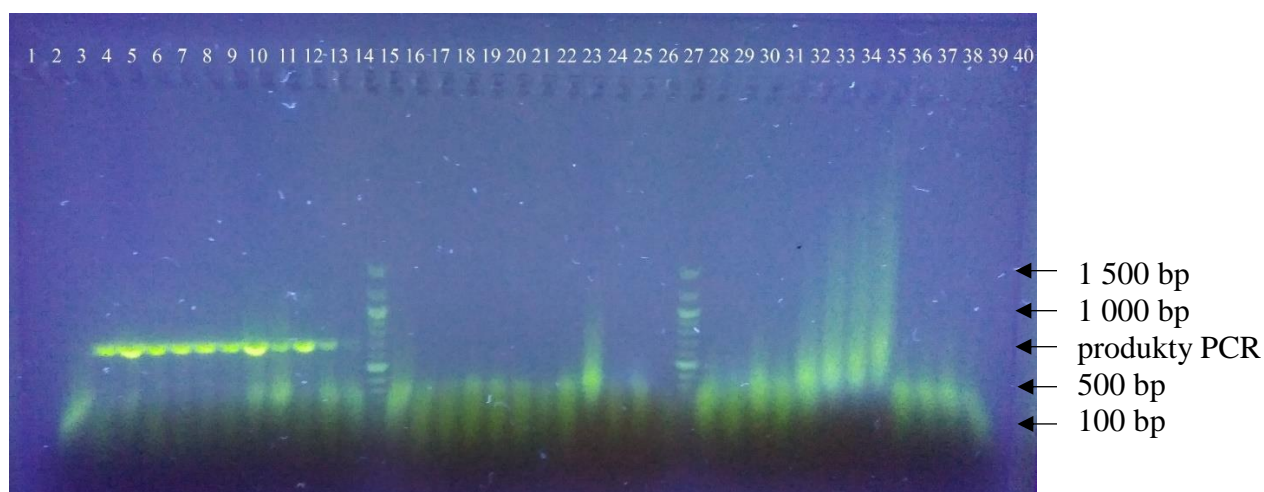
Byl amplifikován produkt o velikosti 350 bp. Hybridizace proběhla v rozmezí teplot 50–61,8 °C. Intenzita produktů PCR byla stejná jako v negativní kontrole (Obrázek 18). V testované DNA polymeráze pravděpodobně není přítomna bakteriální DNA (ale např. DNA kvasinek).

5.4 Optimalizace PCR pro amplicony o velikosti 700 bp

5.4.1 Ověření teploty hybridizace s primery 18S_for a 5,8S_rev

Dle postupu uvedeného v kapitole 4.2.6 byla provedena PCR (program ZD21, viz Tabulka 9) s primery 18S_for a 5,8S_rev a agarózová gelová elektroforéza dle kapitoly 4.2.7. Jako DNA byla použita pozitivní kontrola *N. tabacum* 1 ng/μl a *L. casei* 1 ng/μl a negativní kontrola byla provedena bez DNA s PCR vodou. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 19.

Obrázek 19 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (700 bp). Ověření teploty hybridizace s primery 18S_for a 5,8S_rev.



Běh č	DNA	Množství DNA [ng]/PCR směs	T [°C]	Detekce produktu PCR
1				
2	PK – <i>N. tabacum</i> 1 ng/μl	2	50	–
3			50,5	++
4			51,7	+++
5			53,2	++
6			55,5	++
7			58,4	++
8			61,8	++
9	PK – <i>N. tabacum</i> 1 ng/μl	2	64,6	+++
10			66,8	++
11			68,4	++
12			69,6	++
13			70	+

Běh č	DNA	Množství DNA [ng]/PCR směs	T [°C]	Detekce produktu PCR
14	DNA standard 100 bp žebříček			
15	PK – <i>L. casei</i> 1 ng/μl	2	50	–
16			50,5	–
17			51,7	–
18			53,2	–
19			55,5	–
20			58,4	–
21			61,8	–
22			64,6	–
23			66,8	–
24			68,4	–
25			69,6	–
26			70	–
27	DNA standard 100 bp žebříček			
28	NK		50	–
29			50,5	–
30			51,7	–
31			53,2	–
32			55,5	–
33			58,4	–
34			61,8	–
35			64,6	–
36			66,8	–
37			68,4	–
38			69,6	–
39			70	–
40				

+, ++, +++ detekce produktu PCR o různé intenzitě; – produkt PCR nedetegován;

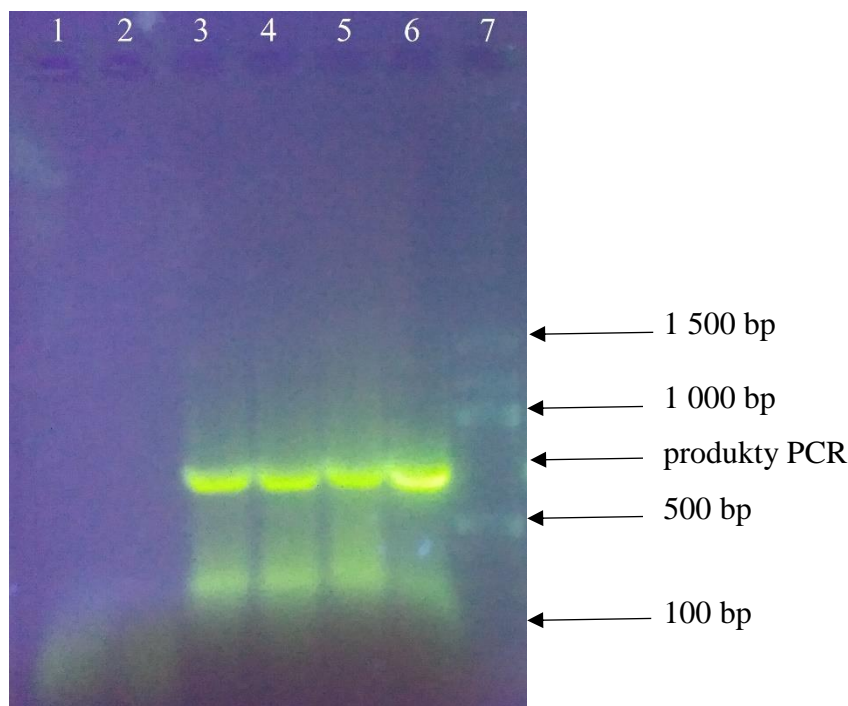
NK – negativní kontrola; PK – pozitivní kontrola – *N. tabacum* 1 ng/μl

Byly amplifikovány a detegovány produkty PCR o velikosti asi 700 bp s pozitivní kontrolou *N. tabacum* 1 ng/μl. U negativních kontrol bylo zjištěno, že se na gelu tvoří šmouhy při teplotách hybridizace 53,2–64,6 °C, což je důležitou informací pro optimalizaci metody PCR 700 ROST. Na základě toho byla provedena PCR s pozitivními kontrolami a teplotou hybridizace 52 °C.

5.4.2 PCR s teplotou hybridizace 52 °C

Na základě předchozích výsledků byla provedena PCR s teplotou hybridizace 52 °C dle kapitoly 4.2.6 (program 52 ROST, viz Tabulka 8). PCR byla provedena s pozitivní kontrolou *N. tabacum* 1 ng/μl a *B. oleracea* 1 ng/μl. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 20.

Obrázek 20 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti asi 700 bp. Amplifikována byla DNA pozitivních kontrol *N. tabacum* a *B. oleracea* při teplotě hybridizace 52 °C.



Běh č	DNA	Množství DNA [ng]/PCR směs	Detekce produktu PCR	
1	NK		–	
2			–	
3	PK – <i>N. tabacum</i> 1 ng/μl	2	+++	
4			+++	
5	PK – <i>B. oleracea</i> 1 ng/μl		+++	
6			+++	
7	DNA standard 100 bp			

+, ++, +++ detekce produktu PCR o různé intenzitě; – produkt PCR nedetegován;

NK – negativní kontrola; PK – pozitivní kontrola – *N. tabacum* 1 ng/μl, *B. oleracea* 1 ng/μl

Byly amplifikovány a detegovány produkty PCR o velikosti asi 700 bp u obou pozitivních kontrol. V negativních kontrolách PCR produkty detegovány nebyly.

5.5 Izolace DNA z výrobků pro děti

5.5.1 Množství DNA izolované z homogenátů přečištěných isopropanolem, separované magnetickými nanočásticemi PLL

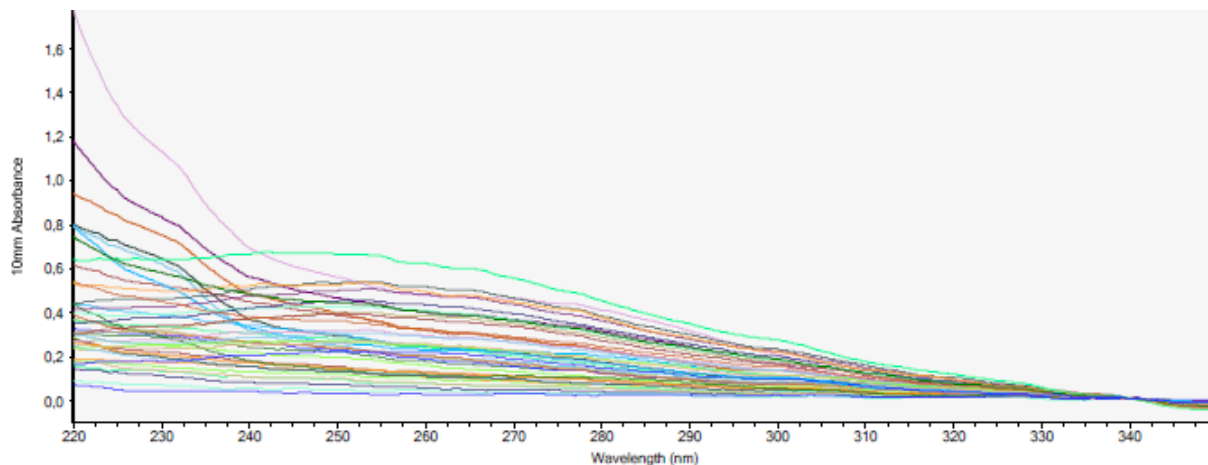
Částice s navázanou DNA byly separována magnetickou jehlou nebo magnetickým separátorem. Pro kontrolu byla testována DNA získaná z homogenátů přečištěných isopropanolem bez dalšího použití magnetických částic. Vzorky výrobků byly připraveny dle kapitoly 4.2.1.24.2.1.1 v osmi opakováních. Pro přípravu bylo použito 0,5 g výrobku s přídavkem chloroform-oktanolu (viz 4.2.2.2). DNA byla izolována magnetickými nanočásticemi, ze dvou vzorků dle kapitoly 4.2.3.1 a z dalších dvou vzorků dle kapitoly 4.2.3.2. DNA byla eluována do 100 μ l TE pufru. Čtyři vzorky byly dle kapitoly 4.2.2.3 pouze přečištěny přesrážením isopropanolem bez další separace magnetickými nanočásticemi. Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA bylo provedeno dle kapitoly 4.2.5. Hodnoty absorbancí a celková množství izolované DNA jsou uvedeny v Tabulce 15. Grafické znázornění absorbancí je uvedeno na Obrázcích 21 a 22.

Tabulka 15 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z výrobků z homogenátů s CTAB připravených z 0,5 g vzorků ovoce a zeleniny s přídavkem chloroform-oktanolu přečištěných isopropanolem a magnetickými nanočásticemi. Magnetické nanočástice s navázanou DNA byly separovány magnetickou jehlou a magnetickým separátorem. Měřeno proti TE pufru.

