



**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

**MIKROEXTRAKCE DNA Z ROSTLINNÝCH TKÁNÍ  
ZELENINY**

DNA MICROEXTRACTION FROM PLANT VEGETABLE MATRIX

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. Filip Cesnak**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.**

**BRNO 2018**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1229/2017  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student: **Bc. Filip Cesnak**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.**  
Akademický rok: 2017/18

### Název diplomové práce:

Mikroextrakce DNA z rostlinných tkání zeleniny

### Zadání diplomové práce:

1. Vyhledání a kritické zpracování dostupné literatury k dané problematice.
2. Ověření kvality izolované DNA pomocí UV spektrofotometrie a gelové elektroforézy.
3. Zpracování získaných experimentálních výsledků.
4. Vyhodnocení experimentů formou diskuse.

### Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

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

-----  
Bc. Filip Cesnak  
student(ka)

-----  
doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **Abstrakt**

Diplomová práca bola zameraná na porovnanie dvoch mikroizolačných metód DNA s využitím magnetických častíc z potravín rastlinného pôvodu. Vzorky mali rôznorodé, komplexné matrice a boli v surovom (brokolica, list z jahodníka obecného) alebo technologicky opracovanom stave (jahodový džem). Prvá metóda využíva na manipuláciu magnetických častíc magnetický separátor a slúžila ako štandard pri porovnaní. Druhá metóda využíva paramagnetickú ihlu, ktorej výhodou by mala byť možnosť izolácie DNA vo vyššej kvalite bez výraznej kontaminácie polyfenolickými látkami či proteínmi. Vhodnosť metódy bola vyhodnotená štatistickým porovnaním výsledkov získaných obidvomi metódami. Kvalita DNA bola posúdená testovaním amplifikovateľnosti izolovanej DNA pomocou PCR. Amplifikované produkty boli vizualizované na agarózovom gély pomocou elektroforézy.

## **Abstract**

The aim of the thesis was the comparison of two DNA microextraction methods with the use of magnetic beads from food of plant origin. Samples had disparate and complex matrices and were either raw (broccoli) or processed (strawberry jam). The first method uses a magnetic separator for the manipulation of magnetic beads and was used as a standard for the comparison. The second method uses a paramagnetic needle, the advantage of which should be the possibility to isolate DNA of higher quality without a significant contamination by polyphenolic compounds or proteins. The former method was validated by statistic analysis of results obtained from both methods. DNA quality was judged by testing the amplificability of isolated DNA via PCR. The amplified products were visualised on an agarose gel with electrophoresis.

## **Kľúčové slova**

magnetické častice, mikroextrakcia DNA, polymerázová reťazová reakcia

## **Keywords**

magnetic beads, DNA microextraction, polymerase chain reaction

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracoval samostatne a že som všetky použité literárne zdroje správne a úplne citoval. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť použitá na komerčné účely len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

Bc. Filip Cesnak

Ďakujem vedúcemu diplomovej práce doc. Ing. Bohuslavovi Rittichovi, CSc. za ochotu a cenné rady a taktiež Ing. Milanovi Němečkovi za ochotu a pomoc pri vypracovaní praktickej časti diplomovej práce.

Bc. Filip Cesnak

# Obsah

<b>1 Úvod</b>	<b>8</b>
<b>2 Teoretická časť</b>	<b>9</b>
2.1 Extrakcia DNA	9
2.1.1 Extrakcia rastlinnej DNA	9
2.2 Extrakčné metódy	10
2.2.1 Tradičné metódy	10
2.2.2 Mikroextrakcia na pevnej fáze	10
2.2.3 Magnetické častice	11
2.2.3.1 Fyzikálne vlastnosti	11
2.2.3.2 Príprava magnetických častíc	12
2.2.4 Automatizovaná extrakcia	13
2.3 Autenticita potravín	14
2.3.1 Molekulárne techniky overenie autenticity	15
2.3.2 Polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov (RFLP)	17
2.3.3 Polymorfizmus jedného nukleotidu (SNP)	17
2.3.4 Opakované jednoduché sekvence (SSR)	18
2.3.5 Náhodne amplifikovaná polymorfná DNA (RAPD)	18
2.3.6 Polymorfizmus dĺžky amplifikovaných fragmentov (AFLP)	19
2.3.7 DNA Barcoding	20
2.3.8 Sekvenovanie novej generácie	20
<b>3 Cieľ práce</b>	<b>22</b>
<b>4 Materiál</b>	<b>23</b>
4.1 Vzorky	23
4.2 Chemikálie a roztoky	23
4.3 Komponenty pre konvenčnú PCR	24
4.4 Magnetické častice	25
4.5 Roztoky na izoláciu DNA	25
4.6 Roztoky pre agarózovú gelovú elektroforézu	26
4.7 Pomôcky a prístroje	26
<b>5 Metódy</b>	<b>27</b>
5.1 Príprava hrubého lyzátu buniek	27
5.2 Izolácia DNA s využitím magnetických nosičov	28
5.3 Izolácia DNA s využitím paramagnetickej ihly	29
5.4 Štatistické zhodnotenie výsledkov	29
5.5 Polymerázová reťazová reakcia	30
5.6 Agarózová elektroforéza	31
<b>6 Výsledky</b>	<b>32</b>
6.1 Spektrofotometrické stanovenie čistoty a koncentrácie DNA	32
6.1.1 Paramagnetická ihla	32
6.1.1.1 Vzorka brokolica	32

6.1.1.2	Vzorka jahodový džem . . . . .	33
6.1.1.3	Vzorka jahodový jogurt . . . . .	34
6.1.1.4	Vzorka jahodový list . . . . .	35
6.1.1.5	Vzorka mletá červená paprika . . . . .	36
6.1.2	Magnetický separátor . . . . .	37
6.1.2.1	Vzorka brokolica . . . . .	37
6.1.2.2	Vzorka jahodový džem . . . . .	38
6.1.2.3	Vzorka jahodový jogurt . . . . .	39
6.1.2.4	Vzorka jahodový list . . . . .	40
6.1.2.5	Vzorka mletá červená paprika . . . . .	41
6.1.3	Štatistické spracovanie výsledkov . . . . .	42
6.2	Overenie amplifikovateľnosti DNA . . . . .	43
<b>7</b>	<b>Diskusia</b>	<b>45</b>
7.1	Príprava hrubých lyzátov . . . . .	45
7.2	Izolácia DNA s využitím magnetického separátoru . . . . .	45
7.3	Izolácia DNA s využitím paramagnetickej ihly . . . . .	45
7.4	Štatistické spracovanie výsledkov . . . . .	45
7.5	Overenie amplifikovateľnosti DNA . . . . .	46
<b>8</b>	<b>Záver</b>	<b>47</b>
<b>9</b>	<b>Zoznam použitých skratiek a symbolov</b>	<b>54</b>

# 1. Úvod

Bezpečnosť a dohľadateľnosť potravín patria medzi dôležité činnosti vykonávané štátnymi kontrolnými orgánmi a prevádzkami, ktoré sú súčasťou potravinárskeho priemyslu. Kvalitné suroviny sú nevyhnutné pre produkciu potravín s adekvátnou nutričnou hodnotou a prijateľnou chuťou. Kontroly kvality sú realizované pomocou viacerých laboratórnych testov, ktoré predstavujú základ systému dohľadávania pôvodu potravín. Kontrola autenticity sa zameriava najmä na metódy analýzy proteínov alebo sekvencií DNA. Proteomické metódy pozostávajú z imunologických testov, elektroforetických či chromatografických techník. Tieto prístupy sú vhodné najmä pre čerstvé a technologicky neopracované potraviny, pri polotovaroach a tepelne, chemicky či mechanicky upravených potravinách sa vyznačujú nízkou efektivitou. V týchto prípadoch je vhodné použiť molekulárne diagnostické metódy na analýzu DNA, ktoré môžu byť aplikované či už na technologicky upravené výrobky, alebo potraviny s komplexnými matricami. Informácie získané z analýzy DNA sú častokrát ľahšie interpretovateľné a DNA je pomerne ľahko izolovateľná aj v prítomnosti ďalšieho organického materiálu.

Pre úspešnú analýzu je nutné zaistiť aby izolovaná DNA bola v dostatočnej kvalite a množstve. Častou metódou používanou pri skúmaní autenticity je polymerázová reťazová reakcia (PCR), ktorá je citlivá na prítomnosť inhibítorov vo vzorke DNA. Pri rastlinnom materiáli sa často jedná o zmes polysacharidov, fenolov a sekundárnych metabolitov. Vzhľadom na rozmanitosť rastlinných vzoriek je nutné metódy často optimalizovať na konkrétny prípad, alebo použiť komerčne dostupné kity. Výrazné úsilie bolo vynaložené na vývoj mikrometód za použitia malých objemov a bez toxických rozpúšťadiel. Pri moderných prístupoch overenia autenticity potravín ako next-generation sequencing (NGS) (sekvenácia druhej generácie) a DNA barcoding je kvalita DNA ešte dôležitejšia. Voľba správnej izolačnej metódy je teda základným kameňom každej analýzy genetického materiálu.



## 2. Teoretická časť

### 2.1. Extrakcia DNA

Zásľuhu o prvú úspešnú izoláciu DNA si môže pripísať švajčiarsky fyzik Friedrich Miescher. Dúfal, že sa mu podarí objasniť fundamentálne princípy života a chemické zloženie bunky. Pokúšal sa izolovať bunky z lymfatických uzlín pre jeho experiment, avšak získať dostatočne čistú vzorku lymfocytov sa ukázalo byť veľkou prekážkou.

V začiatkoch sa Miescher sústredil na rôzne typy proteínov a ukázal, že proteíny su majoritnou zložkou bunkovej cytoplazmy. Počas jeho experimentov si všimol, že látka ktorá sa vyzráža z roztoku po prídavku kyseliny sa znovu rozpustí po prídavku zásady. Toto bol prvý krát, kedy sa mu podarilo získať vyzrážanú DNA. Na separáciu DNA od proteínov vyvinul Miescher nový protokol na separáciu bunkového jadra od cytoplazmy a potom izoloval DNA [1].

Molekulárne diagnostické metódy sa stávajú čoraz častejšími technikami na detekciu a identifikáciu špecifických organizmov. Tieto metódy sa spoliehajú na schopnosť detekovať konkrétne DNA sekvencie v genóme cieľového organizmu. Metodológie založené na DNA zaznamenali výrazný pokrok, sú takmer nezastúpiteľné vo väčšine biologických oborov, zahŕňajúc diagnostiku ochorení, forenzné aplikácie a detekciu niekoľkých patogénnych mikroorganizmov v klinických, enviromentálnych a potravinových vzorkách. Zo všetkých použiteľných techník sú metódy založené na amplifikácii DNA najpoužívanejšími, vzhľadom na ich jednoduchosť, citlivosť, špecifickosť, opakovateľnosť a schopnosť detekovať stopové množstvá cieľovej DNA. Úspešnosť identifikácie závisí na viacerých faktoroch, jedným z kľúčových krokov zaisťujúcich presnú, konzistentnú a úspešnú identifikáciu je extrakcia DNA.

Väčšina protokolov publikovaných v priebehu posledných pár rokov sa od seba líši použitou stratégiou izolácie. Základom týchto metód je tepelná, chemická enzymatická, mechanická lýza buniek, alebo často aj ich kombinácia. Tým pádom v závislosti od cieľu extrakcie a typu vzorky je nutné použitie odlišných techník. Kvalita a kvantita extrahovanej DNA ovplyvňuje škálu downstream procesov použiteľných pre analýzu, keďže každá metóda má rozličnú citlivosť, tak môžu požadovať rozličnú kvantitu DNA a čistotu, kým môže byť ich použitie brané v úvahu [2].

#### 2.1.1. Extrakcia rastlinnej DNA

Detekcia rastlinného pôvodu potravín vyžaduje izoláciu DNA bez inhibítorov a v dostatočnej kvalite a kvantite. Extrakcia z potravinových produktov, ktoré sú v priebehu produkcie upravované, predstavuje problémy a limitácie, a preto vyžaduje špeciálne prístupy. Tým že rastlinný materiál a jeho DNA podlieha pri úprave potravín degradácií spôsobuje problémy pri polymerázovej reťazovej reakcii. Spracovanie potravín zahŕňa mechanický stres, vysoké teploty, výkyvy pH a fermentáciu. Tieto kroky môžu ovplyvňovať primárnu štruktúru DNA a spôsobujú napríklad hydrolýzu, oxidáciu a deamináciu DNA. Mechanizmus pôsobenia zvýšenej teploty na DNA je založený na depurinácii a deaminácií. Pri teplotách nad 100°C dochádza ku výraznému štiepeniu vlákien a nevratnej strate

sekundárnej štruktúry, napriek tomu pri teplotách používaných na sterilizáciu nedochádza k úplnej degradácii prítomnej DNA. Pri manipulácii so surovými materiálmi, môžu byť strižné sily jednými z prvých, ktoré zahajujú fragmentáciu DNA. Mechanický krok pri spracovaní sojových bôbov a to konkrétne ich mletie malo za následok výraznejšiu degradáciu DNA a samotné tepelné opracovanie pri výrobe sojových nápojov a tofu. Mechanická degradácia nie je pozorovaná iba pri spracovaní potravín ale takisto je spojená aj so samotnou purifikáciou a extrakciou DNA. Strižné sily sú spojené s miešaním, centrifugáciou, filtrovaním a ďalšími bežnými laboratórnymi operáciami [3, 4]. Spracovávanie potravín pri kyslom alebo zásaditom pH predstavuje dôležitý krok pri produkcii potravinových produktov a často môže byť pôvodcom hydrolytickej degradácie DNA. Pri kyslom pH sú puríny odstraňované z nukleových kyselín ako výsledok štiepenia N-glykosidických väzieb. Postupne sú hydrolyzované aj najbližšie 3',5'-fosfodiesterové väzby a dochádza ku štiepeniu DNA na kratšie fragmenty [5]

## 2.2. Extrakčné metódy

### 2.2.1. Tradičné metódy

Pletivá väčšiny rastlinných druhov obsahujú veľké množstvá sekundárnych metabolitov. Tieto látky môžu byť odvodené z mnohých biosyntetických dráh a hrajú dôležitú rolu pri homeostázy organizmu. Komplexné polysacharidy sú zodpovedné za osmoreguláciu a ochranu pred vysychaním organizmu rastlín. Prítomnosť týchto rastlinných sekundárnych metabolitov môže spôsobovať problémy pri extrakcii DNA. Niektoré koprecipitujú s DNA počas extrakcie a inhibujú ďalšie enzymatické modifikácie DNA, zahŕňajúc štiepenie reštrikčnými polymerázami a PCR. Veľké množstvá komplexných polysacharidov neumožňujú izolovať DNA použiteľnú na ďalšie analýzy a to najmä kvôli vysokej viskozite vodnej fázy čím znemožňujú efektívnu separáciu DNA od kontaminujúcich polysacharidov.

Viacero metód bolo vyvinutých na nariadenie, selektívne vyzrážanie alebo inaktiváciu kontaminujúcich látok. Na odstránenie polysacharidov sú používané vyššie koncentrácie cetyltrimethylammonium bromidu (CTAB) a to počas prvotného extrakčného kroku alebo počas viacerých krokov. Vyššie koncentrácie CTAB s prídavkom polyvinylpyrrolidonu (PVP) alebo polyvinylpolypyrrolidonu (PVPP) môžu pomôcť odstrániť kontaminujúce polyfenoly. Ďalej niektoré protokoly odporúčajú použitie askorbovej kyseliny, diethylthio-karbamovej kyseliny (DIECA) a 2-merkaptoetanolu na obmedzenie oxidácie a degradácie DNA [6].

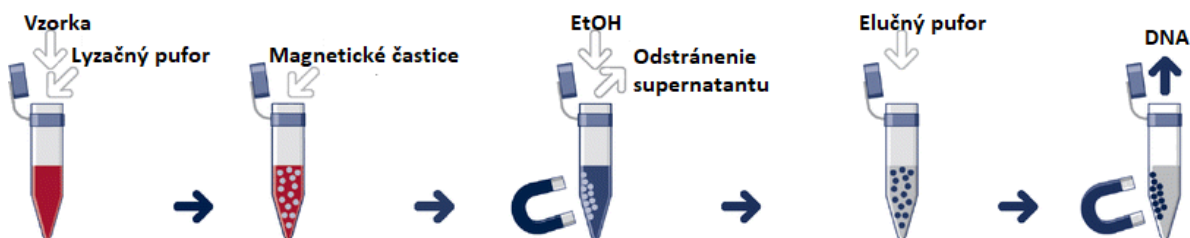
### 2.2.2. Mikroextrakcia na pevnej fáze

V analytickej chémii je mikroextrakcia na pevnej fáze jednou z najpopulárnejších, ekologicky prijateľných techník používaných na prípravu vzoriek. Táto technika vylučuje dve hlavné nevýhody klasickej extrakcie na pevnej fáze (SPE) a to, časovo náročnú extrakciu a použitie organických rozpúšťadiel. Umožňuje analýzu vzoriek všetkých skupenstiev aj s komplikovanými maticami. Mikroextrakcia sa skladá z dvoch fundamentálnych krokov. Adsorpcia analytu na povrch sorbentu a desorpciu analytu za použitia teploty.

V posledných rokoch sa magnetické častice dostali do stredobodu záujmu v analytických vedách. Magnetická extrakcia na pevnej fázy zahŕňa pridávanie magnetických častíc do roztoku obsahujúceho vzorku. Magnetické jadro týchto častíc je pokryté oxidmi hliníku, rôznymi polymérmi, alebo silikagelom použitím sol-gel techniky. Funkčné skupiny môžu byť na ich povrch naviazané pomocou silanizácie. Analyty sú adsorbované na povrch týchto magnetických častíc a potom sú separované z vodného roztoku pomocou vonkajšieho magnetického poľa [7].

### 2.2.3. Magnetické častice

Magnetické častice sa vyznačujú mnohými prednosťami, ktoré sú uplatniteľné v širokej škále oborov, ako biokatalyzátory, označovanie buniek, detekcia, bioseparácia, odstránenie kovov a cieľená donáška liečiv. Na prispôsobenie častíc aby boli schopné viazať biomolekuly sú potrebné povrchové modifikácie alebo funkcionalizácia za použitia polymérov. Svoje magnetické vlastnosti získavajú pomocou enkapsulácie nanočastíc magnetickej látky, ako napríklad oxid železitý vo vnútri polyméru. Supramagnetizmus môže byť pozorovaný pri použití železitých častíc vo veľkosti rádu nanometrov. Častice sa stávajú okamžite magnetizovanými pri vystavení magnetickému pólu, ale svoj magnetický moment strácajú akonáhle je magnetické pole odstránené. Magnetické častice je možné použiť na izoláciu nukleových kyselín priamo z hrubého lyzátu buniek, vďaka ich magnetickým vlastnostiam je ich možné odstrániť jednoducho a to aj z viskózných roztokov [8, 9].



Obrázok 2.1: Schéma priebehu magnetickej extrakcie na tuhej fáze, prebrané z [10]

#### 2.2.3.1. Fyzikálne vlastnosti

Častice by mali byť s ohľadom na ich tvar guľovitého tvaru, kvôli lepším hydrodynamickým vlastnostiam a nižšej tendencii sa rozpadnúť. Dva ďalšie veľmi dôležité parametre sú veľkosť častíc a index polydisperzity. Všeobecne čím potrebujeme väčšiu väzobnú kapacitu častíc, tým menší bude ich rozmer. Nevýhodou je že magnetická sila pôsobiaca na častice sa lineárne znižuje ich pomerom medzi objemom a magnetizáciou. Magnetické vlastnosti častice je možné optimalizovať zvýšením obsahu magnetického materiálu, tým ale rastie aj ich rýchlosť sedimentácie, keďže oxidy železa sú omnoho hustejšie ako voda. Kompromisom sú častice s dobrou magnetickou odozvou a dostatočným špecifickým povrchom. Distribúcia veľkosti častíc by mala byť ideálne monodisperzná, aby sme zaistili častice s dobre definovanými fyzicko-chemickými vlastnosťami [11].

### 2.2.3.2. Príprava magnetických častíc

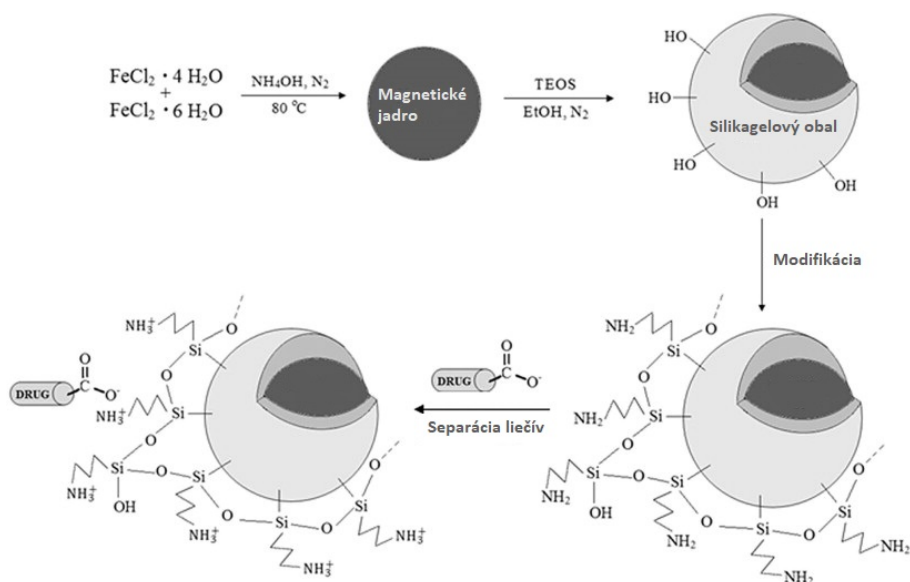
Železo, nikel a kobalt sú tri známe prvky s feromagnetickými vlastnosťami. Existuje viacero magnetických materiálov zahŕňajúc kovy, zliatiny a ferritov, ktoré sú založené na feromagnetických materiáloch. Oxidy kovov ako  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  alebo  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  sú často používané pri mnohých aplikáciach vďaka ich jednoduchej syntéze, kontrolovateľnej magnetizácii, superparamagnetizmu a nízkej toxicite. Navyše oxid železitý je prírodný minerál, ktorý vykazuje najväčší magnetizmus. Častice primárnych oxidov železa však často agregujú do veľkých zhlukov a strácajú svoje jedinečné vlastnosti spojené s výskytom izolovaných častíc [12].

Ďalším trendom je použitie iónových kvapalín, skupina solí s prijateľnými hranicami kvapalnosti. Majú veľa zaujímavých vlastností ako nízka volatilita, dobrá tepelná stabilita, znovupoužitelnosť a veľké rozmedzie viskozít. Magnetické iónové kvapliny sú špeciálnou podskupinou pretože silne interagujú s vonkajším magnetickým polom. Najväčšou prekážkou nasadeniu tohto prístupu do praxe je kompromis medzi dostatočnou interakciou s magnetickým polom a dobrým hydrofóbnym charakterom, aby bola umožnená separácia vo vodnom roztoku. Extrahovaná DNA bola dostatočnej kvality a bez modifikovanej sekvencie, takže tento postup by mohol byť vhodný na budúce aplikácie [13].

V súčasnosti je najčastejšie používaným materiálom na obal magnetického jadra silikagel, ktorý na svojom povrchu môže niesť rôzne funkčné skupiny. Silikagel je využívaný z dôvodu veľmi dobrej dostupnosti tohto materiálu, ale aj vďaka jeho špecifickým vlastnostiam. Obal zo silikagelu sa vyznačuje vysokou tepelnou a mechanickou stabilitou, a jeho povrch môže byť ľahko modifikovaný či už organickými alebo anorganickými funkčnými skupinami cez silanové skupiny. Voľné silanové skupiny môžu prispievať ku adsorbci polárnych zlúčenín. Naopak, modifikácia silikagelového povrchu výmenou voľných silanových skupín za amino skupinu  $-\text{NH}_2$  znižuje interakciu medzi vysoko polárnymi adsorbovanými zlúčeninami na povrchu a sorbentom, čím umožňuje ich extrakciu.

Silikagel môže byť nanosený na povrch magnetického jadra s využitím sol-gelovej techniky. Využitie Stöberovej metódy umožňuje kontrolovať veľkosť, porozitu a morfológiu magnetických častíc. Častice získané týmto spôsobom sú špecifické svojou sfericitou a uniformnou disperziou. Sol-gelová metóda zahŕňa prídavok ethanolu, deionizovanej vody a amónnej vody ako katalyzátoru do reakčnej nádoby za stáleho miešania pri špecifickej teplote. K pripravenému roztoku je pridávaná zmes tetraethoxysilanu (TEOS) a ethanolu za stáleho miešania, ktoré môže byť nahradené ultrazvukovým sonikátorom. Celý proces prebieha v atmosfére inertného plynu. Následne dochádza ku hydrolyze Si-O väzieb v TEOSe a formácií hydroxylových väzieb a kondenzácií za vzniku silikagelovej siete [14]

Povrch magnetického jadra môže byť taktiež upravený prírodnými, alebo syntetickými polymérmi. Prírodné polyméry sú používané najmä na biomedicínske aplikácie z dôvodu ich biokompatibility ako napríklad dextran, škrob alebo albumín. Veľa prírodných polymérov však nemá dostatočnú mechanickú pevnosť. Preto sú používané syntetické polyméry ako polyethylenglykol (PEG), polyvinylalkohol (PVA), kyselina poly-L-mliečna (PLA), alebo historicky najviac používané polyméry ako polystyrén (PS) a polymethylmethakrylát (PMMA). Využitie polystyrénu je však limitované jeho hydrofóbnymi vlastnosťami.



Obrázok 2.2: Syntéza silikagelom obalených magnetických častíc s povrchovou modifikáciou amino skupinami na separáciu liečív, prebrané z [14]

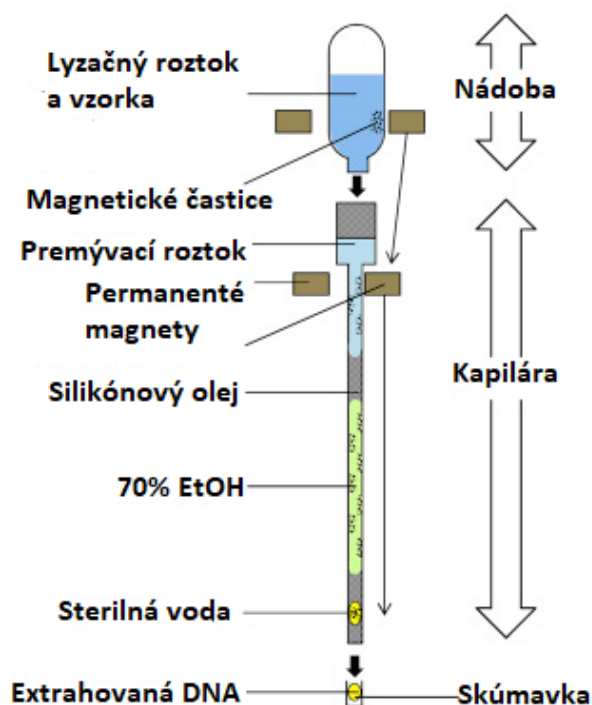
Častým javom sprevádzajúcim použitie hydrofóbného materiálu je adsorpcia proteínov na povrch častíc. Adsorpcia má negatívny vplyv na stabilitu DNA počas dlhodobého skladovania, keďže koextrahované nukleázy môžu štiepiť DNA. Použitie hydrofilných polymérov na báze P(HEMA)-poly(2-hydroxyethylmethacrylate) a PGMA zmiernilo efekt adsorpcie proteínov na povrch častíc [15, 16].

Nové prístupy často používajú materiály založené na uhlíku ako sorbenty. Magnetické uhlíkové trubičky (mCNT) sú jedným z príkladov. Svoj povrch majú modifikovaný tak, aby niesol záporný náboj a pridaním železných alebo nikelných iónov dochádza ku elektrostatickej interakcií. Tieto kovové ióny často pôsobia ako nukleačné prekursorzy na následnú agregáciu  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanočastíc. Uhlíkové trubičky boli úspešne použité ako sorbenty pri extrakcii na pevnej fázy alebo ako chromatografická stacionárna fáza. Medzi ďalšie používané materiály patrí graphene alebo nanokarbóny získané z alternatívnych uhlíkových zdrojov ako je glukóza [17, 18].