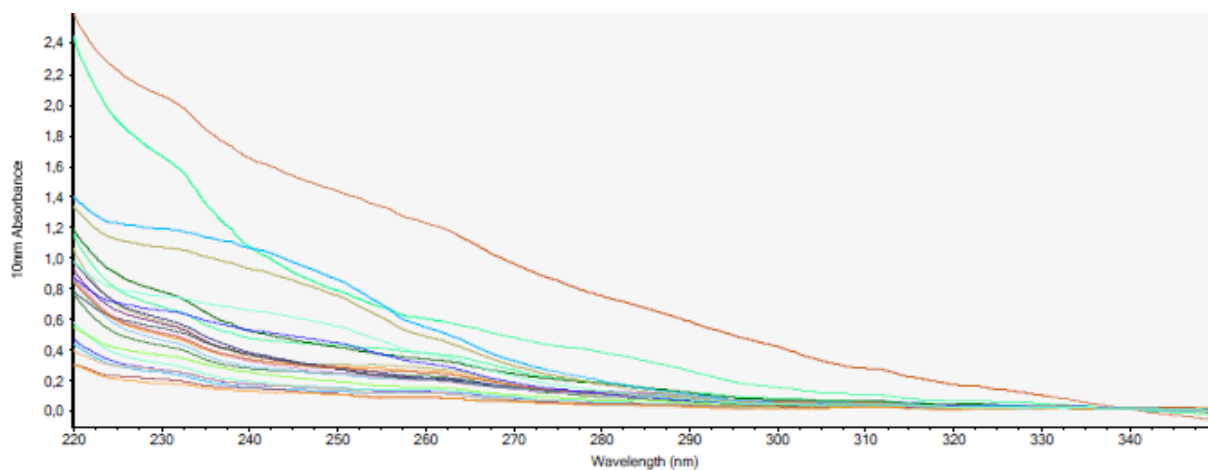
	Výrobek	Způsob separace částic	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	A _{260/230}	c [ng/ μ l]	mDNA [ng]
1	Hami první mrkvička	J	0,612	0,444	1,38	0,97	30,6	3 060
			0,485	0,367	1,32	0,99	24,2	2 420
		S	0,190	0,113	1,69	0,64	9,5	950
			0,232	0,148	1,57	0,71	11,6	1 160
		I	0,362	0,118	3,05	0,49	18,1	1 810
			0,475	0,159	2,98	0,45	23,7	2 370
			0,534	0,184	2,91	0,45	26,7	2 670
			0,297	0,098	3,04	0,46	14,9	1 490
2	Nestlé ovocná kapsička	J	0,359	0,262	1,37	1,10	17,9	1 790
			0,507	0,375	1,35	1,12	25,4	2 540
		S	0,114	0,079	1,45	0,58	5,7	570
			0,116	0,081	1,44	0,55	5,8	580
		I	0,324	0,166	1,95	0,42	16,2	1 620
			0,234	0,101	2,32	0,48	11,7	1 170
			0,589	0,369	1,59	0,36	29,5	2 950
			0,075	0,025	3,02	0,45	3,7	370

	Výrobek	Způsob separace částic	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	A _{260/230}	c [ng/μl]	mdNA [ng]
3	dmBIO hruška, mrkev, jablko	J	0,247	0,174	1,42	1,08	12,3	1 230
			0,240	0,179	1,34	1,00	12,0	1 200
		S	0,100	0,066	1,51	0,54	5,0	500
			0,067	0,045	1,49	0,53	3,4	340
		I	0,075	0,037	2,04	0,40	3,8	380
			0,194	0,104	1,87	0,37	9,7	970
			0,104	0,034	3,09	0,41	5,2	520
			0,141	0,060	2,35	0,40	7,0	700
4	Hamánek Svačinka s meruňkami	J	0,279	0,210	1,33	1,13	13,9	1 390
			0,284	0,216	1,31	1,07	14,2	1 420
		S	0,149	0,093	1,61	0,61	7,4	740
			0,100	0,064	1,56	0,55	5,0	500
		I	0,190	0,102	1,86	0,42	9,5	950
			0,183	0,110	1,66	0,37	9,1	910
			0,203	0,114	1,78	0,34	10,2	1 020
			0,200	0,105	1,91	0,36	10,0	1 000
5	Hello ovocná přesnídávka s jablky	J	0,425	0,315	1,35	1,17	21,2	2 120
			0,474	0,353	1,34	1,14	23,7	2 370
		S	0,468	0,401	1,17	0,42	23,4	2 340
			0,047	0,031	1,51	0,46	2,3	230
		I	0,125	0,044	2,84	0,42	6,3	630
			0,267	0,090	2,98	0,47	13,4	1 340
			0,101	0,028	3,59	0,42	5,1	510
			0,115	0,041	2,80	0,45	5,7	570
6	Hello ovocná přesnídávka s mangem	J	0,400	0,291	1,38	1,05	20,0	2 000
			0,376	0,278	1,35	1,21	18,8	1 880
		S	0,391	0,304	1,29	0,47	19,6	1 960
			0,037	0,022	1,63	0,60	1,8	180
		I	0,215	0,078	2,76	0,52	10,8	1 080
			1,217	0,738	1,65	0,59	30,8	3 080
			0,364	0,172	2,12	0,55	18,2	1 820
			0,248	0,097	2,55	0,51	12,4	1 240

J – magnetická jehla, S – magnetický separátor, I – bez magnetických částic



Obrázek 21 Absorpční spektra DNA izolované z výrobků (0,5 g) z homogenátů s CTAB s přidavkem chloroform-oktanolu a isopropanolu magnetickými nanočásticemi PLL (0,2 mg/ml). Částice s navázanou DNA byly separovány pomocí magnetické jehly a magnetického separátoru.



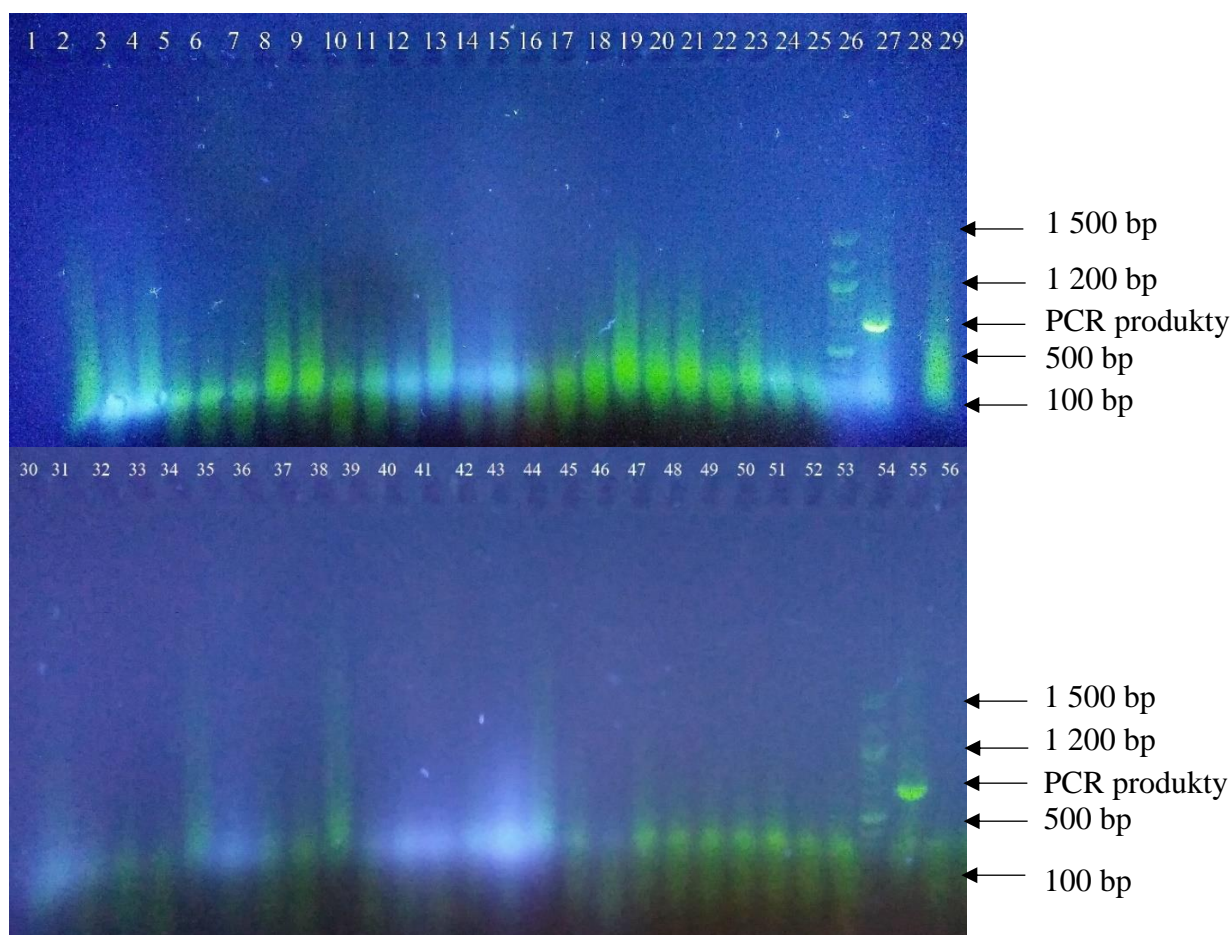
Obrázek 22 Absorpční spektra DNA izolované z výrobků (0,5 g) z homogenátů s CTAB s přidavkem chloroform-oktanolu a isopropanolu. DNA nebyla přečišťována magnetickými částicemi.

DNA byla izolována v koncentracích 1,8–30 ng/μl. DNA byla znečištěna.

5.5.2 Amplifikace s primery 18S_for a 5,8S_rev

Byla provedena amplifikace DNA (4.2.6) a agarózová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti asi 700 bp (4.2.7). Výsledky jsou uvedeny na Obrázku 23.

Obrázek 23 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti asi 700 bp. Amplifikována byla DNA izolovaná z homogenátů s CTAB s přidavkem chloroform-oktanolu a isopropanolu s pomocí magnetických nanočástic PLL. Částice s navázanou DNA byly separovány magnetickou jehlou a magnetickým separátorem. Obrázek je složen ze dvou gelů.



Běh č.	Výrobek	Způsob izolace DNA	Množství DNA [ng]/PCR směs	Detekce produktů PCR
1				–
2	Hami první mrkvička	J	61,2	–
3			48,4	–
4		S	19,0	–
5			23,2	+
6		I	36,2	–
7			47,4	–
8			53,4	–
9			29,8	–

Běh č.	Výrobek	Způsob izolace DNA	Množství DNA [ng]/PCR směs	Detekce produktů PCR
10	Nestlé ovocná kapsička	J	35,8	–
11			50,8	–
12		S	11,4	–
13			11,6	–
14		I	32,4	–
15			23,4	–
16			59,0	–
17			7,4	–
18	dmBIO hruška, mrkev, jablko	J	24,6	–
19			24,0	–
20		S	10,0	–
21			6,8	–
22		I	7,6	–
23			19,4	–
24			10,4	–
25			14,0	–
26	DNA standard 100 bp žebříček			
27	PK – <i>N. tabacum</i> 1 ng/μl		2	++
28				
29	NK			–
30	Hamánek Svačinka s meruňkami	J	27,8	–
31			28,4	–
32		S	14,8	–
33			10,0	–
34		I	19,0	–
35			18,2	–
36			20,4	–
37			20,0	–
38	Hello ovocná přesnídávka s jablky	J	42,4	–
39			47,4	–
40		S	46,8	–
41			4,6	–
42		I	12,6	–
43			26,8	–
44			10,2	–
45			11,4	–

Běh č.	Výrobek	Způsob izolace DNA	Množství DNA [ng]/PCR směs	Detekce produktů PCR
46	Hello ovocná přesnídávka s mangem	J	40,0	–
47			37,6	–
48		S	39,2	–
49			3,6	–
50		I	21,6	–
51			61,6	–
52			36,4	–
53			24,8	–
54	DNA standard 100 bp žebříček			
55	PK – <i>N. tabacum</i> 1 ng/μl		2	++
56	NK			–

J – magnetická jehla; S – magnetický separátor, I – bez magnetických částic;
+, ++, +++ detekce produktu PCR o různé intenzitě; – produkt PCR nedetegován;
NK – negativní kontrola; PK – pozitivní kontrola – *N. tabacum* 1 ng/μl

Produkt PCR byl detegován po amplifikaci DNA izolované z výrobku Hami první mrkvička magnetickými nanočásticemi PLL (0,2 ng/μl) separovanými magnetickým separátorem. Produkty PCR v ostatních případech nebyly detegovány.