## 2.2.4. Automatizovaná extrakcia

Samotná extrakcia DNA je krok, ktorý pri analýze DNA zaberá relatívne veľa času a je veľmi náchylná na chybovosť personálu v laboratóriu. S využitím magnetických častíc je možné proces automatizovať a tým minimalizovať príspevok individuálnych chýb a takisto proces urýchliť. Samotných automatizačných prístupov bolo vyvinutých pomerne veľké množstvo. Prietokový systém zahŕňa nádobu obsahujúcu lyzačný pufo so silikagelovými magnetickými časticami a permanentý magnet, ktorým je možné kontrolovať pohyb magnetických častíc. Po lýze buniek je uvoľnená DNA naviazaná na magnetické častice, ktoré sú následne vpustené do kapiláry obsahujúcej premývací roztok (70% EtOH). V okolí kapiláry sú po oboch stranách rozmiestnené permanentné magnety, ktoré spôsobujú pohyb častíc medzi stenami kapiláry a tým zefektívňujú ich premytie. Na konci procesu sú častice z kapiláry prenesené do mikroskúmavky obsahujúcej eluačný pufo do ktorého

je uvoľnená čistá DNA. Celý proces je ovládaný pomocou motoru a riadiacej jednotky [19].



Obrázok 2.3: Diagram automatizovaného extrakčného zariadenia, prebrané z [19]

Svoje využitie pri automatizácii našli taktiež mikrofluidické čipy. V kanáloch čipov tečie kvapalina laminárnym tokom, ktorý je charakteristický nízkimi Reynoldsovými číslami čo umožňuje manipuláciu prítomnej kvapaliny s vysokou presnosťou. Avšak laminárny tok výrazne obmedzuje miešanie kvapaliny a tým spôsoboval problémy pri pokusoch aplikovať mikrofluidické čipy na biochemické procesy, kde je optimálne miešania nevyhnutné. V mikrofluidických operáciach sa podarilo túto nevýhodu obísť možnosťou imobilizácie biomolekúl na povrchy a tým umožniť lokalizované reakcie. Použitie magnetických častíc ako nosných štruktúr má veľké výhody, keďže zjednodušujú architektúru čipu, sú ľahko modifikovateľné a komerčne dostupné. Použitím permanentných magnetov alebo elektromagnetov je možné manipulovať s magnetickými časticami [20].

Použitím mikrofluidického čipu je možné skrátiť proces extrakcie DNA na 15 minút pri použití štiepenej  $\lambda$ -fágovej DNA ako vzorky. Účinnosť tejto extrakcie bola 50% bez zásahu operátora, čím bolo možné získať opakovateľnejšie výsledky [21].

## 2.3. Autenticita potravín

Spotrebitelia a potravinársky priemysel sa stávajú čím ďalej tým viac opatrnými pri produktoch, ktoré konzumujú alebo ponúkajú. Výber spotrebiteľa je závislý na socio-ekonomických faktoroch ako je kultúra, náboženstvo, kvalita, cena, atp. Rýchlejšie presun informácií a globalizácia zmenili autenticitu potravín a bezpečnosť na jeden z hlavných problémov, ktorý si vyžaduje pozornosť svetových regulačných orgánov.

Prípady so zámenou jednotlivých zložiek potravín a infekcií prenášaných potravinárskymi produktami sú príkladmi, ktoré nútia spotrebiteľov aby rozlišovali medzi kvalitnejšími výrobkami a žiadali pravdivé označenie pôvodu a zloženia výrobkov. Na dosiahnutie kontroly týchto faktorov je nutný technický prístup zahŕňajúci genomické a proteomické metódy. Verifikácia a identifikácia jednotlivých zložiek potravín a ich mikrobiálnych profilov je možné dosiahnuť testovaním potravín. Tieto laboratórne testy sú jedným z kľúčov, ktoré umožňujú predchádzať podvodom s označením, alebo výskytu ochorení. Samotné testovanie sa môže spoliehať na metodológie zameriavajúce sa na proteíny, metabolity alebo DNA obsiahnutú v potravine. DNA má výhodu vyššej stability a je menej ovplyvnená spracovaním potravín ako proteíny či metabolity, poskytuje tým väčšiu citlivosť na testovanie je veľmi užitočným nástrojom pre agro-potravinársky sektor. Zo všetkých dostupných metód, amplifikačné metódy: najmä polymerázová reťazová reakcia (PCR) a real-time PCR sú najpopulárnejšie vďaka ich jednoduchosti, citlivosti, špecificite, reprodukovateľnosti a schopnosti detekovať malé množstvá cieľovej DNA [22]

### 2.3.1. Molekulárne techniky overenie autenticity

Molekulárna analýza pre rozlíšenie originálnych (autentických) potravín a prísad od nedeklarovaných je hlavnou metodológiou pri overovaní autenticity. Napriek využívaniu tradičných metód ich postupne genomické a proteomické techniky vytlačujú a nahradzajú tie pôvodné. Vzhľadom na identickosť DNA vo všetkých bunkách organizmu nezávisí na časti organizmu z ktorej je DNA izolovaná. Vysoká stabilita DNA ďalej umožňuje analyzovať aj potraviny ktoré boli tepelne, mechanicky či chemicky opracované a takisto umožní odhaliť aj stopové kontaminanty. Molekulárne metódy su priamo závislé na vysoko špecifickom amplifikovaní konzervovaných fragmentov DNA - polymerázovej reťazovej reakcií. Na druhú stranu, proteíny môžu byť špecifickými ukazateľmi pre mnoho vlastností potravinových produktov, preto proteomické metódy môžu byť aplikované na systematické vyhľadávanie nových proteínových ukazateľov alebo aj peptidov. Výhoda genomických metód spočíva v možnosti amplifikácie minimálneho množstva nukleotidovej vzorky, zatiaľ čo proteomické identifikujú špecifický produkt kodovaný v DNA [24].

DNA markery, ktoré sú založené na analýze unikátnych genetických štruktúr sú unikátne vďaka tomu, že nie sú ovplyvnené fyziologickými a environmentálnymi podmienkami vplývajúcimi na organizmus. Takisto nie sú špecifické pre jednotlivé pletivá a je ich možné detekovať v ľubovoľnom štádiu vývoja rastliny. V porovnaní s fenotypickými a chemickými markermi, umožňujú efektívnu, presnú a finančne nenáročnú možnosť testovania autenticity stoviek vzoriek simultánne. Genetický marker môže byť definovaný ako gén alebo nukleotidová sekvencia na chromozóme, ktorý ma potenciál diferencovať bunku, jednotlivcov alebo druh. Keďže sú DNA sekvencie špecifické, je možné ich identifikovať pomocou známych molekulárnych ukazateľov, ktoré dokážu odlíšiť konkrétnu sekvenciu DNA od skupiny neznámych [25].

V nukleotidových sekvenciách identifikujú variácie nukleotidovej sekvencie génu DNA markery, ktoré môžu zvýrazniť medzi a mimo druhovú diverzitu. Majú veľký informačný potenciál vďaka ich veľkému počtu a stabilite. Všeobecne ich môžeme rozdeliť

Tabuľka 2.1: Používané PCR-technicky na analýzu potravín prebrané z [23]

Molekulárne-diagnostická metóda	Princíp	Využitie
Polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov (PCR-RFLP)	Produkty PCR sú štiepené reštrikčnými enzýmami, nasledované gelovou elektroforézou alebo blotting technikami. DNA fragmenty môžu byť vizualizované priamo alebo pomocou označených sônd	Hovädzie, kuracie, konské a bravčové mäso
Náhodne amplifikovaná polymorfná DNA (PCR-RAPD)	Jeden primer ľubovolnej nukleotidovej sekvencie je použitý na amplifikáciu templátovej DNA na rôznych špecifických miestach kde produkuje druhovo špecifický profil amplifikovaných fragmentov DNA	Ryby, zelenina
Polymorfizmus dĺžky amplifikovaných fragmentov (PCR-AFLP)	Genomická DNA je najskôr štiepená reštrikčnými enzýmami a následne s použitím syntetických adaptorov ligovaná, následuje amplifikácia pomocou PCR a tvorba špecifického profilu	Ryby, olivový olej, cestoviny
Multiplex PCR	Viacero párov primerov je využitých v jednej PCR reakcii na amplifikáciu rôznych špecifických DNA sekvencií na rýchlu analýzu	Rybie produkty, druhy šafranu

do troch skupín: hybridizačné markery ako polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov (RFLP), markery založené na PCR ako náhodný polymorfizmus amplifikovanej DNA (RAPD), DNA Barcoding a sekvenčné markery ako polymorfizmus jedného nukleotidu (SNP).

RFLP boli prvými markermi použitými na analýzu medzi a mimo druhových variácií na genomickej úrovni. Variácie môžu byť odhalené porovnaním štiepených DNA vzorov z rôznych vzoriek. Výhodou RFLP markerov je ich opakovateľnosť a dôkaz autenticity viacerých typov výrobkov. Napriek tomu je ich detekcia časovo náročná, drahá v súčasnosti málo používaná [26].



Tabuľka 2.2: Porovnanie používaných DNA markerov, prebrané z [25]

	<b>RFLP</b>	<b>RAPD</b>	<b>AFLP</b>	<b>ISSR</b>	<b>SSR</b>	<b>SCAR</b>
Zastúpenie v genóme	Vysoké	Veľmi vysoké	Veľmi vysoké	Stredné	Stredné	Vysoké
Množstvo požadovanej DNA	2-5 $\mu$ g	15-30 ng	200-300 ng	15-30 ng	30-50 ng	30-50 ng
Opakovateľnosť	Veľmi vysoká	Veľmi nízka	Vysoká	Stredná	Veľmi vysoká	Veľmi vysoká
Možnosť automatizácie	Obtiažne	Áno	Nie ak je použitá rádioaktívita	Áno	Áno	Áno

### 2.3.2. Polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov (RFLP)

Táto metóda využíva amplifikáciu predom vybraných DNA fragmentov s využitím univerzálnych primerov, nasledovanú štiepením s reštrikčnými endonukleázami, ktoré rozpoznávajú špecifické krátke sekvencie (štyri až šesť nukleotidov) amplifikovaného fragmentu a štiepia DNA v týchto miestach. Tieto fragmenty môžu byť v ďalšom kroku analyzované s využitím gelovej elektroforézy, každá vzorka tvorí unikátny štiepny vzor, ktorý môže byť porovnaný s referenčnou vzorkou na určenie autenticity. Vývoj tejto metódy vyžaduje informáciu o sekvencii vybraného DNA fragmentu aby mohol byť štiepený špecifickými endonukleázami [27].

RFLP bolo úspešne použité na overenie autenticity u vzoriek sušeného mäsa pochádzajúceho z piatich druhov chovaných zvierat. U vzoriek bolo preukázané nahrádzanie deklarovaného jačieho mäsa hovädzím. Rozlíšenie druhov bolo založené na rozdieloch v géovej sekvencii mitochondriálneho 12S rRNA génu. Rozlíšenie však bolo možné vďaka predpokladu kontaminánt a porovnaním so štiepnym profilom hovädzieho mäsa, vzhľadom na to je táto technika vhodná najmä pre vzorky kde je deklarovaná prísada nahradzaná predom predpokladanými náhradami [28].

### 2.3.3. Polymorfizmus jedného nukleotidu (SNP)

Využitie rôznych markerov pri dohľadávaní pôvodu potravín je vždy sledované s veľkým záujmom, najmä ak môžu poskytnúť komplementárne informácie. Vyskytujú sa na pozícii jednej bázy v genóme, pri ktorej existujú dve rôzne alely u jedincov v populácii alebo medzi rôznymi druhmi rastlín. Početnosť najmenej frekventnej alely by mala byť väčšia ako 1 %. Najväčšie technické inovácie v analýze polymorfizmov DNA boli dosiahnuté práve v obore polymorfizmov jedného nukleotidu. V genóme sú rovnomerne distribuované a patria medzi najpočetnejšie naprieč všetkými živými organizmami. Záujem o SNP, ako genetické markery pre dohľadanie autenticity potravín, rastie z viacerých dôvodov. Viacero technológií na detekciu polymorfizmov je založených na amplifikácii veľmi malých fragmentov, preto je možné tieto markery potenciálne použiť aj na vysoko fragmentovanú

DNA. Navyše, kvôli nízkej informačnej hodnote SNP nie sú vhodné pre analýzu komplexných vzoriek [29, 30].

#### 2.3.4. Opakované jednoduché sekvence (SSR)

Tieto DNA markery sú jednými z najpoužívanejších v agro a potravinárskom sektore pri dohľadávaní autenticity. Majú výhodu v tom že vychádzajú z PCR, ale v porovnaní s ostatnými markermi, závisí úspešná analýza na vývoji vysoko presných detekčných systémov. Pri analýze je nutné mať schopnosť rozlíšiť veľkosť jednotlivých fragmentov a takisto aj rozlíšiť rôzne fluorescenčné farbivá. Analyzátoary DNA schopné detekovať fluorescenčné farbivá a takisto aj roboty na automatickú prípravu reakcií umožňujú dosiahnuť vysokú efektivitu a takisto opakovateľnosť, vďaka čomu klesá variabilita v rámci laboratória.

Spomedzi kodominantných markerov, majú SSR veľmi málo problémov s rozličnou amplifikáciou, keďže alely SSR lokusu sú často rovnakej veľkosti. Kodominantné markery sú veľmi užitočné pre produkty rastlinného pôvodu, umožňujú jednoduchšiu analýzu polyploidných a hybridných druhov. Je predpokladané, že väčšina komerčných druhov rastlín sú hybridy, vďaka čomu podávajú kodominantné markery viac informácií na rozlíšenie druhov rastlín [31].