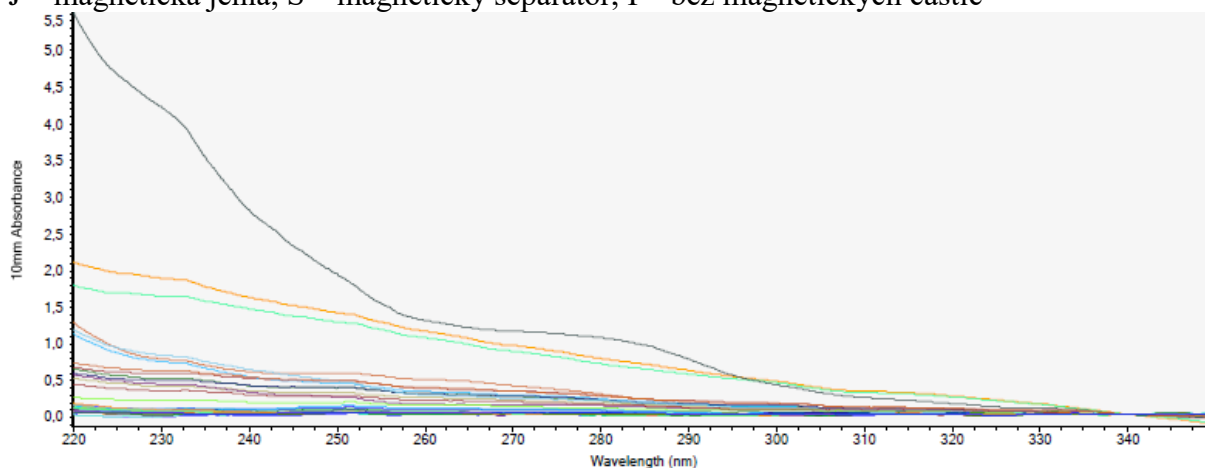
5.5.3 Zakoncentrování DNA a amplifikace s primery 26S_for a 26S_rev

Vzorky DNA izolované z jednotlivých výrobků (viz kapitola 5.5.1) byly přesráženy ethanolem a zakoncentrovány dle kapitoly 4.2.4. Poté bylo provedeno spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty. Dále byla provedena PCR s primery 26S_for a 26S_rev (PCR směs IV, viz Tabulka 7; program 220RO40 viz Tabulka 9) a produkty PCR detegovány agarózovou gelovou elektroforézou dle kapitoly 4.2.7. Výsledky spektrofotometrického stanovení jsou uvedeny v Tabulce 16. Absorpční spektra zakoncentrované DNA jsou uvedena na Obrázku 24. Výsledky agarózové gelové elektroforézy produktů PCR jsou uvedeny na Obrázku 25.

Tabulka 16 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty zakoncentrované DNA izolované bez a s použitím magnetických nanočástic PLL z homogenátu s CTAB s přidavkem chloroform-oktanolu a isopropanolu. Magnetické nanočástice s navázanou DNA byly separovány magnetickou jehlou a magnetickým separátorem.

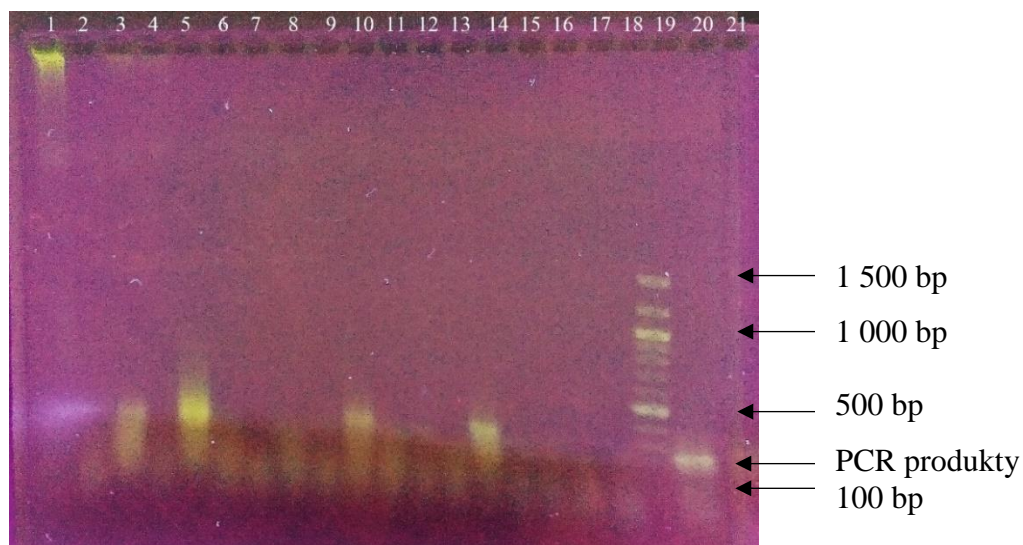
	Výrobek	Způsob separace částic	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	A _{260/230}	c [ng/μl]	mDNA [ng]
1	Hami první mrkvička	J	0,052	0,047	1,58	1,11	2,6	260
		S	1,04	0,691	1,51	0,65	52,2	5 220
		I	0,033	0,018	1,79	0,57	1,6	160
2	Nestlé ovocná kapsička	J	0,022	0,019	1,11	1,90	1,1	110
		S	1,132	0,765	1,48	0,61	56,6	5 660
		I	1,281	1,048	1,22	0,30	64	6 400
3	dmBIO hruška, mrkev, jablko	J	0,013	0,016	0,82	0,61	0,6	60
		S	0,354	0,256	1,38	0,64	17,7	1 770
		I	0,263	0,192	1,37	0,33	13,2	1 320
4	Hamánek Svačinka s meruňkami	J	0,021	0,016	1,36	0,49	1,1	110
		S	0,279	0,199	1,40	0,61	13,9	1 390
		I	0,135	0,115	1,17	0,33	6,7	670
5	Hello přesnídávka s jablky	J	0,008	0,011	0,66		0,4	40
		S	0,221	0,157	1,41	0,58	11,1	1 110
		I	0,307	0,210	1,46	0,43	15,4	1 540
6	Hello přesnídávka s mangem	J	0,009	0,007	1,20	0,22	0,4	40
		S	0,281	0,188	1,50	0,58	14,1	1 410
		I	0,473	0,276	1,72	0,63	23,7	2 370

J – magnetická jehla, S – magnetický separátor, I – bez magnetických částic



Obrázek 24 Absorpční spektra zakoncentrované DNA izolované z homogenátů s CTAB s přidavkem chloroform-oktanolu přečištěných isopropanolem. Magnetické nanočástice PLL s navázanou DNA byly separovány z výrobků pro děti magnetickou jehlou a magnetickým separátorem.

Obrázek 25 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti asi 220 bp. PCR byla provedena se zakoncentrovanou DNA z homogenátů s CTAB s přidavkem chloroform-oktanolu a isopropanolu izolovanou bez pomoci magnetických částic PLL.



Běh č.	Výrobek	Způsob separace částic	Množství DNA [ng]/PCR směs	Detekce produktů PCR
1	Hami první mrkvička	J	5,2	–
2		S	104,4	+
3		I	3,2	+
4	Nestlé ovocná kapsička	J	2,2	–
5		S	113,2	+++
6		I	128	+
7	dmBIO hruška, mrkev, jablko	J	1,2	–
8		S	35,4	+
9		I	26,4	+
10	Hamánek Svačinka s meruňkami	J	2,2	++
11		S	27,8	+
12		I	13,4	+
13	Hello ovocná přesnídávka s jablky	J	0,8	–
14		S	22,2	++
15		I	30,8	+
16	Hello ovocná přesnídávka s mangem	J	0,8	+
17		S	28,2	+
18		I	47,4	+
19	DNA standard 100 bp žebříček			
20	PK – <i>N. tabacum</i> 1 ng/ μ l			++
21	NK			–

J – magnetická jehla; S – magnetický separátor, I – bez magnetických částic;
 +, ++, +++ detekce produktu PCR o různé intenzitě; – produkt PCR nedetegován;
 NK – negativní kontrola; PK – pozitivní kontrola – *N. tabacum* 1 ng/ μ l

Přesrážená DNA byla izolována v koncentracích 0,4–64 ng/μl. DNA byla znečištěna. Po amplifikaci DNA izolované magnetickou jehlou byl detegován slabý produkt PCR nebo nebyl detegován vůbec. PCR produkty získané amplifikací DNA izolované magnetickými částicemi, které byly separovány magnetickým separátorem byly detegovány v každém běhu. Stejně tak byla detegována DNA izolovaná bez použití magnetických nanočástic PLL.

5.6 Ověření přítomnosti specifické DNA mrkve v amplikonu

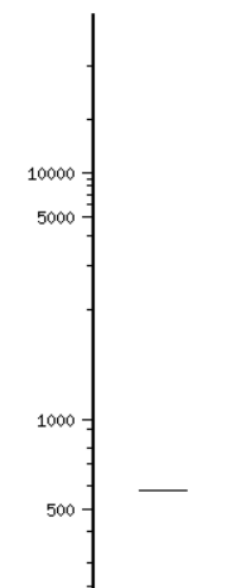
5.6.1 Restrikční analýza PCR produktů mrkve

Sekvence amplikonu 18S_ITS1_5,8S (primery 18S_*for* a 5,8S_*rev*) byla stažena z databáze GenBank (přístupové číslo AY552527). Sekvence z databáze obsahovala části ITS1 a 5,8S nikoliv však 18S gen. Tento konzervativní úsek byl k amplikonu připojen z genu rajčete (přístupové číslo X51576.1). Pomocí programu NEB cutter V2.0 byla provedena simulace štěpení sekvence *in silico*. Výsledky teoretického štěpení enzymy *EcoRV* a *NlaIII* jsou uvedeny na Obrázku 26. Tyto výsledky byly získány od RNDr. A. Kovaříka, CSc.

daucus carota - digested with: EcoRV

#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	(LeftEnd)-EcoRV	1-576	576
2	EcoRV-(RightEnd)	577-674	98

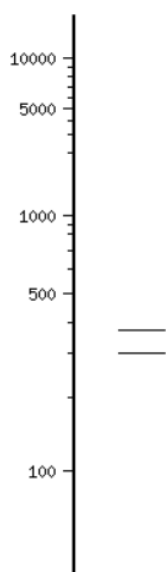
a)



daucus carota - digested with: NlaIII

#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	(LeftEnd)-NlaIII	1-375	375
2	NlaIII-(RightEnd)	376-674	299

b)

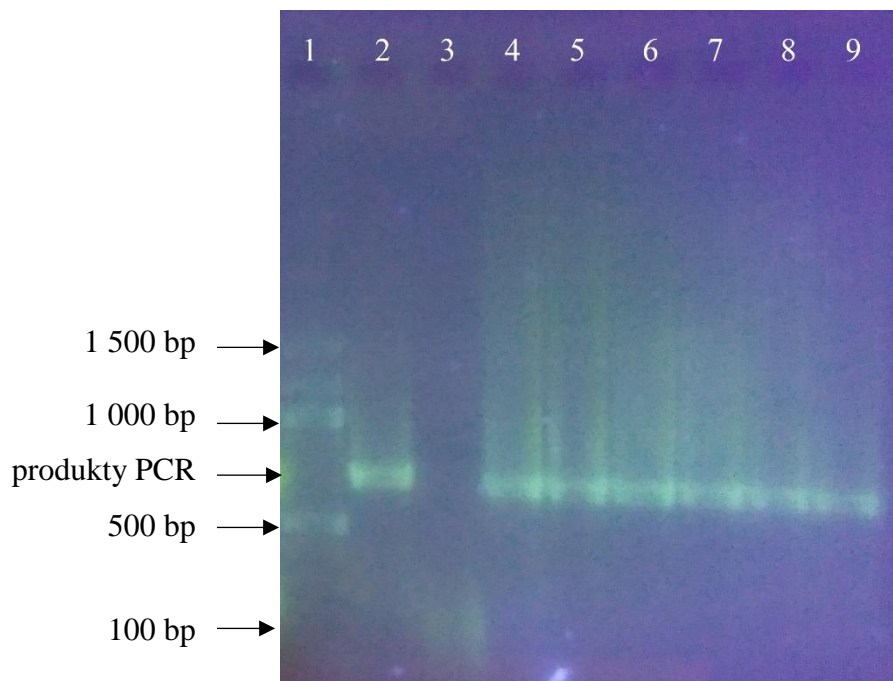


Obrázek 26 Teoretický výsledek restrikční analýzy amplikonu 18S-ITS1-5,8S *Daucus carota* po restrikčním štěpení produktů PCR (700 bp) enzymy EcoRV (a) a NlaIII (b). Krátký EcoRV fragment není na virtuálním gelu vidět.

Reálné štěpení enzymy bylo provedeno s PCR produktem získaném amplifikací DNA izolované z kořene mrkve. Postup byl proveden dle kapitol 4.2.8 a 4.2.9. DNA získaná z homogenátu s CTAB přečištěním homogenátu připraveného z kořene mrkve isopropanolem bez použití magnetických částic byla amplifikována se specifickými primery 18S_for

a 5,8S_rev. Délka ampliconů byla asi 700 bp. Na gel bylo naneseno 5 μ l směsi. Výsledky agarózové gelové elektroforézy jsou uvedeny na Obrázku 27.

Obrázek 27 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR o velikosti asi 700 bp. Amplifikovány byly 2 μ l DNA získané přečištěním homogenátu připraveného z 0,2 g kořene mrkve isopropanolem. Na gel bylo dáno 5 μ l PCR produktu.



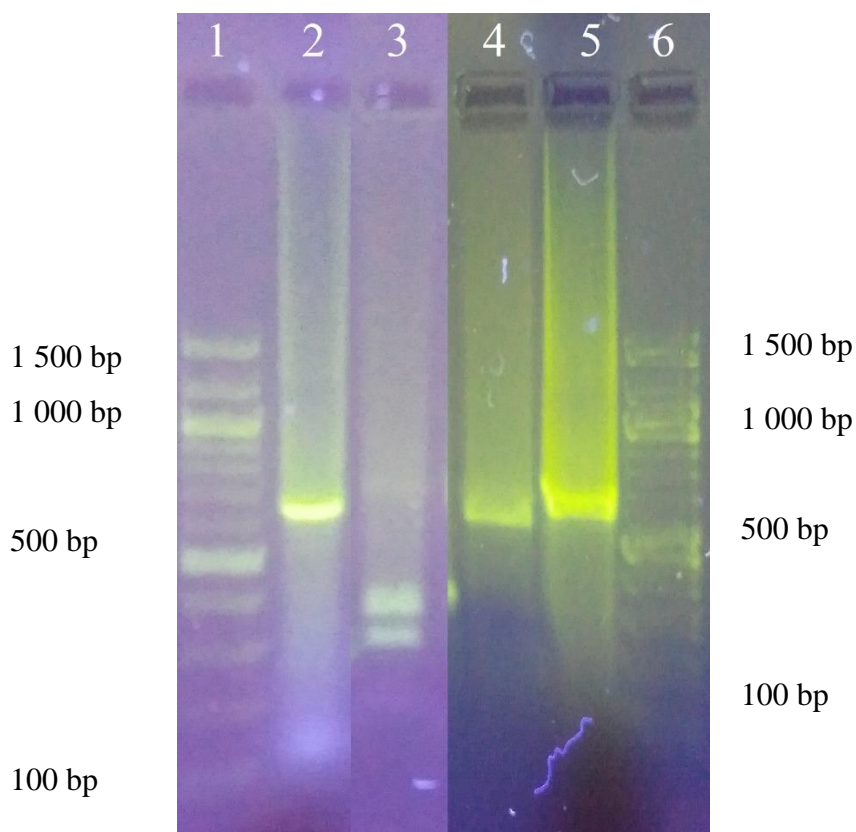
Běh č.	DNA	Detekce produktů PCR
1	DNA standard 100 bp	
2	PK – <i>N. tabacum</i> 1 ng/ μ l	++
3	NK	–
4	mrkev	++
5		++
6		++
7		++
8		++
9		++

+, ++, +++ detekce produktu PCR o různé intenzitě; – produkt PCR nedetegován;
NK – negativní kontrola; PK – pozitivní kontrola – *N. tabacum* 1 ng/ μ l

Amplifikovány byly 2 μ l DNA získané přečištěním homogenátu připraveného z 0,2 g kořene mrkve isopropanolem. Na gel bylo naneseno 5 μ l PCR produktu. Byly detegovány produkty PCR o přibližně stejné intenzitě.

S produkty PCR byla provedena restrikční analýza ampliconu kořene mrkve s enzymy *NlaIII* a *EcoRV* dle postupu uvedeném v kapitole 4.2.8. Výsledek restrikční analýzy je uveden na Obrázku 28.

Obrázek 28 Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (700 bp) po restrikním štěpení enzymy *EcoRV* a *NlaIII*. Obrázek je složen ze dvou gelů.



Běh č.	DNA	Restriktáza	Fragmenty [bp]				
			700	576	375	299	98
1	DNA standard 100 bp žebříček						
2	<i>Daucus carrota</i>	neštěpená	+++	-	-	-	-
3		<i>NlaIII</i>	-	-	+	+	-
4		<i>EcoRV</i>	-	+	-	-	-
5		neštěpená	+++	-	-	-	-
6	DNA standard 100 bp žebříček						

+, ++, +++ detekce produktu PCR o různé intenzitě; – produkt PCR nedetegován;

Po štěpení produktu PCR o velikosti asi 700 bp z DNA získané přečištěním homogenátu připraveného z 0,2 g kořene mrkve isopropanolem vznikl po štěpení enzymem *EcoRV* jeden fragment o přibližné velikosti 576 bp, po štěpení enzymem *NlaIII* vznikly dva fragmenty o přibližné velikosti 299 a 375 bp. Experimentálně zjištěná data se shodují s teoretickými. U štěpení enzymem *EcoRV* nebyl detegován krátký fragment o velikosti 98 bp pravděpodobně pro krátkou velikost.

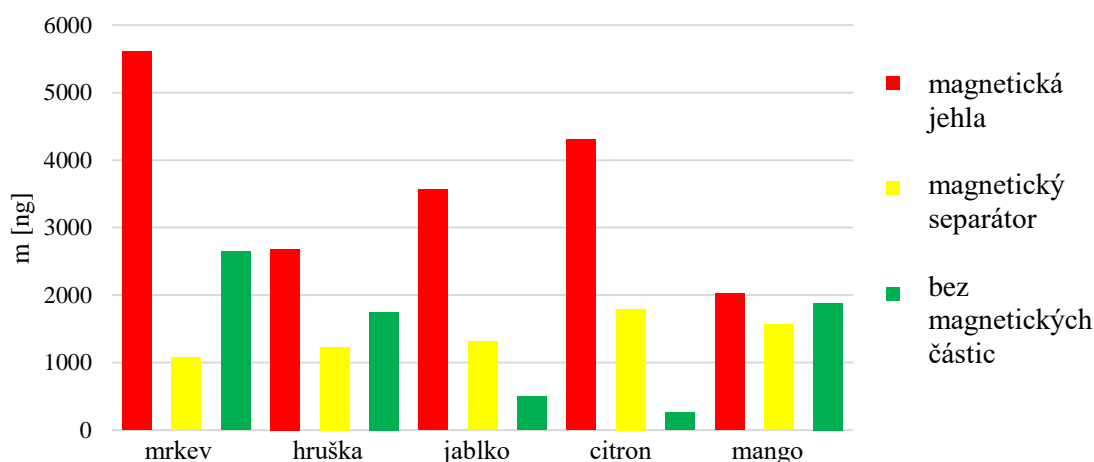
5.7 Porovnání různých metod izolace DNA magnetickými částicemi

5.7.1 Izolace DNA z čerstvé zeleniny a ovoce magnetickými mikročásticemi PGMA

Porovnání množství DNA izolované z čerstvé zeleniny (mrkev) a ovoce (hruška, mrkev, jablko) z homogenátů přečištěných isopropanolem, magnetickými mikročásticemi PGMA a bez nich. Částice s navázanou DNA byly separovány magnetickou jehlou nebo magnetickým separátorem. Pro srovnání výsledků byly použity průměrné hodnoty. Vyhodnocení je zobrazeno na Obrázku 29.

Množství izolované DNA se při použití magnetické jehly pohybovalo v rozmezí 1 720–6 030 ng. Množství izolované DNA se při použití magnetického separátoru pohybovalo v rozmezí 810–2 640 ng. Množství DNA získané přečištěním homogenátu isopropanolem se pohybovalo v rozmezí 30–3 850 ng. Poměr absorbancí $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ se při použití magnetické jehly pohyboval v rozmezí 1,31–1,37, při použití magnetického separátoru v rozmezí 1,36–1,57 a bez použití magnetických částic v rozmezí 1,37–1,57. Poměr absorbancí $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ se při použití magnetické jehly pohyboval v rozmezí 1,42–1,88, při použití magnetického separátoru v rozmezí 1,00–1,39 a bez použití magnetických částic v rozmezí 0,34–4,59.

Srovnání množství DNA izolované z čerstvé zeleniny a ovoce z homogenátů přečištěných isopropanolem bez a s magnetickými mikročásticemi PGMA. Separace částic magnetickou jehlou a magnetickým separátorem.



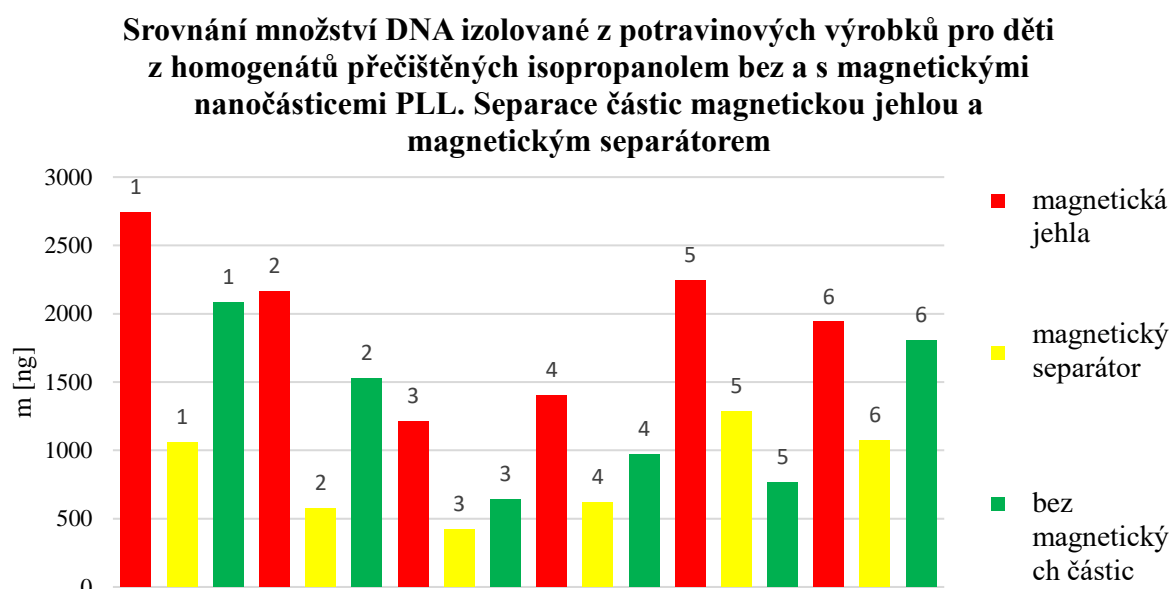
Obrázek 29 Graf znázorňující srovnání množství DNA izolované z ovoce a zeleniny různými způsoby.