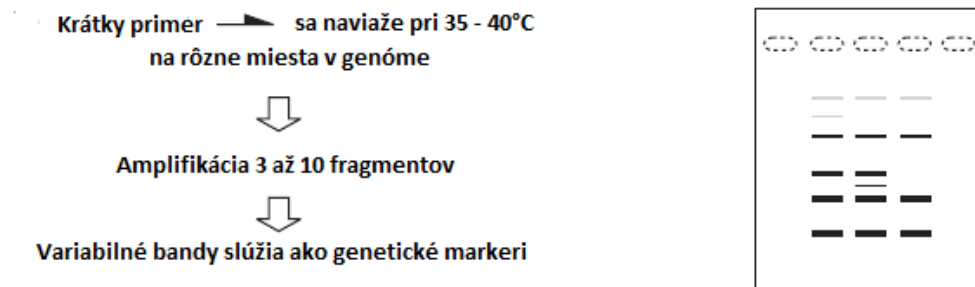
SSR markery boli úspešne použité na odlíšenie druhov rajčín, falošne označovaných ako odroda San Marzano od pravých. Na analýzu bolo použitých 14 SSR lokusov, ktoré boli vybrané kvôli ich vysokému polymorfizmu a schopnosti produkovať krátke PCR produkty. Úspešne sa podarilo amplifikovať iba tie, ktoré poskytovali po úspešnej amplifikácii DNA fragmenty o dĺžke 94 až 167 bp. SSR analýza potvrdila, že nezávisle na dĺžke amplifikovanej sekvencie existuje limit vo veľkosti amplikónov keď je použitá genomická DNA z konzervovaných rajčín. Použitím DNA polymeráz s vyššou aktivitou by malo byť možné dosiahnuť aj väčšie fragmenty, avšak malá veľkosť nepredstavuje limitáciu pre SSR profilovanie [32, 33].

#### 2.3.5. Náhodne amplifikovaná polymorfna DNA (RAPD)

Táto analýza je špecializovaným typom PCR, ktorá zahŕňa krátke primery s s ľubovoľnými nukleotidovými sekvenciami o dĺžke 10 bázových párov. Primery sa náhodne viažu na rôzne miesta v genóme. Po úspešnej amplifikácii krátkych fragmentov DNA je možné ich analyzovať pomocou agarózovej gelovej elektroforézy, kde polymorfizmy sú identifikované na základe bandových vzorov.

Analýza RAPD sa vyznačuje nízkou cenou a je často prvým krokom pri rozlišovaní rastlinných druhov. Nevýhodou je neopakovateľnosť, keďže primery sa viažu na náhodné a vždy odlišné miesta v genóme [34]. Táto metóda bola preto používaná hlavne v minulosti, z dôvodu absencie kompletných sekvencií vo verejných databázach [35].

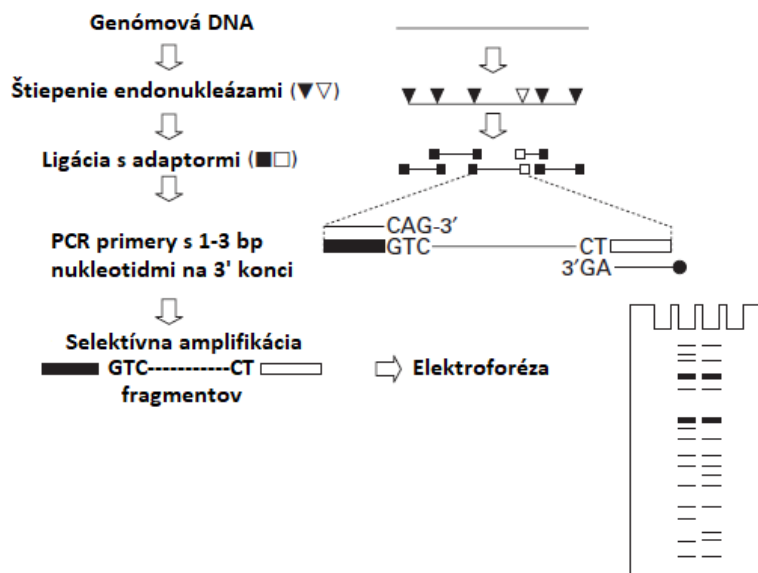
## Chromozomálna DNA



Obrázok 2.4: Schéma analýzy RAPD, prebrané z [34]

### 2.3.6. Polymorfizmus dĺžky amplifikovaných fragmentov (AFLP)

Táto technika je založená na amplifikácii reštrikčných fragmentov ligovaných ku syntetickým adaptorom za použitia PCR. Fragmenty sú následne amplifikované použitím primerov. Primery obsahujú na 3' konci 1-3 selektívne bázy, ktoré presahujú do reštrikčných fragmentov za adaptéry, aby bolo možné znížiť počet amplifikovateľných bandov z komplexného genómu. AFLP generuje stovky informatívnych genetických markerov, ktoré zvyšujú šancu detekcie druhovo a populačne špecifických polymorfizmov. Separáciou amplifikačných produktov na polyakrylamidových géloch získame 50 až 100 rôznych bandov, ktoré môžu byť ľahko detekované a vyhodnotené. Medzi ďalšie benefity AFLP oproti ostatným technikám je ich vysoký potenciál na identifikáciu neznámeho druhu, keďže AFLP nevyžaduje predošlú znalosť druhu ktorý sa snažíme identifikovať [36, 37].



Obrázok 2.5: Schéma analýzy AFLP, prebrané z [38]

### 2.3.7. DNA Barcoding

Nedostatok štandardizácie a univerzality je najrelevantnejším problémom molekulárne-diagnostických metód. V roku 2003 bol vyvinutý nový identifikačný systém DNA barcoding výskumníkmi z Guelph Univerzity. Tento prístup je založený na analýze variability vo vybranej oblasti genómu označovanej ako "DNA barcode". Tento systém sa ukázal byť užitočným pri riešení taxonomických problémov v niekoľkých teoretických a praktických aplikáciách. DNA barcoding nie je čisto inovatívny prístup, pretože molekulárne-diagnostické metódy sa už bežne používali. Avšak, jeho výhoda spočíva v kombinovaní troch dôležitých inovácií: molekularizácií identifikačných procesov (výskum variability DNA na využitie v taxonómii), štandardizácií metódy (od odberu vzorky až po analýzu molekulárnych výstupov) a automatizácií vďaka počítačom.

Ideálny DNA barcode vyžaduje dve fundamentálne vlastnosti: veľké taxonomické pokrytie a vysokú rozlišovaciu schopnosť. Taxonomické pokrytie alebo univerzalita odkazujú na správnu amplifikáciu oblasti genómu vybranú ako DNA barcode v najširšom rozmedzí druhov. Rozlišovacia schopnosť umožňuje presnú identifikáciu rozličných druhov, založenú na medzidruhových rozdieloch v barcodovej sekvencii. Všeobecne by teda DNA barcode mal mať veľkú variabilitu naprieč rôznymi druhmi a malú variabilitu v rámci jedného druhu [39].

Izolácia čistej DNA o vysokej molekulárnej hmotnosti je kritickou pre úspešnú aplikáciu molekulárne-diagnostických metód. Toto môže byť často veľkou prekážkou, keďže je v upravených rastlinných výrobkoch DNA často degradovaná alebo vzorka obsahuje veľké množstvá polysacharidov, polyfenolov alebo ďalších sekundárnych metabolitov. Viaceré komerčné kity a upravené tradičné metódy sú schopné izolovať DNA v kvalite vhodnej na ďalšiu analýzu. Pri úspechu PCR a veľkosti amplikónov bola pozorovaná negatívna korelácia. Pre poškodenú DNA je preto odporúčané vytvorenie podmienok na vznik krátkych amplikónov [40].

### 2.3.8. Sekvenovanie novej generácie

V posledných rokoch je možné pozorovať mohutný rozvoj v DNA sekvenáčnych technológiách. Sekvenácia novej generácie priniesla revolúciu v analýze DNA vďaka rýchlosti, výkonu a dĺžke čítacieho rámcu. Oproti prvej generácii metód ako Sangerovo sekvenovanie priniesla 3 hlavné výhody: knižnice sú pripravované bez nutnosti bakteriálneho klonovania DNA fragmentov, produkuje tisíce až milióny sekvenácií paralelne a výstup sekvenácia je priamo detekovaný bez nutnosti post-reakčnej analýzy ako je napríklad elektroforéza [41]. Veľké množstvo vytvorených fragmentov sekvenovaním umožnilo veľmi rýchlu sekvenáciu celých genómov. Toto sa stalo možným aj vďaka mohutnému rozvoju v bioinformatike a veľkému výkonu moderných počítačov [42]

Pri identifikácii konkrétnych druhov sa používajú všeobecne dve stratégie: sekvenácia vybraných úsekov genómu alebo sekvenovanie celého genómu [43]. Pri sekvenovaní určitého úseku je nutné predom poznať sekvenciu, ktorá nám umožní rozlíšiť rôzne druhy. Táto sekvencia môže byť predom amplifikovaná pomocou PCR, tento prístup bol použitý

na preukázanie prítomnosti geneticky modifikovanej kukurice a sóje [44].

Sekvenovanie celého genómu našlo uplatnenie takisto pri geneticky modifikovaných potravinách, kde nám znalosť vlozenej sekvencie v genómu umožňuje identifikovať prítomnosť geneticky modifikovaného materiálu vo vzorke. Prítomnosť GMO je preukázaná prítomnosťou vložených transgenných sekvencií a porovnaním s genómom rastliny aby bolo možné identifikovať sekvencie ohraničujúce vloženú sekvenciu. V poslednom kroku sú tieto sekvencie zarovnané s referenčným rastlinným genómom a modifikovaným genómom. Tato stratégia sekvenácie celého genómu bola úspešne aplikovaná na geneticky modifikovanú ryžu, mix modifikovanej a nemodifikovanej ryže a umožnila ich rozlíšenie [45].

### 3. Cieľ práce

Cieľom práce bolo porovnanie dvoch metód extrakcie DNA, tieto metódy sa líšili v použití separačného zariadenia - paramagnetickej ihlu a magnetického separátora s využitím magnetických častíc. Výsledky izolácie DNA boli štatisticky porovnané na vyhodnotenie metódy, ktorá je vhodnejšia na izoláciu DNA. Kvalita izolovanej DNA bola vyhodnotená použitím spektrofotometra a takisto bola overená amplifikovateľnosť izolovanej DNA pomocou konvenčnej polymerázovej reťazovej reakcie.

# 4. Materiál

## 4.1. Vzorky

Ako vzorky boli použité potraviny uvedené v zozname. Vzhľadom na odlišný charakter vzoriek (tepelne opracované, viskózne, surové) boli použité odlišné navážky.

- List jahodníku obecného (*Fragaria Vesca*)

Na izoláciu DNA zo vzorky bola použitá navážka 300  $\mu\text{g}$  z čerstvej vzorky listu jahodníku obecného. Nepoužitá vzorka bola uchovávaná pri  $-20^{\circ}\text{C}$ .

- Ružica brokolice (*Brassica oleracea var. botrytis italica*)

Na izoláciu DNA zo vzorky bola použitá navážka 300  $\mu\text{g}$  z čerstvej vzorky brokolice. Nepoužitá vzorka bola uchovávaná pri  $-20^{\circ}\text{C}$ .

- Jahodový džem

Na výrobu džemu bolo použitých 50 g ovocia. Na izoláciu bolo odobraných 200  $\mu\text{g}$  vzorky. Džem bol uchovávaný pri  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Zloženie: jahody 50 %, glukózo-fruktózový sirup, cukor, kyselina citrónová, želírujúca látka.

- Selský jogurt s lesnými jahodami

Zo vzorky jogurtu bola odstránená jogurtová časť a na izoláciu bol použitý jahodový džem s navážkou 200  $\mu\text{g}$ .

Zloženie: Mlieko, Ovocná zložka 18% (cukor, glukózo-fruktózový sirup, jahody 39%, modifikovaný kukuričný škrob, zahusťovadlo: pektíny, lesné jahody 1%, aróma farbiceho koncentráta z čienej mrkvi), Mliečna bielkovina, Jogurtová kultúra, Kultúry obsahujúce *Bifidobacterium* a *Lactobacillus acidophilus* ( $10^6/\text{g}$ ), Obsah tuku min. 2,6 %

- Mletá červená paprika (*Capsicum annuum*)

Zo vzorky mletej červenej papriky bolo odobraných 200  $\mu\text{g}$  na izoláciu DNA do jednotlivých mikroskúmaviek.

## 4.2. Chemikálie a roztoky

Použité roztoky boli čistoty p. a. Roztoky boli nariadené zo sterilných zásobných roztokov (sterilizované pri  $121^{\circ}\text{C}$ , 20 min) použitím sterilnej destilovanej vody.

- Agaróza pre elektroforézu DNA (Serva, Heidelberg, SRN)

- Cetyltrimethylammonium bromid CTAB (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Chlorid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Chloroform (Penta, Praha, ČR)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- Etanol 96% (Penta, Praha, ČR)
- Etídiumbromid (EtBr) (Sigma, St. Louis, USA)
- Fluorescenčné farbivo GoldView (Ecoli, Bratislava, SR)
- Hydroxid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina boritá (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Penta, Praha, ČR)
- Oktanol (Penta, Praha, ČR)
- Polyetylénglykol (PEG) 6000 (Sigma, St. Louis, USA)
- Tris-HCl (Penta, Praha, ČR)

### 4.3. Komponenty pre konvenčnú PCR

- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- Reakčný pufor kompletný pre *Taq* polymerázu 1.1 (10x koncentrovaný); zloženie: síran amónny, chlorid horečnatý (množstvo vyššie ako 2,5 mM) (Top-Bio, Praha, ČR)
- dNTP zmes 10 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), pH = 7,5 (Top-Bio, Praha, ČR)
- Primery (10 pmol/ $\mu$ l) (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)

Tabuľka 4.1: Sekvencia primerov 26Sfor a 26Srev

Primer [46]	Sekvencia
26Sfor	5'-GAA TTC ACC CAA GTG TTG GGA T-3'
26Srev	5'-AGA GGC GGT CAG TCA TAA TC-3'

- *Taq* polymeráza 1.1 (1U/ $\mu$ l) (Top-Bio, Praha, ČR)



## 4.4. Magnetické častice

Magnetické častice Fkol B100 ox boli pripravené Ing. D. Horákom, Csc. z ústavu makromolekulárnej chémie Akadémie vied ČR v Prahe.

Vlastnosti magnetických nosičov zahŕňajúce typ polyméru, obsah Fe v jadre, priemer častíc a index polydisperzity sú uvedené v tabuľke.