Množství DNA izolované pomocí magnetické jehly bylo vyšší než množství DNA izolované magnetickým separátorem a množství DNA izolované bez magnetických mikročástic PGMA. Největší množství DNA bylo izolováno magnetickými mikročásticemi PGMA separovanými magnetickou jehlou. Nejmenší množství bylo izolováno magnetickým separátorem. DNA byla znečištěna ($A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} < 1,57$, $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}} < 4,59$). V PCR se amplifikovala pouze DNA mrkve a v jednom případě DNA izolovaná z hrušky s primery 18S_{for} a 5,8S_{rev} (produkt PCR asi 700 bp). DNA byla znečištěna.

5.7.2 Izolace DNA z potravinových výrobků pro děti magnetickými nanočásticemi PLL

Porovnání množství DNA izolované z potravinových výrobků pro děti z homogenátů přečištěných isopropanolem, částicemi PLL a bez nich. Částice s navázanou DNA byly separovány magnetickou jehlou nebo magnetickým separátorem. Vyhodnocení je zobrazeno na Obrázku 30.

Množství izolované DNA se při využití magnetické jehly pohybovalo v rozmezí 1 200–3 060 ng. Množství izolované DNA se při využití magnetického separátoru pohybovalo v rozmezí 180–2 340 ng. Množství DNA získané z homogenátu s CTAB s přidavkem chloroform-oktanolu přečištěním isopropanolem se pohybovalo v rozmezí 380–3 080 ng. Poměr absorbancí $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ se při použití magnetické jehly pohyboval v rozmezí 1,31–1,42, při použití magnetického separátoru v rozmezí 1,17–1,69 a bez použití magnetických částic v rozmezí 1,59–3,56. Poměr absorbancí $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ se při použití magnetické jehly pohyboval v rozmezí 0,97–1,21, při použití magnetického separátoru v rozmezí 0,42–0,71 a bez použití magnetických částic v rozmezí 0,34–0,6.



Obrázek 30 Graf znázorňující srovnání množství DNA izolované z potravinových výrobků pro děti různými způsoby. 1 – Hami první mrkvička, 2 – Nestlé ovocná kapsička, 3 – dmBIO hruška, mrkev, jablko, 4 – Hamánek svačinka s meruňkami, 5 – Hello ovocná přesnídávka s jablky, 6 – Hello ovocná přesnídávka s mangem.

Množství DNA izolované pomocí magnetické jehly bylo vyšší než množství DNA izolované magnetickým separátorem a množství DNA izolované bez použití magnetických nanočástic PLL. Nejmenší množství bylo izolováno magnetickým separátorem (kromě výrobku č. 5). DNA byla znečištěna ($A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} < 1,69$, $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}} < 1,21$). DNA všech výrobků se amplifikovala v PCR s primery 26S_for a 26S_rev (produkt PCR asi 220 bp) a neamplifikovala se s primery 18S_for a 5,8S_rev (produkt PCR asi 700 bp). DNA byla degradovaná.

6 DISKUSE

6.1 Ověření metody mikroizolace DNA a optimalizace podmínek pro izolaci DNA z kořene mrkve

Pro testování funkčnosti a podmínek mikroizolace DNA magnetickými mikročásticemi PGMA (2 mg/ml) byla vybrána DNA kořene mrkve (*Daucus carota*). Zároveň bylo testováno vhodné množství kořene mrkve k přípravě homogenátu a vliv přídavku chloroform-oktanolu na čistotu, množství a amplifikovatelnost izolované DNA. Rostlinný materiál byl připraven v různém množství (0,1–0,4 g) ve čtyřech opakováních a byl homogenizován pomocí kopistu za stálého chlazení v termobloku, aby se předešlo enzymatické degradaci DNA. Do lyzačního roztoku s CTAB je také přidávána EDTA, která vyvazuje kationty nezbytné pro aktivitu nukleáz [36]. Po inkubaci byl testován přídavek chloroform-oktanolu. Po přidání chloroform-oktanolu došlo k oddělení fází – vodná fáze s DNA, proteinová mezifáze a chloroformová fáze s CTAB roztokem. DNA byla z homogenátů kořene mrkve izolována pomocí magnetických mikročástic PGMA (2 mg/ml) a eluována do TE pufru.

Koncentrace a čistota izolované DNA z různých množství mrkve (0,1–0,4 g) byla stanovena spektrofotometricky z naměřených hodnot absorbancí v rozmezí vlnových délek 230–320 nm (Tabulka 12). Čistá DNA má poměr $A_{280\text{ nm}}/A_{260\text{ nm}}$ v rozmezí hodnot 1,8–2,0. Je-li poměr absorbancí nižší než 1,8, je DNA znečištěna proteiny. Je-li poměr vyšší než 2,0, je DNA znečištěna RNA. Z hodnoty absorbance $A_{260\text{ nm}}$ byla stanovena koncentrace DNA [59]. Poměr absorbancí $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ by měl být v rozmezí hodnot 1,8–2,2, pokud se hodnota liší, je DNA znečištěna. Znečištěna může být fenolickými látkami, dále polysacharidy, solemi nebo proteiny [75]. Dalšími možnostmi přečištění DNA jsou přesrážení polyfenolických látek vysokou koncentrací octanu amonného ($\text{NH}_4\text{COOCH}_3$), opakovaná sorbce na magnetické částice nebo využití komerčních kitů na bázi křemenných sorbentů. Ve všech případech však existuje riziko dalších ztrát DNA a malého až nulového výtěžku [76], [77]. Jako perspektivní se jeví další optimalizace procedury přípravy surového homogenátu před vlastní sorbcí na magnetické částice. Jak jsem ukázala, extrakce DNA směsí chloroform-oktanol spojená s následnou precipitací isopropanolem měla zásadní vliv na čistotu a amplifikovatelnost DNA.

Množství izolované DNA se lišilo v závislosti na množství použitého rostlinného materiálu. Čistota DNA izolované z homogenátů s CTAB s použitím chloroform-oktanolu se pohybovala v rozmezí 1,49–1,63 a koncentrace 4,3–16,6 ng/μl. Čistota DNA izolované bez přídavku chloroform-oktanolu se pohybovala v rozmezí 1,40–1,82 a koncentrace 2,5–6,7 ng/μl. Z hodnot absorbancí uvedených v Tabulce 12 plyne, že čistota izolované DNA byla přibližně stejná, ale s přídavkem chloroform-oktanolu bylo izolováno poněkud větší množství DNA. Izolovaná DNA je znečištěna pravděpodobně proteiny a polyfenoly. Proteiny mají maximum při 280 nm a polyfenoly 240–280 nm. Hodnoty absorbancí mohou být vyšší díky přítomnosti těchto látek [78]. Koncentrace DNA uvedené v Tabulce 12 jsou zkreslené (někdy i výrazně) přítomností látek, které absorbují v UV oblasti. Reálné koncentrace DNA ve výtěžku jsou patrně značně nižší.

Pro ověření kvality izolované DNA byl každý vzorek 10x zředěn a použit pro PCR. Ředění DNA je hojně využívanou metodou, která vede k ředění inhibitorů PCR, může však nastat snížení citlivosti metod [70]. U DNA z homogenátů s CTAB s přídavkem chloroform-oktanolu připravených z 0,1 g, 0,2 g a 0,3 g byly detegovány poměrně intenzivní produkty PCR

o velikosti asi 700 bp. U ostatních vzorků byly PCR produkty velmi slabé nebo nebyly detegovány. Po amplifikaci vyředené DNA byly detegovány slabší bandy, tudíž nebylo potvrzeno vyředení inhibitorů. Největší množství DNA nebylo izolováno z největšího množství mrkve použitého pro přípravu homogenátu, ale z 0,2 g mrkve s přídavkem chloroform-oktanolu. Pro další postup byla proto vybrána navážka 0,2 g mrkve s přídavkem chloroform-oktanolu.

6.2 Izolace DNA z homogenátů s CTAB z ovoce a zeleniny

V této kapitole byla testována funkčnost mikrometody s využitím magnetických mikročastic PGMA u ovocných vzorků (hrušky, jablka, citronu a manga) a různé způsoby přípravy homogenátů – přečištění homogenátu přesrážením isopropanolem. S cílem testovat možnou eliminaci inhibitorů PCR byly částice s navázanou DNA separovány magnetickou jehlou. Ta umožňuje přenos částic do nové mikrozkušavky. Byla srovnána separace částic pomocí magnetického separátoru a magnetické jehly. DNA byla izolována z homogenátů s CTAB připravených z 0,2 g rostlinného materiálu s přídavkem chloroform-oktanolu přečištěných přesrážením isopropanolem.

Množství izolované DNA se lišilo podle typu ovoce a způsobu izolace. Množství a čistota DNA izolované z ovoce a zeleniny magnetickou jehlou byly vyšší než množství DNA izolované magnetickým separátorem. To je pravděpodobně zapříčiněno tím, že při separaci magnetickou jehlou se podařilo nabrat větší množství částic (nedocházelo ke ztrátám magnetických částic). Magnetické částice s navázanou DNA promýváme v čisté Eppendorfově zkumavce, zatímco při separaci magnetickým separátorem práce probíhá v jedné Eppendorfově zkumavce a nečistoty (inhibitory) mohou zůstat na stěnách a kontaminovat vzorky. Množství DNA izolované magnetickou jehlou se pohybovalo v rozmezí 1 720–6 030 ng, poměr $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ byl 1,31–1,37 a poměr absorbancí $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ byl 1,42–1,88. Množství DNA izolované magnetickým separátorem se pohybovalo v rozmezí 810–2 640 ng, poměr absorbancí $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 1,36–1,57 a poměr absorbancí $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ byl 1,00–1,39. Z Tabulky 13 plyne, že většina izolované DNA je znečištěna proteiny, polyfenoly, polysacharidy a solemi. Znečištění zejména polyfenoly je zřejmě o něco menší u separace provedené magnetickou jehlou.

Při ověření kvality izolované DNA v PCR byly amplifikovány a agarózovou gelovou elektroforézou detegovány pouze produkty PCR mrkve a v jednom případě hrušky. DNA byla izolována z homogenátu po přečištění isopropanolem. U těchto typů vzorků se potvrdilo, že DNA může být izolována v kvalitě vhodné pro PCR. Detekci produktu PCR u DNA izolované z hrušky se u dalších vzorků nepodařilo zopakovat. Účinnost extrakce je závislá na velikosti částic vzorku – bylo zjištěno, že se snižující se velikostí částic vzorku narůstají výtěžky [37], [49]. Možné příčiny neúspěchu u ovocných vzorků tedy jsou:

- malé množství DNA v homogenátu, vzhledem k větším buňkám a vyššímu obsahu vody ve výchozím materiálu,
- degradovaná DNA, což mohlo být způsobeno při dozrávání ovoce nebo při samotné izolaci DNA,
- přítomnost inhibitorů, které se ireverzibilně vážou k DNA již při izolaci [9], [79].

Tato metoda mikroizolace se ukázala optimální pouze pro vzorky kořene mrkve. Pro vzorky ovoce je nutná další optimalizace, například využití PVP [79].

6.3 PCR s primery ZD_for a ZD_rev

Tyto primery byly navrženy pro amplifikaci úseku DNA dlouhého asi 350 bp. Produkt PCR této délky je vhodný pro sekvencování a porovnání sekvencí. Do termocyklu byly zavedeny nové programy ZDGRA a ZD21 (viz Tabulka 8). Nejprve proběhlo testování vhodné teploty hybridizace s DNA pozitivní kontroly *N. tabacum* o koncentraci 1 ng/μl. Hybridizace probíhala v rozmezí teplot 50–60 °C (ZDGRA) a 50–70 °C (ZD21). Na základě výsledků těchto dvou PCR byla vybrána teplota hybridizace 60 °C a do termocyklu byl zaveden další program 350 ROST. Poté byla provedena PCR s DNA izolovanou z homogenátu připraveného z 0,1–0,4 g kořene mrkve. Jelikož byla negativní kontrola detegována jako pozitivní, byla opět provedena PCR s programem ZD21, tentokrát však s negativní kontrolou (do PCR směsi byla přidána voda místo DNA matrice) a byla přidána jiná polymeráza. Opět byly amplifikovány a detegovány produkty o velikosti asi 350 bp v rozmezí teplot 50–61,8 °C. Na základě předpokladu, že využívaná *Taq* DNA polymeráza není dostatečně přečištěná, byla tato PCR zopakována s bakteriální DNA *L. casei* o koncentraci 1 ng/μl. V tomto případě byly amplifikovány a opět detegovány produkty PCR o velikosti asi 350 bp v rozmezí teplot hybridizace 50–61,8 °C o přibližně stejné intenzitě. Nebylo tedy prokázáno, že uvedené primery nasedají na bakteriální DNA. Pravděpodobně ale nejsou specifické jen pro rostlinou DNA. V DNA polymeráze mohou zůstat např. stopy kvasinkové DNA. V literatuře je uvedeno, že i jediná přítomná exogenní molekula může vést k falešně pozitivnímu výsledku. Tudíž i nedostatečně čisté komponenty pro izolaci DNA nebo PCR komponenty mohou přispět k tomuto výsledku [59].

6.4 Optimalizace PCR s primery 18S_for a 5,8S_rev

Vzhledem k časté přítomnosti šmouh při detekci produktů PCR s primery 18S_for a 5,8S_rev byla provedena optimalizace teploty hybridizace. Po provedení PCR ZD21 (viz Tabulka 8) s gradientem teplot hybridizace 50–70 °C s pozitivními kontrolami *N. tabacum* a *L. casei* 1 ng/μl a negativní kontrolou byly amplifikovány a detegovány produkty PCR o velikosti asi 700 bp pouze po amplifikaci DNA pozitivní kontroly *N. tabacum* 1 ng/μl. Bakteriální DNA *L. casei* nebyla amplifikována, čímž byla ověřena specifita primerů 18S_for a 5,8S_rev pro rostlinnou DNA. U amplifikací provedených s negativní kontrolou bylo zjištěno, že výrazné šmouhy na gelu se tvoří při teplotách 53,2–64,6 °C (). Šmouhy jsou intenzivní a překrývají případné PCR produkty. Na základě toho byla provedena PCR s teplotou hybridizace 52 °C a pozitivními kontrolami *N. tabacum* a *B. oleracea* 1 ng/μl. Byly amplifikovány a detegovány očekávané produkty PCR (asi 700 bp) u obou pozitivních kontrol. Šmouhy byly výrazně méně intenzivní. V negativních kontrolách PCR produkty detegovány nebyly.

6.5 Izolace rostlinné DNA z potravinových výrobků pro děti

Z potravinových výrobků rostlinného původu určených pro děti byla provedena izolace DNA pomocí magnetických nanočástic funkcionalizovaných poly-L-lysinem (0,2 mg/ml), případně bez nich (DNA získána srážením homogenátu isopropanolem). Magnetické nanočástice PLL jsou menší, a proto mají větší povrch umožňující navázání velké množství ligandů [54]. Při ověřování kvality izolované DNA amplifikací v PCR byl v případě délky

amplikonů 700 bp detegován pouze jeden produkt PCR, a to po amplifikaci DNA izolované pomocí magnetického separátoru z výrobku Hami první mrkvička. DNA všech výrobků byla 10x vyředěna a opět byla provedena PCR s primery pro produkty o velikosti asi 700 bp. Amplikony nebyly detegovány (výsledky nejsou uvedeny). Tento stav může být zapříčiněn technologickým zpracováním použitých výrobků (sterilace, vaření, aj.), které vedou k degradaci DNA [35], [80]. Na základě těchto výsledků byla DNA přesrážena ethanolem a zakoncentrována do menšího objemu [11], [59]. Dále byla provedena PCR s primery 26S_{for} a 26S_{rev}. Velikost produktů PCR byla asi 220 bp. Velikost amplikonu pro analýzu zpracovaných výrobků by měla být asi 200 bp [81]. Tyto produkty PCR byly po amplifikaci detegovány u skoro každé DNA, čímž byla potvrzena fragmentace DNA. Produkty PCR větší intenzity byly amplifikovány s použitím DNA, která byla izolována pomocí magnetických nanočástic PLL separovaných magnetickým separátorem.

6.6 Porovnání efektivity testovaných způsobů izolace DNA z různých typů vzorků

Vlastnosti rostlinného materiálu ovlivňují výběr izolačního postupu DNA. Při použití rostlinných materiálů, které obsahují tvrdá pletiva je homogenizace kopistem náročná a pro homogenizaci by bylo jednodušší využití například kapalného dusíku.

Výrazně vyšší množství DNA bylo dle výsledků spektrofotometrického stanovení izolováno s využitím magnetických částic (PGMA a PLL) a magnetické jehly. Tato skutečnost odpovídá jak u DNA izolované magnetickými mikročásticemi PGMA (2 mg/ml) z homogenátů s CTAB s přídavkem chloroform-oktanolu a isopropanolu připravených z 0,2 g rostlinného materiálu, tak u DNA izolované magnetickými nanočásticemi PLL (0,2 mg/ml) z homogenátů s CTAB s přídavkem chloroform-oktanolu a isopropanolu připravených z 0,5 g výrobků. DNA se však neamplifikovala v PCR, což mohlo být zapříčiněno nízkou čistotou, značící znečištění proteiny, polyfenoly a polysacharidy. DNA byla degradovaná. Krátké PCR produkty byly detegovány přes spektrofotometricky stanovené nízké koncentrace DNA. Po amplifikaci DNA izolované magnetickými částicemi v kombinaci s magnetickým separátorem. Proto je využití této metody zatím neoptimálnějším postupem pro izolaci rostlinné DNA v kvalitě vhodné pro PCR z vybrané zeleniny, ovoce a výrobků.

6.7 Ověření specifity amplikonu

Byla ověřena specifita amplikonu štěpením restriktázami deoxyribonukleázami. Produkty PCR nemusely být před restriktivním štěpením přečištěny. Experimentální výsledky se přibližně shodují s teoretickými výsledky restriktivní analýzy (viz Obrázek 26 a Obrázek 28). Štěpením enzymem *EcoRV* byla potvrzena přítomnost rostlinné DNA, neboť se jedná o konzervativní sekvenci v rostlinných genomech [82], [83]. Štěpením enzymem *NlaIII*, jehož cílové místo je specifické pro biologický druh *Daucus carota* byla ověřena přítomnost amplikonu z mrkve. Tímto způsobem by mohla být ověřena přítomnost jednotlivých rostlinných složek v potravinových výrobcích.

7 ZÁVĚR

V experimentální části byla testována mikrometoda izolace rostlinné DNA ze vzorků zeleniny (kořen mrkve), ovoce (hruška, jablko, citron a mango) a z potravinových výrobků pro děti. Tato metoda umožňuje izolaci DNA pomocí magnetických částic z homogenátů s CTAB s přídavkem chloroform-oktanolu a isopropanolu. Metoda se prokázala jako velmi účinná při izolaci DNA z čerstvého kořene mrkve a výrobků. Větší výtěžek DNA z čerstvého materiálu poskytovala magnetická jehla při porovnání s magnetickým separátorem. Avšak u upravených výrobků tomu bylo naopak. DNA izolovaná z čerstvého kořene mrkve byla v odpovídající kvalitě pro provedení PCR. Pomocí specifických primerů byl amplifikován úsek rostlinné rDNA a následně po agarózové gelové elektroforéze byly detegovány amplifikační produkty očekávané délky (asi 700 bp). PCR produkty této velikosti byly v jednom případě detegovány také po amplifikaci DNA izolované z hrušky. Ostatní výsledky nebyly reprodukovatelné. U potravinových výrobků byly u většiny produktů detegovány pouze produkty amplikonů o velikosti asi 220 bp, zatímco produkty amplikonu 700 bp detegovány nebyly. Neschopnost amplifikace delších amplikonů pravděpodobně souvisí s degradací DNA na kratší fragmenty vlivem technologických postupů při zpracování rostlinného materiálu. Specifita amplikonů byla u mrkve prokázána štěpením produktů PCR selektivními restričními enzymy. Pro různé typy potravinových vzorků je nutno metodu dále optimalizovat.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] ŠEVČÍK, Rudolf, Aleš RAJCHL, Jan PIVOŇKA a Michal VOLDŘICH. TRENDY V AUTENTICITĚ POTRAVIN A V PŘÍSTUPECH K DETEKCI FALŠOVÁNÍ. *Chemické listy* [online]. 2012, **10**(106), 903–910 [cit. 2018-04-09]. ISSN 0009-2770; 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_10_903-910.pdf
- [2] VINCENOVÁ, Dana. VÝŽIVA NOVOROZENCE, KOJENCE A BATOLETE. *Pediatric pro praxi* [online]. 2006, **7**(4), 224–226 [cit. 2018-04-09]. Dostupné z: <https://pediatriepropraxi.cz/pdfs/ped/2006/04/12.pdf>
- [3] PRODĚLALOVÁ, Jana, Bohuslav RITTICH, Alena ŠPANOVÁ, Kateřina PETROVÁ a Milan BENEŠ. Isolation of genomic DNA using magnetic cobalt ferrite and silica particles. *Journal of Chromatography A* [online]. 2004, **1056**(1-2), 43-48 [cit. 2016-04-06]. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.08.090. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967304014487>
- [4] NAKAGAWA, Takahito, Reisuke HASHIMOTO, Kohei MARUYAMA, Tsuyoshi TANAKA, Haruko TAKEYAMA a Tadashi MATSUNAGA. Capture and release of DNA using aminosilane-modified bacterial magnetic particles for automated detection system of single nucleotide polymorphisms. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 2006, **94**(5), 862-868 [cit. 2017-06-07]. DOI: 10.1002/bit.20904. ISSN 00063592. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.20904>
- [5] ŠAFAŘÍK, Ivo a Mirka ŠAFAŘÍKOVÁ. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online]. 1999, **722**(1-2), 33-53 [cit. 2016-04-04]. DOI: 10.1016/S0378-4347(98)00338-7. ISSN 03784347. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378434798003387>
- [6] YOZA, Brandon, Mitsufumi MATSUMOTO a Tadashi MATSUNAGA. DNA extraction using modified bacterial magnetic particles in the presence of amino silane compound. *Journal of Biotechnology* [online]. 2002, **94**(3), 217-224 [cit. 2017-06-07]. DOI: 10.1016/S0168-1656(01)00427-8. ISSN 01681656. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165601004278>
- [7] *Informační centrum bezpečnosti potravin* [online]. Praha: Ministerstvo zemědělství, 2012 [cit. 2018-04-19]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/kategorie/legislativa.aspx>
- [8] ARLEO, M., F. RUIBAL, J. PEREYRA, E. MIQUEL, M. FERNÁNDEZ a C. MARTÍNEZ. A DNA-based approach to discriminate between quince and apple in quince jams. *International Food Research Journal* [online]. 2012, **19**(4), 1471-1477 [cit. 2018-04-20]. Dostupné z: [http://www.ifrj.upm.edu.my/19%20\(04\)%202012/26%20IFRJ%2019%20\(04\)%202012%20Martinez%20\(008\).pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/19%20(04)%202012/26%20IFRJ%2019%20(04)%202012%20Martinez%20(008).pdf)
- [9] MADESIS, Panagiotis, Ioannis GANOPOULOS, Ioannis SAKARIDIS, Anagnostis ARGIRIOU a Athanasios TSAFTARIS. Advances of DNA-based methods for tracing the botanical origin of food products. *Food Research International* [online]. 2014, (60),