Tabuľka 4.2: Vlastnosti magnetických častíc

Označenie	Nosič	Fe (% hm)	-COOH	Priemer ( $\mu\text{m}$ )	PDI
F-kol B 100 ox	P(GMA)	5,4	0,67	1,2	1,10

## 4.5. Roztoky na izoláciu DNA

- EDTA (0,5M; pH 8,0)  
Navážka 186,1 g EDTA bola rozpustená v 800 ml destilovanej vody. pH bolo upravené prídavkom 20 g hydroxidu sodného na hodnotu 8,0. Roztok bol doplnený destilovanou vodou na objem 1000 ml, alikvótne rozdelený a sterilizovaný použitím autoklávu pri teplote 121°C po dobu 20 minút.
- Ethanol 70%  
Ethanol bol pripravený zmiešaním 70 ml 96% ethanolu s 21 ml destilovanej vody.
- Lyzačný roztok CTAB  
Navážka 1 g CTAB bola rozpustená v 10 ml 0,5 M Tris-HCl, 16 ml 5M NaCl, 2 ml 0,5 M EDTA a 42 ml destilovanej vody.
- Roztok chloridu sodného 5 M  
Navážka 87,66 g NaCl bola rozpustená v 300 ml destilovanej vody.
- Roztok 40% polyethylenglykolu 6000  
Navážka 40 g PEG 6000 bola rozpustená v 60 ml destilovanej vody. Roztok bol následne doplnený destilovanou vodou na objem 100 ml.
- Roztok chloroform-oktanol  
Chloroform bol zmiešaný s oktanolom v pomere 24:1 na požadovaný objem.
- TE pufor  
1 ml 1M M Tris-HCl (pH 7,8) bol zmiešaný s 0,2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), následne bol roztok doplnený na objem 100 ml destilovanou vodou. Výsledný roztok bol rozdelený do alikvótnych podielov.
- Tris-HCl (1 M; pH 7,8)  
Navážka 121,1 g Tris-bázy bolo rozpustených v 800 ml destilovanej vody. pH roztoku bolo upravených koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu 7,8. Roztok bol doplnený destilovanou vodou na objem 1000 ml, alikvótne rozdelený a sterilizovaný použitím autoklávu pri teplote 121°C po dobu 20 minút.

## 4.6. Roztoky pre agarózovú gelovú elektroforézu

- Agarózový gél 1,2%  
Navážka 0,84 g agarózy bola rozpustená v 70 ml 0,5 M TBE pufru.
- DNA štandard (Malamité, Moravské Prusy, ČR)  
Obsahuje fragmenty DNA s veľkosťou 1400, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 a 100 bp
- Ethidium bromid 0,5  $\mu\text{l}/\text{ml}$   
50  $\mu\text{l}$  ethidium bromidu (10  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) bolo zmiešaných s 1000 ml destilovanej vody.
- TBE Pufor (5 M)  
Navážka 54 g Tris-bázy a 27,5 g kyseliny boritej bolo rozpustených v 20 ml EDTA (pH 8,0). Roztok bol doplnený destilovanou vodou na objem 1000 ml. Pred použitím pri elektroforéze bol pripravený pufor nariadený destilovanou vodou 10x.
- Nanášací pufor Yellow load (TopBio, Praha, ČR)

## 4.7. Pomôcky a prístroje

- Laboratórne váhy (Kern und Sohn, Nemecko)
- Centrifúga Mini spin (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
- Mikropipety Discovery HTL s objemom 10, 20, 200 a 1000  $\mu\text{l}$  (Varšava, Polsko)
- Mikrovlnná trúba SMW 5020 (Sencor, ČR)
- Očkovací box (Fatran, ČR)
- Termocykler PTC 200 (Bio-Rad lab., USA)
- Transiluminátor TVR 3121 (Spectroline, USA)
- Zariadenie pre elektroforézu Mini gel (Hoefler, USA)
- Zdroj elektrického napätia pre elektroforézu Lightning Volt Power Supply, Model OSP-300 (Owl Scientific, USA)
- Nanodrop ND-2000/2000c (Thermo Scientific, USA)
- Magnetický separátor Invitrogen Dynal AS (DynalBiotech, Oslo, Nórsko)
- Bežné laboratórne sklo, plastový umelohmotný laboratórny materiál a pomôcky

# 5. Metódy

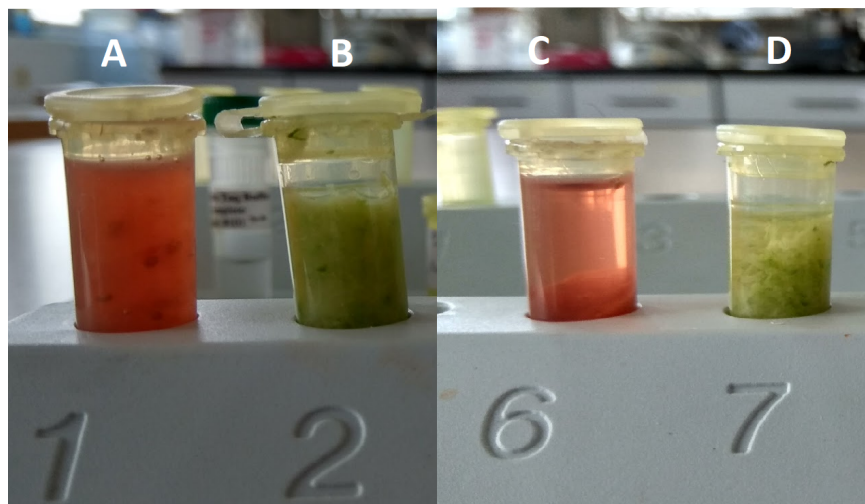
## 5.1. Príprava hrubého lyzátu buniek

- zelenina bola povrchovo očistená pomocou 70% ethanolu a nakrájaná pomocou sterilného skalpelu v prípade vzoriek jahodového džemu a mletej červenej papriky neboli vzorky v tomto kroku očistené ani homogenizované
- do eppendorfovej skúmavky bola vložená navážka vzorky podľa Tabuľky 5.1 a pridaných 500  $\mu\text{l}$  roztoku CTAB a 1  $\mu\text{l}$  2-merkptoethanolu na odstránenie kontaminujúcich polysacharidov

Tabuľka 5.1: Navážky použitých vzoriek

Vzorka	Navážka [mg]
Brokolica	300
Jahodový list	300
Jahodový džem	200
Džem z jahodového jogurtu	200
Mletá červená paprika	200

- eppendorfova skúmavka bola vložená do termobloku a obsah bol homogenizovaný 5 minút za použitia kopistu
- následne bola skúmavka vložená do trepačky temperovanej na 60°C, kde bola pretrepávaná po dobu 30 minút pri 360 ot/min
- po pretrepávaní bolo do skúmavky pridaných 500  $\mu\text{l}$  roztoku chloroform-oktanol a ručne bola pretrepávaná po dobu 3 minút
- skúmavka bola ďalej centrifugovaná 5 minút pri 13500 ot/min
- po centrifugácii bol odobraná vodná fáza obsahujúca DNA vo vrchnej časti skúmavky, spodná organická fáza obsahovala oddelené proteíny.



Obrázok 5.1: **A, B** - Vzorka jahodového džemu, brokolice po prídavku roztoku chloroform:oktanol. **C, D** - Vzorka jahodového džemu, brokolice po centrifugácii

## 5.2. Izolácia DNA s využitím magnetických nosičov

- na izoláciu DNA boli použité komponenty v poradí uvedenom v Tabuľke 5.2

Tabuľka 5.2: Komponenty na izoláciu DNA

Poradie	Objem komponent [ $\mu$ l]	Komponenty
1	200	NaCl
2	200	Hrubý lyzát buniek
3	50	40% PEG 6000
4	50	magnetické nosiče

- komponenty boli zmiešané v uvedenom poradí a boli inkubované pri laboratórnej teplote 15 minút
- častice s naviazanou DNA boli separované pomocou magnetického separátoru pri laboratórnej teplote po dobu 15 minút
- supernatant bol odpipetovaný a ku časticiam bol pridaný 1 ml 70% etanolu
- častice s naviazanou DNA boli separované pomocou magnetického separátoru pri laboratórnej teplote po dobu 2 minút
- supernatant bol opakovane odpipetovaný ku časticiam bolo pridaných 500  $\mu$ l 70% etanolu
- častice s naviazanou DNA boli separované pomocou magnetického separátoru pri laboratórnej teplote po dobu 2 minút

- skúmavky boli sušené pri laboratórnej teplote v horizontálnej polohe do vyparchania etanolu
- DNA bola eluovaná do 50  $\mu\text{l}$  TE pufru pri laboratórnej teplote do ďalšieho dňa
- eluovaná DNA bola odpipetovaná do čistej eppendorfovej skúmavky a ďalej použitá pri stanovení jej koncentrácie a čistoty

### 5.3. Izolácia DNA s využitím paramagnetickej ihly

- na izoláciu DNA boli použité komponenty v poradí uvedenom v Tabuľke 5.3

Tabuľka 5.3: Komponenty na izoláciu DNA

Poradie	Objem komponent [ $\mu\text{l}$ ]	Komponenty
1	200	NaCl
2	200	Hrubý lyzát buniek
3	50	40% PEG 6000
4	50	magnetické nosiče

- komponenty boli zmiešané v uvedenom poradí a boli inkubované pri laboratórnej teplote 15 minút
- častice s naviazanou DNA boli separované pomocou paramagnetickej ihly pod napätím 12V a prenesené do eppendorfovej skúmavky obsahujúcej 500  $\mu\text{l}$  70% ethanolu
- pokiaľ nebolo možné preniesť všetky častice v jednom kroku tak prenos bol opakovaný
- po uvoľnení do roztoku a premiešaní boli častice prenesené pomocou paramagnetickej ihly do eppendorfovej skúmavky obsahujúcej 50  $\mu\text{l}$  TE pufru, kde bola DNA eluovaná po dobu 15 minút
- po elúcii boli častice odobrané pomocou paramagnetickej ihly, DNA eluovaná do TE pufru bola pripravená na použitie pri stanovení čistoty a koncentrácie

### 5.4. Štatistické zhodnotenie výsledkov

Z výsledkov spektrofotometrického stanovenia kvantity izolovanej DNA boli odlažené výsledky vylúčené použitím Grubbsovho testu. Pre stanovenie zhodnosti výsledkov bol použitý párový Študentov t test pre rovnaký počet stanovení a opakovateľnosť výsledkov bola overená pomocou výpočtu F-kritéria.

Pre výpočet Grubbsovho testu sa používa nasledujúci vzťah:

$$T_1 = \frac{\bar{x} - x_1}{S}, \quad (1)$$

kde  $\bar{x}$  je priemerná hodnota súboru dát a hodnota  $S$  je odvodená zo smerodajnej odchylky a vypočítaná podľa nasledujúceho vzťahu:

$$S = s \cdot \sqrt{\frac{n-1}{n}}, \quad (2)$$

kde  $n$  je počet stanovení. Vypočítanú veličinu  $T_1$  porovnáваме s kritickou hodnotou  $T_\alpha$  pre zvolenú hladinu významnosti  $\alpha$ . Pokiaľ je  $T_1 \geq T_\alpha$  tak je výsledok odľahlý a je nutné ho vylúčiť zo súboru testovaných hodnôt.

Pre výpočet Študentovho testu  $t$  sa používa nasledujúci vzťah:

$$t = \frac{|\bar{x}_a - \bar{x}_b| \sqrt{n-1}}{\sqrt{s_a^2 + s_b^2}}, \quad (3)$$

kde  $s_a^2$  a  $s_b^2$  sú rozptyly s  $\nu = n - 1$  stupňami voľnosti. Do činiteľa dosádzame väčšiu hodnotu  $s^2$ .

Pre posúdenie opakovateľnosti výsledkov bol použitý F-test, ktorého hodnota sa určí podľa vzťahu:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}, \quad (3)$$

kde  $s_1^2$  a  $s_2^2$  sú rozptyly, pričom väčší rozptyl dvoch súborov dát je v čitateli a menší v menovateli. Testom je overená hypotéza  $s_1^2 = s_2^2$ .

## 5.5. Polymerázová reťazová reakcia

Izolovaná rastlinná DNA nebola vzhľadom na primeranú koncentráciu riedená. Komponenty PCR boli pred použitím dôkladne premiešané a následne z nich bol pripravený master mix, ktorý bol alikvótne rozpipetovaný do eppendorfových skúmaviek v očkovacom boxe. Komponenty boli pridávané v poradí uvedenom v Tabulke 5.5, DNA bola pridaná mimo očkovacieho boxu ako posledná. Negatívna kontrola obsahovala namiesto vzorky DNA, vodu určenú pre PCR.

Na amplifikáciu vzoriek bol použitý program 220RO40, popísaný v Tabulke 5.5. Amplifi-

Tabuľka 5.4: Komponenty pre PCR

Poradie	Objem komponent [ $\mu$ l]	Komponenty
1	18,8	PCR voda
2	2,5	PCR pufor
3	0,5	Zmes dNTP
4	0,5	Primer 26S forward
5	0,5	Primer 26S reverse
6	0,2	DNA polymeráza 5U/ $\mu$ l
7	2	Vzorka DNA

kovaný produkt má očakávanú dĺžku 220bp, pokiaľ nebol použitý na vizualizáciu pomocou agarózovej elektroforézy tak bol uchovávaný pri  $-20^\circ\text{C}$ .

Tabuľka 5.5: Program PCR 220RO40

Teplota [°C]	Čas [s]	Počet opakovaní
95	600	1
95	30	
52	30	39
72	40	
72	600	1
10	∞	1

## 5.6. Agarózová elektroforéza

- navážka agarózy na prípravu gelu bola úmerná objemu elektroforetickej vane a výslednej koncentracii agarózy 1,2%
- gél bol pripravený opakovaným zahriatím roztoku v mikrovlnnej rúre
- po čiastočnom ochladnutí gélu bol pridaný 1  $\mu$ l farbiva GoldView a gél bol vyliaty do elektroforetickej vane
- ku analyzovaným vzorkám bol pridaný nanášací pufor v pomere 6:1 (vzorka:pufor).
- vzorky boli vnesené do jamiek gélu po vychladnutí na laboratórnu teplotu
- elektroforéza prebiehala po dobu 30 minút pri 60V a 2 hodiny pri 70V
- vizualizácia výsledkov bola prevedená pomocou UV transluminátoru
- gél bol pri nedostatočnom zafarbení vzoriek 30 minút dofarbovaný vo vani obsahujúcej etídiumbromid

# 6. Výsledky

## 6.1. Spektrofotometrické stanovenie čistoty a koncentrácie DNA

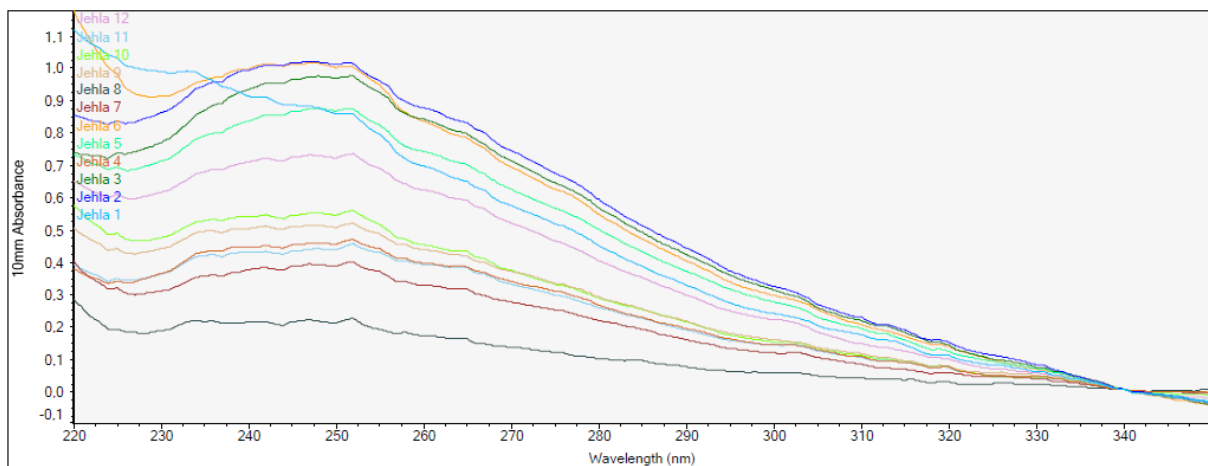
Čistota a koncentrácia izolovanej DNA boli stanovené spektrofotometricky využitím spektrometru NanoDrop. V prehľade jednotlivých vzoriek sú uvedené namerané koncentrácie izolovanej DNA, pomer vlnových dĺžok 260/280 nm a 260/230 nm, ktoré podávajú informáciu o čistote izolovanej DNA.

### 6.1.1. Paramagnetická ihla

#### 6.1.1.1. Vzorka brokolica

Tabuľka 6.1: Koncentrácia a pomer absorbancií pri spektrofotometrickom stanovení DNA

Vzorka	$A_{260}/A_{230}$	$A_{260}/A_{280}$	c [ng/ $\mu$ l]
1	1,06	1,55	34,6
2	1,02	1,48	43,6
3	1,09	1,49	41,8
4	1,09	1,50	19,5
5	1,04	1,49	36,8
6	0,92	1,53	41,5
7	1,06	1,51	16,1
8	0,91	1,76	8,2
9	0,99	1,52	21,6
10	0,95	1,59	22,3
11	1,08	1,53	19,3
12	1,01	1,55	30,8



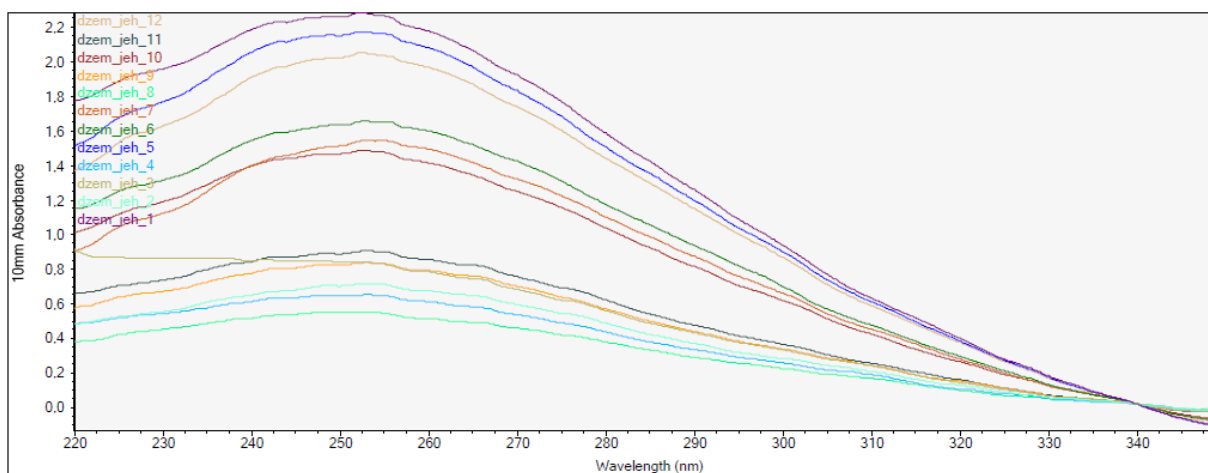
Obrázok 6.1: Spektrofotometrické stanovenie čistoty a kvality DNA - paramagnetická ihla



### 6.1.1.2. Vzorka jahodový džem

Tabuľka 6.2: Koncentrácia a pomer absorbancií pri spektrofotometrickom stanovení DNA

Vzorka	$A_{260}/A_{230}$	$A_{260}/A_{280}$	c [ng/ $\mu$ l]
1	1,11	1,38	108,3
2	1,23	1,40	33,0
3	0,91	1,41	38,4
4	1,13	1,42	29,8
5	1,18	1,38	103,5
6	1,22	1,36	79,3
7	1,34	1,36	74,1
8	1,15	1,38	24,9
9	1,18	1,41	38,8
10	1,19	1,37	70,1
11	1,17	1,39	41,9
12	1,21	1,37	97,8

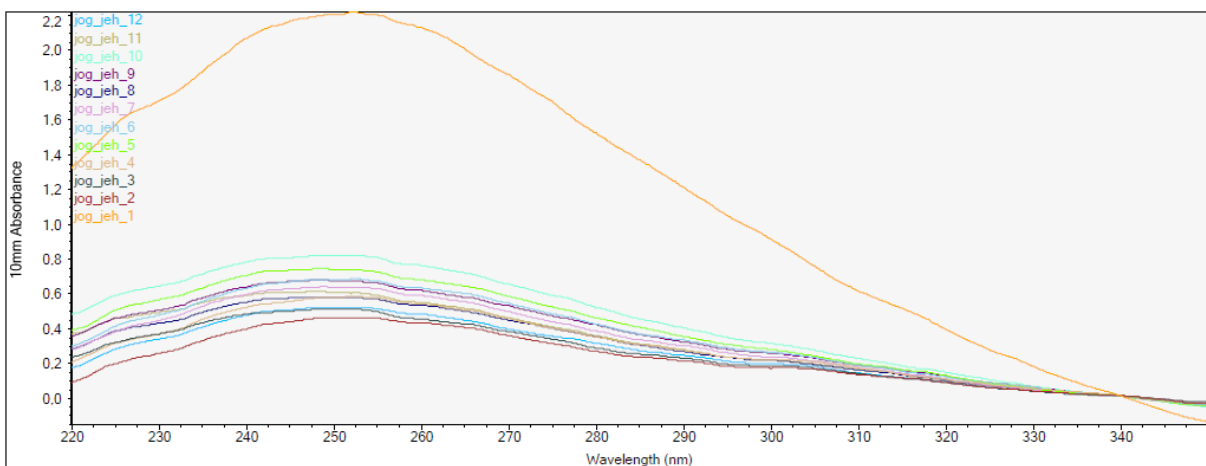


Obrázok 6.2: Spektrofotometrické stanovenie čistoty a kvality DNA - paramagnetická ihla

### 6.1.1.3. Vzorka jahodový jogurt

Tabuľka 6.3: Koncentrácia a pomer absorbiácií pri spektrofotometrickom stanovení DNA

Vzorka	$A_{260}/A_{230}$	$A_{260}/A_{280}$	c [ng/ $\mu$ l]
1	1,25	1,40	106,0
2	1,73	1,64	21,0
3	1,24	1,61	22,1
4	1,49	1,56	26,4
5	1,21	1,49	33,3
6	1,34	1,51	31,0
7	1,34	1,56	29,0
8	1,25	1,53	26,0
9	1,24	1,49	30,4
10	1,19	1,47	37,5
11	1,13	1,56	26,9
12	1,45	1,56	23,5

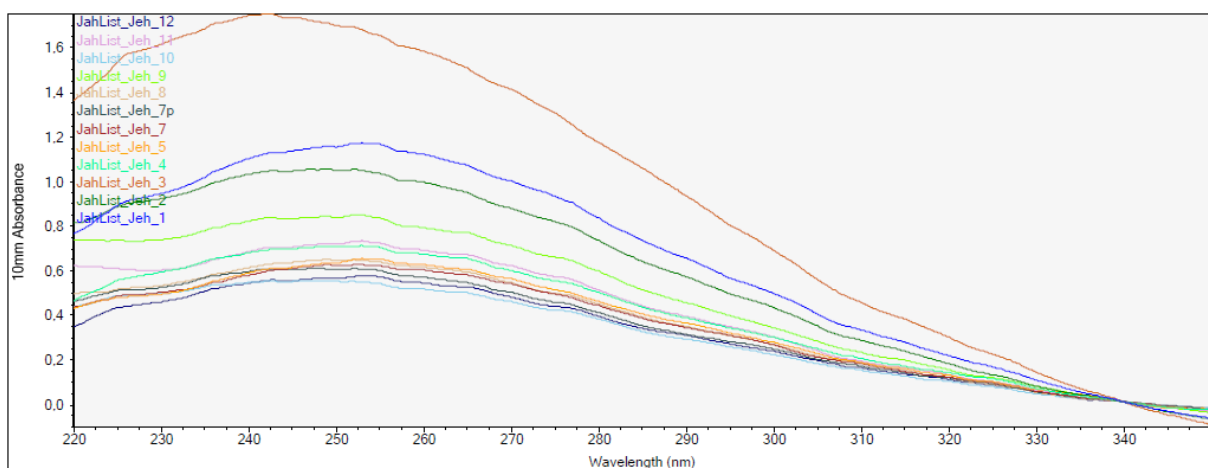


Obrázok 6.3: Spektrofotometrické stanovenie čistoty a kvality DNA - paramagnetická ihla

#### 6.1.1.4. Vzorka jahodový list

Tabuľka 6.4: Koncentrácia a pomer absorbancií pri spektrofotometrickom stanovení DNA

Vzorka	$A_{260}/A_{230}$	$A_{260}/A_{280}$	c [ng/ $\mu$ l]
1	1,19	1,35	55,6
2	1,08	1,36	49,4
3	0,98	1,35	78,8
4	1,14	1,35	33,2
5	1,28	1,37	30,8
6	1,21	1,37	29,7
7	1,10	1,40	28,1
8	1,16	1,38	30,2
9	1,08	1,33	39,1
10	1,04	1,36	25,3
11	1,15	1,35	34,1
12	1,19	1,39	26,7

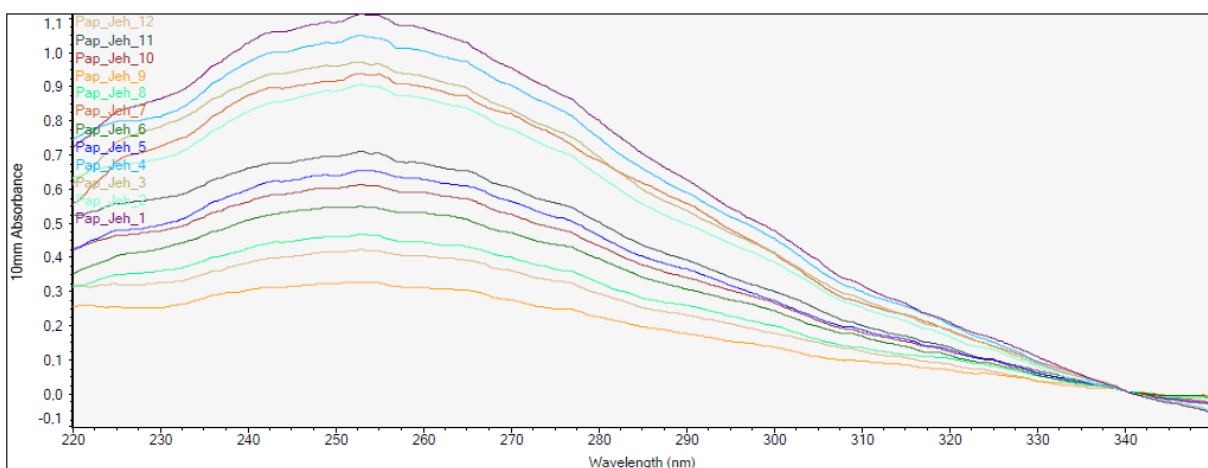


Obrázok 6.4: Spektrofotometrické stanovenie čistoty a kvality DNA - paramagnetická ihla

### 6.1.1.5. Vzorka mletá červená paprika

Tabuľka 6.5: Koncentrácia a pomer absorbancií pri spektrofotometrickom stanovení DNA

Vzorka	$A_{260}/A_{230}$	$A_{260}/A_{280}$	c [ng/ $\mu$ l]
1	1,24	1,34	53,3
2	1,26	1,36	43,1
3	1,19	1,34	46,3
4	1,24	1,34	50,0
5	1,28	1,36	31,2
6	1,26	1,35	26,3
7	1,24	1,32	44,7
8	1,24	1,37	21,9
9	1,26	1,40	15,2
10	1,25	1,37	29,2
11	1,18	1,35	33,5
12	1,25	1,38	19,8



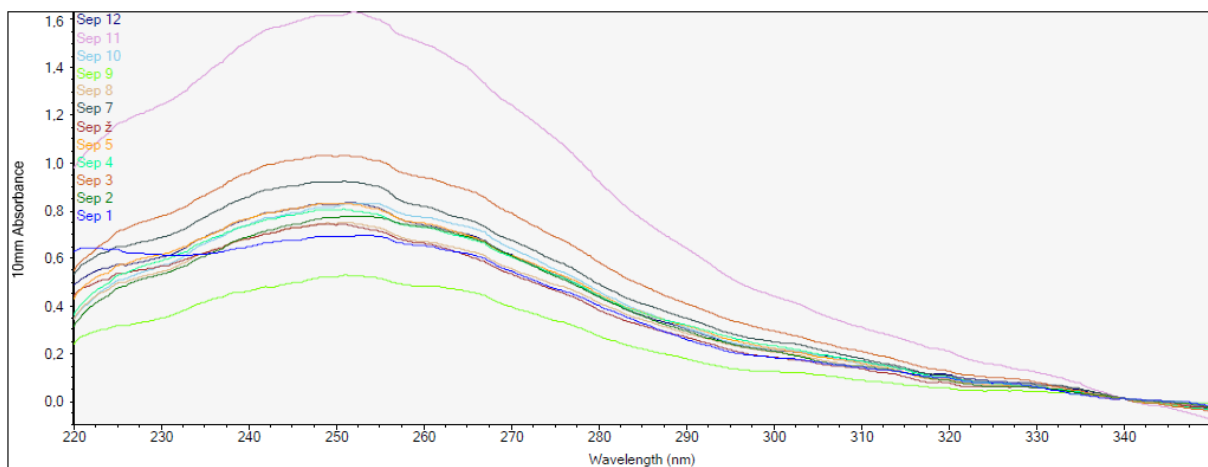
Obrázok 6.5: Spektrofotometrické stanovenie čistoty a kvality DNA - paramagnetická ihla