- 163-172 [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.10.042. ISSN 09639969. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996913005905>
- [10] DE MEDICI, D., T. KUČHTA, R. KNUTSSON et al. Rapid Methods for Quality Assurance of Foods: the Next Decade with Polymerase Chain Reaction (PCR)-Based Food Monitoring. *Food Analytical Methods* [online]. 2015, **8**(2), 255-271 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1007/s12161-014-9915-6. ISSN 1936-9751. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12161-014-9915-6>
- [11] CORRADO, Giandomenico. Advances in DNA typing in the agro-food supply chain. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2016, **52**, 80-89 [cit. 2018-04-21]. DOI: 10.1016/j.tifs.2016.04.003. ISSN 09242244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224415300972>
- [12] BALASUBRAMANIAN, Sundar a Suranjan PANIGRAHI. Solid-Phase Microextraction (SPME) Techniques for Quality Characterization of Food Products: A Review. *Food and Bioprocess Technology* [online]. 2011, **4**(1), 1-26 [cit. 2018-04-20]. DOI: 10.1007/s11947-009-0299-3. ISSN 1935-5130. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11947-009-0299-3>
- [13] TRANTAKIS, Ioannis, Theodore CHRISTOPOULOS, Stelios SPANIOLAS, Panagiotis KALAITZIS, Penelope IOANNOU a Gregory TUCKER. Quantitative Bioluminometric Method for DNA-Based Species/Varietal Identification in Food Authenticity Assessment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2012, **60**(4), 912-916 [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.1021/jf203531h. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf203531h>
- [14] GIOVANNINI, Tiziana a Luigi CONCILIO. PCR Detection of Genetically Modified Organisms: A Review. *Starch - Stärke* [online]. 2002, **54**(8), 321-327 [cit. 2018-04-25]. DOI: 10.1002/1521-379X(200208)54:8321::AID-STAR22223213.0.CO;2-J. ISSN 0038-9056. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/1521-379X%28200208%2954%3A8%3C321%3A%3AAID-STAR2222321%3E3.0.CO%3B2-J>
- [15] Pravidla pro počáteční a pokračovací kojeneckou výživu. *POTRAVINY INFO* [online]. Praha, 2016 [cit. 2018-04-20]. Dostupné z: <https://www.potravinynfo.cz/33/pravidla-pro-pocatecni-a-pokracovaci-kojeneckou-vyzivu-uniqueidgOkE4NvrWuMEMvw3uZDmFnm6DCh7FoiHICLOpBX5O-U/?query=kojeneck%E1%20v%FD%BEiva&serp=1>
- [16] „Dětské" potraviny. *Státní zemědělská a potravinářská inspekce* [online]. Brno, 2015 [cit. 2018-04-20]. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/clanek/detske-potraviny.aspx>
- [17] ALBERTS, Bruce. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science, 2002. ISBN 0815332181.
- [18] DALE, Jeremy a Simon PARK. *Molecular genetics of bacteria*. 5th ed. Chichester, West Sussex, England: Wiley-Blackwell, 2010. ISBN 9780470741849.
- [19] TEIF, Vladimír a Klemen BOHINC. Condensed DNA: Condensing the concepts. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* [online]. 2011, **105**(3), 208-222 [cit.

- 2017-06-08]. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2010.07.002. ISSN 00796107. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079610710000659>
- [20] HE, Siqian, Patricia ARSCOTT a Victor BLOOMFIELD. Condensation of DNA by multivalent cations: Experimental studies of condensation kinetics. *Biopolymers* [online]. 2000, **53**(4), 329-341 [cit. 2017-06-08]. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0282(20000405)53:4329::AID-BIP53.0.CO;2-6. ISSN 00063525. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291097-0282%2820000405%2953%3A4%3C329%3A%3AAID-BIP5%3E3.0.CO%3B2-6>
- [21] TRACHTOVÁ, Štěpánka. *Studium reverzibilní adsorpce nukleových kyselin na pevných nosičích: zkrácená verze PhD. thesis* [online]. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011, 107 s., 30 s. příl. [cit. 2016-04-04]. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=43544
- [22] VAN DER MAAREL, Johan, Ce ZHANG a Jeroen VAN KAN. A Nanochannel Platform for Single DNA Studies: From Crowding, Protein DNA Interaction, to Sequencing of Genomic Information. *Israel Journal of Chemistry* [online]. 2014, **54**(1112), 1573-1588 [cit. 2017-06-09]. DOI: 10.1002/ijch.201400091. ISSN 00212148.
- [23] ESSER, Karl-Heinz, Wolfram MARX a Thomas LISOWSKY. MaxXbond: first regeneration system for DNA binding silica matrices. *Nature Methods* [online]. 2006, **3**(1), - [cit. 2017-06-07]. DOI: 10.1038/nmeth845. ISSN 15487091. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nmeth845>
- [24] SIDDAPPA, Nagadenahalli, Appukuttan AVINASH, Mohanram VENKATRAMANAN a Udaykumar RANGA. *Regeneration of commercial nucleic acid extraction columns without the risk of carryover contamination*. b.r. DOI: 10.2144/000112327. Dostupné také z: <http://www.biotechniques.com/article/000112327>
- [25] TANAKA, Tsuyoshi, Ririko SAKAI, Ryosuke KOBAYASHI, Keiichi HATAKEYAMA a Tadashi MATSUNAGA. Contributions of Phosphate to DNA Adsorption/Desorption Behaviors on Aminosilane-Modified Magnetic Nanoparticles. *Langmuir* [online]. 2009, **25**(5), 2956-2961 [cit. 2017-06-07]. DOI: 10.1021/la8032397. ISSN 07437463. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la8032397>
- [26] BERÁNEK, Martin. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2016. ISBN 9788024632247.
- [27] VASILEVSKAYA, V., A. KHOKHLOV, Y. MATSUZAWA a K. YOSHIKAWA. Collapse of single DNA molecule in poly(ethylene glycol) solutions. *The Journal of Chemical Physics* [online]. 1995, **102**(16), 6595-6602 [cit. 2017-06-07]. DOI: 10.1063/1.469375. ISSN 00219606. Dostupné z: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.469375>
- [28] KAWAKITA, H., T. UNEYAMA, M. KOJIMA, K. MORISHIMA, Y. MASUBUCHI a H. WATANABE. Formation of globules and aggregates of DNA chains in DNA/polyethylene glycol/monovalent salt aqueous solutions. *The Journal of Chemical Physics* [online]. 2009, **131**(9), 094901- [cit. 2017-06-07]. DOI: 10.1063/1.3216110.

ISSN 00219606. Dostupné z: <http://scitation.aip.org/content/aip/journal/jcp/131/9/10.1063/1.3216110>

- [29] ESUMI, Kunio, Yoshie NAKAIE, Kennichi SAKAI a Kanjiro TORIGOE. Adsorption of poly(ethyleneglycol) and poly(amidoamine)dendrimer from their mixtures on alumina/water and silica/water interfaces. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2001, **194**(1-3), 7-12 [cit. 2017-06-07]. DOI: 10.1016/S0927-7757(00)00788-3. ISSN 09277757. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775700007883>
- [30] PRNKA, Tasilo a Karel ŠPERLINK. *BIONANOTECHNOLOGIE NANOBIOLOGIE NANOMEDICÍNA* [online]. Vyd. 1. Ostrava: Repronis, 2006 [cit. 2017-06-09]. ISBN 80-732-9134-7. Dostupné z: <http://www.csnmt.cz/getfile.php?type=file&IDfile=75>
- [31] SYED, A., G. MASOOD, Q. PEERVAIZ, V VIJESHEVER a B. SEEMI. RAPID DNA ISOLATION PROTOCOL FOR ANGIOSPERMIC PLANTS. *BULG. J. PLANT PHYSIOL* [online]. 2004, **30**(2), 25–33 [cit. 2018-04-24]. Dostupné z: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.336.3084>
- [32] KHANUJA, Suman, Ajit SHASANY, M.P. DAROKAR a Sushil KUMAR. Rapid Isolation of DNA from Dry and Fresh Samples of Plants Producing Large Amounts of Secondary Metabolites and Essential Oils. *Plant Molecular Biology Reporter* [online]. 1999, **17**(1), 74-74 [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.1023/A:1007528101452. ISSN 07359640. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1007528101452>
- [33] SAHU, Sunil, Muthusamy THANGARAJ a Kandasamy KATHIRESAN. DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. *ISRN Molecular Biology* [online]. 2012, **2012**, 1-6 [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.5402/2012/205049. ISSN 2090-7907. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/archive/2012/205049/>
- [34] WARUDE, Dnyaneshwar, Preeti CHAVAN, Kalpana JOSHI a Bhushan PATWARDHAN. DNA isolation from fresh, dry plant samples with highly acidic tissue extracts. *Plant Molecular Biology Reporter* [online]. 2003, **21**(4), 467-467 [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.1007/BF02772600. ISSN 0735-9640. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02772600>
- [35] VARMA, Astha, Harish PADH a Neeta SHRIVASTAVA. Plant genomic DNA isolation: An art or a science. *Biotechnology Journal* [online]. 2007, **2**(3), 386-392 [cit. 2018-04-21]. DOI: 10.1002/biot.200600195. ISSN 18606768. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/biot.200600195>
- [36] VINOD, K. *Total genomic dna extraction quality check and quantitation*. [online]. 2004, , 109–121 [cit. 2018-04-24]. Dostupné z: <http://www.freewebs.com/kkvinod/share/dnaextr.pdf>
- [37] DEMEKE, Tigst a G. JENKINS. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2010, **396**(6), 1977-1990 [cit. 2018-04-

- 21]. DOI: 10.1007/s00216-009-3150-9. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-009-3150-9>
- [38] TROJÁNEK, Zdeněk, Aleš KOVAŘÍK, Alena ŠPANOVÁ, Kristýna MAROŠIOVÁ, Daniel HORÁK a Bohuslav RITTICH. Application of magnetic polymethacrylate-based microspheres for the isolation of DNA from raw vegetables and processed foods of plant origin. *Journal of Food Processing and Preservation* [online]. 2018, **42**(1), 13384- [cit. 2018-05-04]. DOI: 10.1111/jfpp.13384. ISSN 01458892. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jfpp.13384>
- [39] BITEAU, Flore, Estelle NISSE, Alain HEHN, Sissi MIGUEL, Paul HANNEWALD a Frédéric BOURGAUD. A Rapid and Efficient Method for Isolating High Quality DNA from Leaves of Carnivorous Plants from the Drosera Genus. *Molecular Biotechnology* [online]. 2012, **51**(3), 247-253 [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.1007/s12033-011-9462-y. ISSN 1073-6085. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12033-011-9462-y>
- [40] ZHANG, Lingling, Bo WANG, Lei PAN a Junhua PENG. Recycling Isolation of Plant DNA, A Novel Method. *Journal of Genetics and Genomics* [online]. 2013, **40**(1), 45-54 [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.1016/j.jgg.2012.10.001. ISSN 16738527. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1673852712001920>
- [41] POREBSKI, Sue, L. BAILEY a Bernard BAUM. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter* [online]. 1997, **15**(1), 8-15 [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.1007/BF02772108. ISSN 0735-9640. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02772108>
- [42] PETERSON, Daniel, Kevin BOEHM a Stephen STACK. Isolation of milligram quantities of nuclear DNA from tomato (*Lycopersicon esculentum*), A plant containing high levels of polyphenolic compounds. *Plant Molecular Biology Reporter* [online]. 1997, **15**(2), 148-153 [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.1007/BF02812265. ISSN 0735-9640. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02812265>
- [43] RIBEIRO, R. a M. LOVATO. Comparative analysis of different DNA extraction protocols in fresh and herbarium specimens of the genus *Dalbergia*. *Genet. Mol. Res.* [online]. 2007, **6**(1), 173–187 [cit. 2018-04-24]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17469067>
- [44] BHAU, B.S., G. GOGOI, D. BARUAH et al. Development of an effective and efficient DNA isolation method for *Cinnamomum* species. *Food Chemistry* [online]. 2015, **188**, 264-270 [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.05.004. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615007177>
- [45] A simple “universal” DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with directly PCR amplification. *Genome Res.* [online]. 1995, **4**, 368–370 [cit. 2018-04-24]. Dostupné z: <https://genome.cshlp.org/content/4/6/368.full.pdf+html>
- [46] BERENSMEIER, Sonja. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2006, **73**(3), 495-504 [cit.