## 6.1.2. Magnetický separátor

### 6.1.2.1. Vzorka brokolica

Tabuľka 6.6: Koncentrácia a pomer absorbancií pri spektrofotometrickom stanovení DNA

Vzorka	$A_{260}/A_{230}$	$A_{260}/A_{280}$	c [ng/ $\mu$ l]
1	1,06	1,64	32,1
2	1,39	1,69	36,1
3	1,21	1,62	46,5
4	1,25	1,66	36,0
5	1,22	1,69	36,9
6	1,17	1,75	32,6
7	1,20	1,69	40,5
8	1,24	1,63	33,0
9	1,41	1,80	23,6
10	1,37	1,69	38,1
11	1,21	1,63	74,7
12	1,23	1,70	36,5

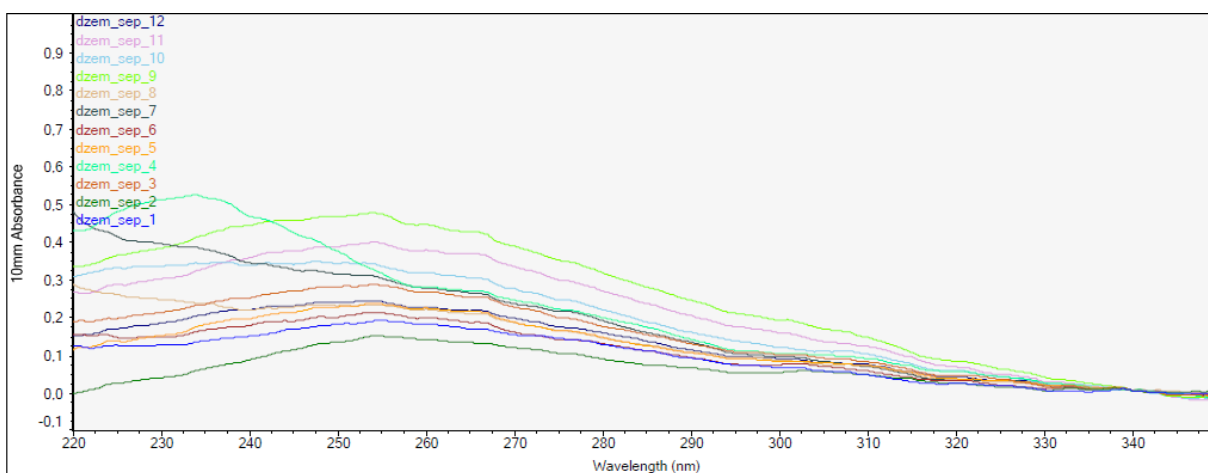


Obrázok 6.6: Spektrofotometrické stanovenie čistoty a kvality DNA - magnetický separátor

### 6.1.2.2. Vzorka jahodový džem

Tabuľka 6.7: Koncentrácia a pomer absorbancií pri spektrofotometrickom stanovení DNA

Vzorka	$A_{260}/A_{230}$	$A_{260}/A_{280}$	$c$ [ng/ $\mu$ l]
1	1,46	1,44	8,8
2	4,05	1,62	6,8
3	1,27	1,53	13,1
4	0,54	1,43	13,8
5	1,50	1,56	10,9
6	1,35	1,54	9,6
7	0,70	1,47	13,6
8	0,89	1,55	10,8
9	1,17	1,41	22,0
10	0,95	1,46	15,6
11	1,25	1,41	18,6
12	1,24	1,44	11,0



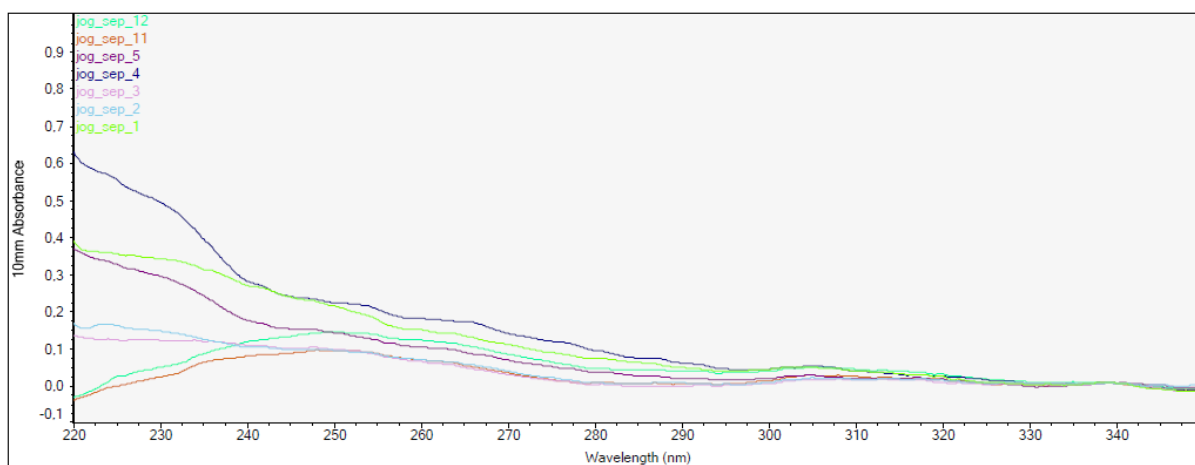
Obrázok 6.7: Spektrofotometrické stanovenie čistoty a kvality DNA - magnetický separátor

### 6.1.2.3. Vzorka jahodový jogurt

Vzorky obsahujúce nulovú koncentráciu DNA nie sú zobrazené na obrázku.

Tabuľka 6.8: Koncentrácia a pomer absorbiancií pri spektrofotometrickom stanovení DNA

Vzorka	$A_{260}/A_{230}$	$A_{260}/A_{280}$	c [ng/ $\mu$ l]
1	0,43	2,16	7,2
2	0,46	114,17	3,2
3	0,51	-16,46	3,0
4	0,36	1,99	8,8
5	0,34	3,30	4,9
11	4,01	58,04	3,2
12	2,73	2,96	5,9

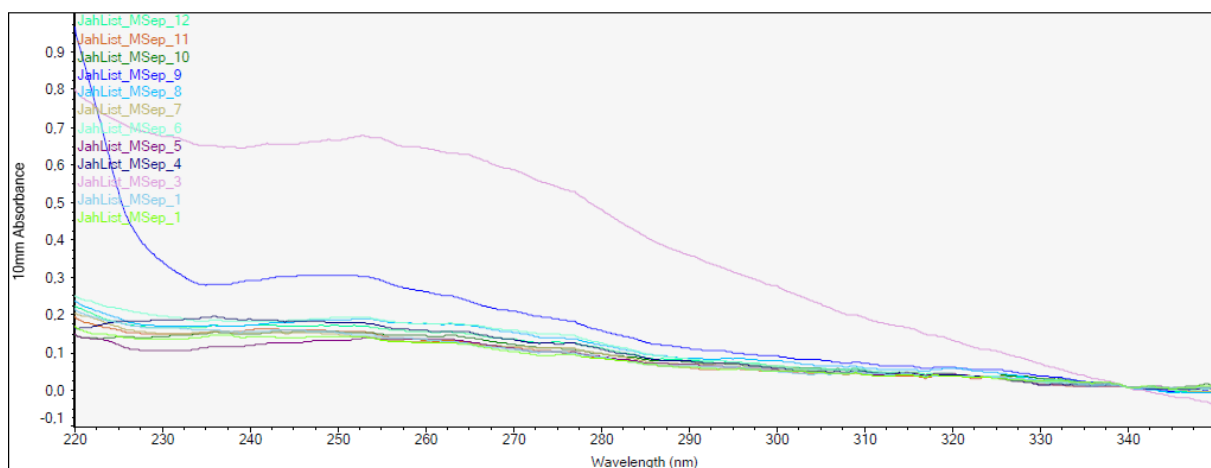


Obrázok 6.8: Spektrofotometrické stanovenie čistoty a kvality DNA - magnetický separátor

#### 6.1.2.4. Vzorka jahodový list

Tabuľka 6.9: Koncentrácia a pomer absorbiácií pri spektrofotometrickom stanovení DNA

Vzorka	$A_{260}/A_{230}$	$A_{260}/A_{280}$	$c$ [ng/ $\mu$ l]
1	0,92	1,53	5,9
2	0,81	1,56	6,4
3	0,95	1,34	32,0
4	0,85	1,48	7,6
5	1,32	1,55	6,4
6	0,90	1,44	8,5
7	0,86	1,34	6,0
8	1,05	1,51	8,5
9	0,76	1,68	12,8
10	1,02	1,53	6,8
11	0,89	1,59	6,3
12	0,94	1,41	7,4



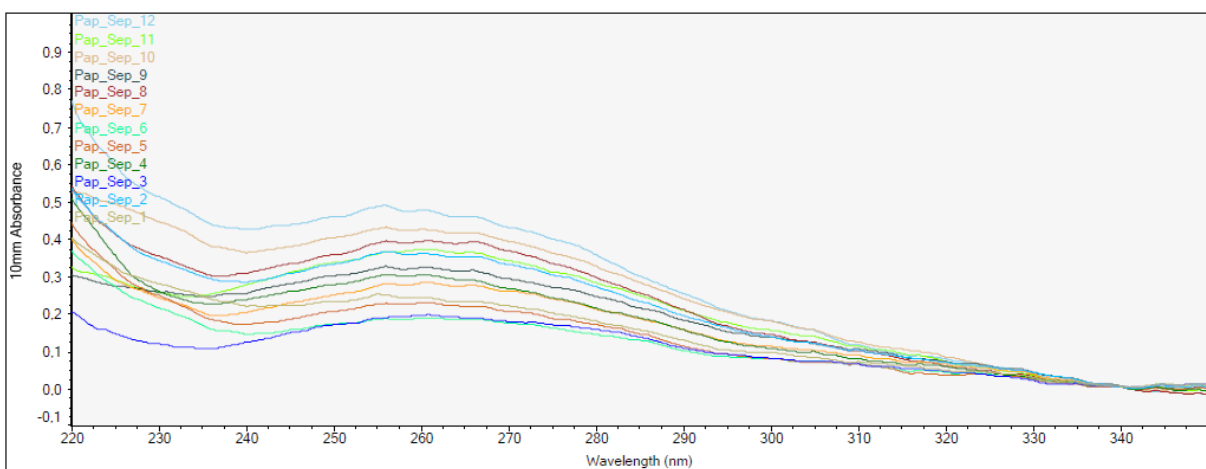
Obrázok 6.9: Spektrofotometrické stanovenie čistoty a kvality DNA - magnetický separátor



### 6.1.2.5. Vzorka mletá červená paprika

Tabuľka 6.10: Koncentrácia a pomer absorbancií pri spektrofotometrickom stanovení DNA

Vzorka	$A_{260}/A_{230}$	$A_{260}/A_{280}$	c [ng/ $\mu$ l]
1	0,86	1,36	11,8
2	1,05	1,33	17,8
3	1,69	1,25	9,5
4	1,17	1,42	14,9
5	0,92	1,35	11,2
6	0,87	1,32	9,2
7	1,17	1,34	13,8
8	1,12	1,33	19,4
9	1,26	1,32	15,9
10	0,95	1,31	21,0
11	1,46	1,33	18,4
12	0,93	1,34	23,6



Obrázok 6.10: Spektrofotometrické stanovenie čistoty a kvality DNA - magnetický separátor

### 6.1.3. Štatistické spracovanie výsledkov

Z dát spektrofotometrických stanovení koncentrácie jednotlivých vzoriek boli vypočítané priemerné hodnoty pre jednotlivé typy izolácie (paramagnetická ihla, magnetický separátor). Následne bol použitý Grubbsov test na vyradenie odlahlých výsledkov. Po opakovanom výpočte priemeru a rozpylu dát bol použitý Studentov t test na určenie vhodnejšej metódy izolácie. Data po využití Grubbsovho testu sú uvedené v Obrázku 6.1.1 s vypočítanými priemernými hodnotami a smerodajnými odchýlkami. V prípade vzorky džemu z jahodového jogurtu boli vylúčené namerané hodnoty ktoré obsahovali nulové alebo záporné koncentrácie DNA.

Izolácia	Brokolica		List		Pap		JahDzem		Jogurt	
	I	S	I	S	I	S	I	S	I	S
	34.60	32.10	55.60	5.90	53.30	11.80	108.30	8.80	21.00	3.20
	43.60	36.10	49.40	6.40	43.10	17.80	33.00	6.80	22.10	3.00
	41.80	46.50	33.20	7.60	46.30	9.50	38.40	13.10	26.40	8.80
	19.50	36.00	30.80	6.40	50.00	14.90	29.80	13.80	33.30	4.90
	36.80	36.90	29.70	8.50	31.20	11.20	103.00	10.90	26.90	3.20
	41.50	32.60	28.10	6.00	26.30	9.20	79.30	9.60	23.50	5.90
	16.10	40.50	30.20	8.50	44.70	13.80	74.10	13.60		
	8.20	33.00	39.10	12.80	21.90	19.40	8.20	10.80		
	21.60	23.60	25.30	6.80	15.20	15.90	38.80	22.00		
	22.30	38.10	34.10	6.30	29.20	21.00	70.10	15.60		
	30.80	36.50	26.70	7.40	33.50	18.40	41.90	18.60		
					19.80	23.60	97.80	11.00		
<b>Priemer</b>	28.80	35.63	34.75	7.51	34.54	15.54	60.23	12.88	25.53	4.83
<b>Sm.odch.</b>	11.90	5.69	9.65	1.98	12.67	4.63	32.82	4.27	4.46	2.26

I - Paramagnetická ihla  
S - Magnetický separátor

Obrázok 6.11: Data po vylúčení odlahlých výsledkov

Študentovým testom boli vypočítané nasledujúce hodnoty pre vzorku brokolice:  
 $t_{i,s} = 1,72$  s kritickými hodnotami  $t_{0,05;11} = 2,201$  a  $t_{0,01;11} = 3,106$ . Reprodukovateľnosť výsledkov bola posúdená pomocou F-testu, ktorého hodnota je  $F_{i,s} = 4,37$  a kritická hodnota  $F_{krit} = 2,978$ .