- 2016-04-04]. DOI: 10.1007/s00253-006-0675-0. ISSN 01757598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-006-0675-0>
- [47] ŠAFAŘÍK, Ivo a Mirka ŠAFAŘÍKOVÁ. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online]. 1999, **722**(1-2), 33-53 [cit. 2017-06-07]. DOI: 10.1016/S0378-4347(98)00338-7. ISSN 03784347. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378434798003387>
- [48] ŠAFAŘÍKOVÁ, Mirka a Ivo ŠAFAŘÍK. Magnetické separace v přírodních vědách a biotechnologiích. *Chemické listy* [online]. 1995, (89), 280–287 [cit. 2018-04-21]. Dostupné z: <http://www.nh.cas.cz/people/safarik/Chem-listy-biotechnologie-1995.pdf>
- [49] RÖDIGER, Stefan, Claudia LIEBSCH, Carsten SCHMIDT, Werner LEHMANN, Ute RESCH-GENGER, Uwe SCHEDLER a Peter SCHIERACK. Nucleic acid detection based on the use of microbeads: a review. *Microchimica Acta* [online]. 2014, **181**(11-12), 1151-1168 [cit. 2018-05-04]. DOI: 10.1007/s00604-014-1243-4. ISSN 0026-3672. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00604-014-1243-4>
- [50] RITTICH, Bohuslav a Alena ŠPANOVÁ. SPE and purification of DNA using magnetic particles. *Journal of Separation Science* [online]. 2013, **36**(15), 2472-2485 [cit. 2016-04-04]. DOI: 10.1002/jssc.201300331. ISSN 16159306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201300331>
- [51] SHAN, Zhi, Youjun JIANG, Mengyu GUO et al. Promoting DNA loading on magnetic nanoparticles using a DNA condensation strategy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2015, **125**, 247-254 [cit. 2018-04-21]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.10.036. ISSN 09277765. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776514005864>
- [52] BERENSMEIER, Sonja. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2006, **73**(3), 495-504 [cit. 2018-04-21]. DOI: 10.1007/s00253-006-0675-0. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-006-0675-0>
- [53] HORÁK, Daniel, Michal BABIČ, Hana MACKOVÁ a Milan BENEŠ. Preparation and properties of magnetic nano- and microsized particles for biological and environmental separations. *Journal of Separation Science* [online]. 2007, **30**(11), 1751-1772 [cit. 2016-04-09]. DOI: 10.1002/jssc.200700088. ISSN 16159306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200700088>
- [54] PEČOVÁ, Michaela. Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich využití v biochemii a biotechnologii. *Chemické listy* [online]. Praha: Česká společnost chemická, 2011, **105**(7), 524-530 [cit. 2016-04-04]. ISSN 0009-2770. Dostupné z: http://w.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_07_524-530.pdf
- [55] MCBAIN, Stuart, Humphrey YIU a Jon DOBSON. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*. [online]. 2008, **3**(2), 169-180, 169-180 s. [cit. 2016-04-10]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Jon_Dobson/publication/23155654_Magnetic_nanoparticles_for_gene_and_drug_delivery/links/09e41510140c02f0d7000000.pdf

- [56] HORÁK, Daniel a Nataliya BENEDYK. Magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres prepared by dispersion polymerization in the presence of electrostatically stabilized ferrofluids. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* [online]. 2004, **42**(22), 5827-5837 [cit. 2016-04-09]. DOI: 10.1002/pola.20406. ISSN 0887624x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pola.20406>
- [57] LU, An-Hui, E. L. SALABAS a Ferdi SCHÜTH. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2007, **46**(8), 1222-1244 [cit. 2017-06-09]. DOI: 10.1002/anie.200602866. ISSN 14337851. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200602866>
- [58] DORMANN, J. a D. FIORANI. *Magnetic properties of fine particles: proceedings of the International Workshop on Studies of Magnetic Properties of Fine Particles and their Relevance to Materials Science, Rome, Italy, November 4-8, 1991* [online]. New York: North-Holland, 1992 [cit. 2017-06-09]. ISBN 04-448-9552-3. Dostupné z: https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=WfqxXrswECgC&oi=fnd&pg=PP1&dq=magnetic+particles&ots=XyHrSy_ri4&sig=onm1d1n4x8UguljAow3fgmoOOE8&redir_esc=y#v=onepage&q&f=true
- [59] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010, 86 s. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [60] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- [61] JOSHI, Mohini a J. DESHPANDE. POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION. *International Journal of Biomedical Research* [online]. 2011, **2**(1), - [cit. 2018-04-25]. DOI: 10.7439/ijbr.v2i1.83. ISSN 0976-9633. Dostupné z: <http://ssjournals.com/index.php/ijbr/article/view/640>
- [62] HRSTKA, R, T KOLÁŘOVÁ, E MICHALOVÁ a B VOJTĚŠEK. Vývoj metod založených na PCR a jejich aplikace v onkologickém výzkumu a praxi: Development of PCR Methods and Their Applications in Oncological Research and Practice. *Klin. onkol.* [online]. 2004, **27**(1), 69–74 [cit. 2018-04-25]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/186/4485.pdf>
- [63] Namnožení DNA pomocí PCR. *Robotika.cz* [online]. 2002 [cit. 2016-04-10]. Dostupné z: <http://robotika.cz/articles/gerda/cs>
- [64] KRÁLOVÁ, Blanka. *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, 254 s. ISBN 80-708-0449-1.
- [65] WALKER, John, ed. a Ralph RAPLEY, ed. *Medical Biomethods Handbook* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2005 [cit. 2018-04-25]. ISBN 978-1-58829-288-9.
- [66] OPEL, Kerry, Denise CHUNG a Bruce MCCORD. A Study of PCR Inhibition Mechanisms Using Real Time PCR. *Journal of Forensic Sciences* [online]. 2010, **55**(1), 25-33 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1111/j.1556-4029.2009.01245.x. ISSN 00221198. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1556-4029.2009.01245.x>

- [67] DUDOVÁ, S. a R. HÁJEK. VYUŽITÍ METODY REAL-TIME PCR (KVANTITATIVNÍ PCR, PCR V REÁLNÉM ČASE) V HEMATOLOGII A STUDIU MNOHOČETNÉHO MYELOMU: APPLICATIONS OF REAL-TIME PCR IN HEMATOLOGY WITH SPECIAL FOCUS ON MULTIPLE MYELOMA. *Klinická onkologie* [online]. 2008, **21**(1), 220–222 [cit. 2018-04-26]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/144/3337.pdf>
- [68] KUBISTA, Mikael, José ANDRADE, Martin BENGTTSSON et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* [online]. 2006, **27**(2-3), 95–125 [cit. 2018-04-25]. DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.007. ISSN 00982997. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098299705000907>
- [69] *Praktikum z molekulární biotechnologie: Teoretické podklady – úloha č. 4*. Brno, 2015–2016. Teoretické podklady pro laboratorní úlohu. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- [70] SCHRADER, C., A. SCHIELKE, L. ELLERBROEK a R. JOHNE. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2012, **113**(5), 1014–1026 [cit. 2016-11-19]. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x. ISSN 13645072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- [71] HUGGETT, Jim, Tanya NOVAK, Jeremy GARSON, Clare GREEN, Stephen MORRIS-JONES, Robert MILLER a Alimuddin ZUMLA. Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon. *BMC Research Notes* [online]. 2008, **1**(1), 70- [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1186/1756-0500-1-70. ISSN 1756-0500. Dostupné z: <http://bmcresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-1-70>
- [72] LANTZ, Pär-Gunnar, Mikael MATSSON, Torkel WADSTRÖM a Peter RÅDSTRÖM. Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 1997, **28**(3), 159–167 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1016/S0167-7012(97)00979-2. ISSN 01677012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701297009792>
- [73] BESSETTI, Joseph. PCR INHIBITION: An Introduction to PCR Inhibitors. In: *Promega Corporation* [online]. USA, 2018 [cit. 2018-04-26]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Joseph_Bessetti/publication/285475103_An_introduction_to_PCR_inhibitors/links/5693bb7408ae425c6895fb36/An-introduction-to-PCR-inhibitors.pdf
- [74] KOVARIK, A. Rapid Concerted Evolution of Nuclear Ribosomal DNA in Two Tragopogon Allopolyploids of Recent and Recurrent Origin. *Genetics* [online]. 2005, **169**(2), 931–944 [cit. 2018-04-21]. DOI: 10.1534/genetics.104.032839. ISSN 0016-6731. Dostupné z: <http://www.genetics.org/cgi/doi/10.1534/genetics.104.032839>
- [75] OLSON, Nathan a Jayne MORROW. DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Research Notes* [online]. 2012, **5**(1), 668- [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1186/1756-0500-5-668. ISSN 1756-0500. Dostupné z: <http://bmcresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-5-668>

- [76] MARTELLOSSI, Chiara, Emily TAYLOR, David LEE, Giorgio GRAZIOSI a Paolo DONINI. DNA Extraction and Analysis from Processed Coffee Beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2005, **53**(22), 8432-8436 [cit. 2018-05-08]. DOI: 10.1021/jf050776p. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf050776p>
- [77] JAIN, Sona, Flávia JESUS, Giulia MARCHIORO a Edílson ARAÚJO. Extraction of DNA from honey and its amplification by PCR for botanical identification. *Food Science and Technology (Campinas)* [online]. 2013, **33**(4), 753-756 [cit. 2018-05-08]. DOI: 10.1590/S0101-20612013000400022. ISSN 1678-457X. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612013000400022&lng=en&nrm=iso&tlng=en
- [78] REZADOOST, Mohammad, Mojtaba KORDROSTAMI a Hassan KUMLEH. An efficient protocol for isolation of inhibitor-free nucleic acids even from recalcitrant plants. *3 Biotech* [online]. 2016, **6**(1), - [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1007/s13205-016-0375-0. ISSN 2190-572X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13205-016-0375-0>
- [79] KIM, C., C. LEE, J. SHIN, Y. CHUNG a N. HYUNG. A Simple and Rapid Method for Isolation of High Quality Genomic DNA from Fruit Trees and Conifers Using PVP. *Nucleic Acids Research* [online]. 1997, **25**(5), 1085-1086 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1093/nar/25.5.1085. ISSN 0305-1048. Dostupné z: <http://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/25.5.1085>
- [80] GRYSON, Nicolas. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2010, **396**(6), 2003-2022 [cit. 2018-05-07]. DOI: 10.1007/s00216-009-3343-2. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-009-3343-2>
- [81] HRNČÍKOVÁ, Z, E BERGEROVÁ a P SIEKEL. Effects of technological treatment on DNA degradation in selected food matrices of plant origin. *Journal of Food* [online]. 2008, **1**(47), 23–28 [cit. 2018-05-07]. ISSN 13368672. Dostupné z: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=SK2008000180>
- [82] YEMATAW, Zerihun, Sadik MUZEMIL, Daniel AMBACHEW et al. Genome sequence data from 17 accessions of *Ensete ventricosum*, a staple food crop for millions in Ethiopia. *Data in Brief* [online]. 2018, **18**, 285-293 [cit. 2018-05-09]. DOI: 10.1016/j.dib.2018.03.026. ISSN 23523409. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352340918302300>
- [83] FRATRIKOVA, Monika, Miroslav BAUER, Martin JOPCIK a Jana LIBANTOVA. SIMPLE VERIFICATION OF in vitro – GROWN CLONES OF THE GENUS *Drosera* L. USING ITS MOLECULAR MARKERS. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus* [online]. 2018, **17**(1), 159-164 [cit. 2018-05-09]. DOI: 10.24326/asphc.2018.1.15. ISSN 16440692. Dostupné z: http://wydawnictwo.up.lublin.pl/acta/hortorum_cultus/2018/1/15.pdf

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

bp – pár bází

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dNTP – 2'-deoxynukleotid-5'-trifosfát

dsDNA – dvouvláknová DNA

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

ELISA – analýza s enzymem vázaným na imunosorbet

PCR – polymerázová řetězová reakce

PDI – index polydisperzity

PEG – polyethylenglykol

PGMA – polyglycidyl methakrylát

PLL – poly-L-lysine

qPCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce

RNA – ribonukleová kyselina

ssDNA – jednovláknová DNA

TBE – Tris-borát-EDTA

TE – Tris-EDTA

UV – ultrafialové světlo