Pre vzorku jahodového listu boli vypočítané nasledujúce hodnoty:  
 $t_{i,s} = 9,17$  s kritickými hodnotami  $t_{0,05;11} = 2,201$  a  $t_{0,01;11} = 3,106$ . Reprodukovateľnosť výsledkov bola posúdená pomocou F-testu, ktorého hodnota je  $F_{i,s} = 23,71$  a kritická hodnota  $F_{krit} = 2,978$ .

Pre vzorku mletej červenej papriky boli vypočítané nasledujúce hodnoty:  
 $t_{i,s} = 4,88$  s kritickými hodnotami  $t_{0,05;12} = 2,178$  a  $t_{0,01;12} = 3,054$ . Reprodukovateľnosť výsledkov bola posúdená pomocou F-testu, ktorého hodnota je  $F_{i,s} = 7,48$  a kritická hodnota  $F_{krit} = 2,817$ .

Pre vzorku jahodového džemu boli vypočítané nasledujúce hodnoty:

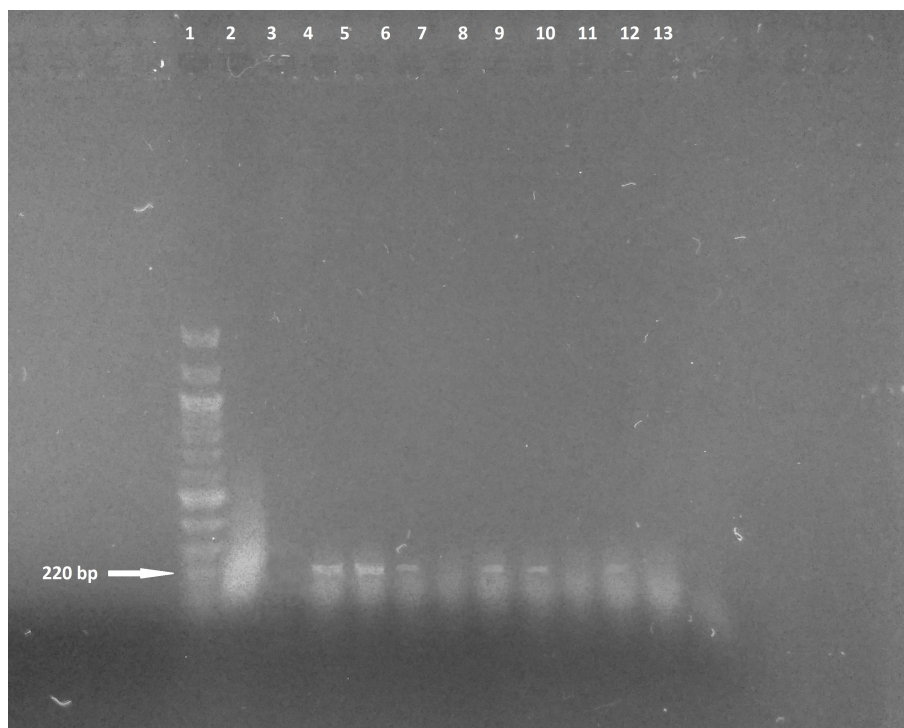
$t_{i,s} = 4,95$  s kritickými hodnotami  $t_{0,05;12} = 2,178$  a  $t_{0,01;12} = 3,054$ . Reprodukovateľnosť výsledkov bola posúdená pomocou F-testu, ktorého hodnota je  $F_{i,s} = 59,00$  a kritická hodnota  $F_{krit} = 2,817$ .

Pre vzorku jahodového džemu z jogurtu boli vypočítané nasledujúce hodnoty:

$t_{i,s} = 10,14$  s kritickými hodnotami  $t_{0,05;11} = 2,446$  a  $t_{0,01;11} = 3,707$ . Reprodukovateľnosť výsledkov bola posúdená pomocou F-testu, ktorého hodnota je  $F_{i,s} = 3,89$  a kritická hodnota  $F_{krit} = 5,050$ .

## 6.2. Overenie amplifikovateľnosti DNA

Amplifikované produkty v objeme  $25 \mu\text{l}$  boli po zmiešaní s nanášacím pufrom nanesené na agarózový gél. Ako pozitívna kontrola bola použitá DNA z rastliny *Nicotiana Tabacum* ( $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ).



Obrázok 6.12: Vizualizácia produktov PCR pomocou agarózovej elektroforézy

Tabuľka 6.11: Výsledky agarózovej elektroforézy zvyšných vzoriek

Beh	Vzorka	Detekcia
1	DNA rebríček	++
2	Pozitívna kontrola	+++
3	Negatívna kontrola	-
4	Vzorka brokolica izolovaná paramagnetickou ihlou	++
5	Vzorka brokolica izolovaná magnetickým separátorom	++
6	Vzorka jahodový list izolovaná paramagnetickou ihlou	+
7	Vzorka jahodový list izolovaná magnetickým separátorom	-
8	Vzorka jahodový džem izolovaná paramagnetickou ihlou	+
9	Vzorka jahodový džem izolovaná magnetickým separátorom	+
10	Vzorka mletá červená paprika izolovaná paramagnetickou ihlou	-
11	Vzorka mletá červená paprika izolovaná magnetickým separátorom	+
12	Vzorka džem z jogurtu izolovaná paramagnetickou ihlou	-
13	Vzorka džem z jogurtu izolovaná magnetickým separátorom	-

# 7. Diskusia

## 7.1. Príprava hrubých lyzátov

Použitie rôznych vzoriek prinieslo komplikácie do prípravy hrubých lyzátov. V prípade vzorky jahodového listu a brokolice bola homogenizácia problematická s použitím kopistu. Mechanická homogenizácia bola časovo náročnejšia napriek predchádzajúcemu rozvolneniu štruktúr pomocou sterilného skalpelu. Dôkladnejšia homogenizácia by mohla byť dosiahnutá použitím štandardnej metódy homogenizácie rastlinných pletív za použitia tekutého dusíku a následného rozdrobenia pomocou trecej misky.

Homogenizácia vzoriek jahodového džemu, džemu z jahodového jogurtu a mletej papriky bola jednoduchá s použitím kopistu, vzhľadom na predchádzajúcu úpravu pri výrobe týchto produktov. Pri homogenizácii jahodového džemu a džemu z jahodového jogurtu vznikol vysoko viskózný roztok, ktorý mohol ovplyvniť úspešnosť nasledovnej izolácie DNA, kvôli obmedzenej možnosti difúzie magnetických častíc vo viskóznom médiu.

## 7.2. Izolácia DNA s využitím magnetického separátoru

DNA bola izolovaná pomocou metódy uvedenej v Kapitole 5.2. Vzhľadom na výsledné stanovenie čistoty a koncentrácie DNA s pomocou spektrofotometru je možné konštatovať značné znečistenie izolovanej DNA. Namerané koncentrácie izolovanej DNA nemusia korešpondovať so skutočnosťou vzhľadom na absorbné maximá kontaminujúcich látok a to hlavne polyfenolických látok v oblasti 240 nm. Najvyššia koncentrácia DNA bola nameraná u vzorky brokolice, vzhľadom na čerstvosť výrobku a absenciu technologickej úpravy bolo možné očakávať vyššiu koncentráciu ako u technologicky opracovaných výrobkov.

## 7.3. Izolácia DNA s využitím paramagnetickej ihly

Využitie paramagnetickej ihly umožnilo izoláciu DNA s koncentraciami vyššími v porovnaní s izoláciou magnetickým separátorom. Overením čistoty izolovanej DNA je možné konštatovať znečistenie polyfenolickými látkami. Pri prenášaní magnetických častíc z jednotlivých mikroskúmaviek bolo nutné prenos opakovať. Dôvodom je prenos cez fázové rozhranie kvapalina-plyn, kedy pri prestupe prestáva pôsobiť na častice nadnášanie v roztoku. Opakovaným prenosom sa znižuje koncentrácia častíc, čo umožní adsorbciu zvyšných častíc bližšie k paramagnetickej ihle kde pôsobí silnejšie magnetické pole. Ďalším dôvodom môže byť veľká viskozita roztoku spôsobená prídavkom veľkého množstva 40% PEG 6000, optimalizáciou metódy by mohlo byť zloženie upravené.

## 7.4. Štatistické spracovanie výsledkov

Rozdiel koncentrácií DNA pri použití paramagnetickej ihly a magnetického separátora je štatisticky významný v prípade vzoriek jahodového džemu, listu, mletej červenej pa-

priky a jahodového džemu z jogurtu. Pri vzorke brokolice sa ukázal byť rozdiel štatisticky nevýznamný.

Využitie paramagnetickej ihly sa vzhľadom na výsledky ukázalo byť efektívnejšie ako použitie magnetického separátora. Ďalšou optimalizáciou zloženia lyzačného a extrakčného roztoku a to zníženie viskozity a možný prídavok PVP na odstránenie kontaminujúcich polyfenolických látok [47].

Reprodukovateľnosť výsledkov bola posúdená pomocou F-testu. Výsledky získané použitím paramagnetickej ihly boli okrem vzorky džemu z jahodového jogurtu reprodukovateľnejšie ako dáta získané použitím magnetického separátora.

## 7.5. Overenie amplifikovateľnosti DNA

DNA izolovaná pomocou magnetického separátora a paramagnetickej ihly bola amplifikovaná reakciou PCR. Produkty boli úspešne amplifikované v prípade vzorky brokolice, izolovanej obidvomi spôsobmi. Pri použití obidvoch metód boli namerané podobné koncentrácie a pomery vlnových dĺžok  $A_{260}/A_{280}$ , ktoré naznačovali mierne znečistenie izolovanej DNA. Samotná vzorka bola technologicky neopracovaná a vďaka tomu k nej mohlo dojsť iba k minimálnej degradácii nukleových kyselín. V prípade vzorky jahodového džemu a mletej červenej papriky, bola amplifikácia DNA úspešná iba v prípade použitia paramagnetickej ihly na izoláciu DNA. Spektrofotometrické stanovenie kvantity a kvality izolovanej DNA ukázalo v prípade magnetického separátora značne znečistené vzorky o nízkej koncentracii DNA, čo bude pravdepodobným dôvodom neúspešnej amplifikácie. Vzorku jahodového džemu izolovanú magnetickým separátorom bolo možné amplifikovať. DNA izolovaná z jahodového džemu v jogurte nebola amplifikovateľná, prihliadnuc na povahu produktu a jeho technologické spracovanie pravdepodobne došlo k značnej degradácii DNA, ktorú prekázala aj nízka výťažnosť potvrdená spektrofotometrickým stanovením.

## 8. Záver

Zariadenie paramagnetickej ihly bolo porovnávané s bežne využívanou metódou s využitím magnetického separátora pri vzorkách rastlinného pôvodu. Cieľom bolo overenie, či nová metóda poskytne DNA v porovnateľnej alebo lepšej kvalite a kvantite ako pri používanej. Pri štyroch vzorkách bol medzi izolačnými metódami pozorovaný štatisticky významný rozdiel. Koncentrácia DNA izolovanej paramagneticou ihlou bola vyššia ako pri použití magnetického separátora. Dostatočná kvalita na prípadnú ďalšiu analýzu bola preukázaná testovaním amplifikovateľnosti pomocou PCR. Tri vzorky izolovanej DNA bolo možné amplifikovať, metóda sa teda ukázala byť vhodnou na použitie pri izolácii DNA z potravín rastlinného pôvodu.

Je možné konštatovať, že boli získané prvotné poznatky o využití paramagnetickej ihly pri izolácii DNA z reálnych vzoriek, ktoré obsahovali inhibítory PCR a boli technologicky spracované. Získané poznatky budú využité pri návrhu ďalších experimentov.

# Literatúra

- [1] TAN, Siun Chee a Beow Chin YIAP. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2009, 1-10. DOI: 10.1155/2009/574398. ISSN 1110-7243. Dostupné tiež z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2009/574398/>
- [2] BARBOSA, Cristina, Sofia NOGUEIRA, Mário GADANHO a Sandra CHAVES. DNA extraction: finding the most suitable method. *Molecular Microbial Diagnostic Methods*. Elsevier, 2016, 2016, , 135-154. DOI: 10.1016/B978-0-12-416999-9.00007-1. ISBN 9780124169999. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124169999000071>
- [3] MADESIS, Panagiotis, Ioannis GANOPOULOS, Ioannis SAKARIDIS, Anagnostis ARGIROU a Athanasios TSAFTARIS. Advances of DNA-based methods for tracing the botanical origin of food products. *Food Research International*. 2014, 60, 163-172. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.10.042. ISSN 09639969. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996913005905>
- [4] GRYSO, Nicolas. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010, 396(6), 2003-2022. DOI: 10.1007/s00216-009-3343-2. ISSN 1618-2642. Dostupné tiež z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-009-3343-2>
- [5] TURCI, Manuela, Maria Luisa Savo SARDARO, Giovanna VISIOLI, Elena MAESTRI, Marta MARMIROLI a Nelson MARMIROLI. Evaluation of DNA extraction procedures for traceability of various tomato products. *Food Control*. 2010, 21(2), 143-149. DOI: 10.1016/j.foodcont.2009.04.012. ISSN 09567135. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713509001418>
- [6] FRIAR, Elizabeth A. Isolation of DNA from Plants with Large Amounts of Secondary Metabolites. *Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data*. Elsevier, 2005, 2005, , 1-12. Methods in Enzymology. DOI: 10.1016/S0076-6879(05)95001-5. ISBN 9780121828004. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687905950015>
- [7] PLOTKA-WASYLKA, Justyna, Natalia SZCZEPAŃSKA, Miguel DE LA GUARDIA a Jacek NAMIEŚNIK. Miniaturized solid-phase extraction techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2015, 73, 19-38. DOI: 10.1016/j.trac.2015.04.026. ISSN 01659936. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993615002010>
- [8] RAHMAN, Md. Mahbubor a Abdelhamid ELAISSARI. Temperature and magnetic dual responsive microparticles for DNA separation. *Separation and Purification Technology*. 2011, 81(3), 286-294. DOI: 10.1016/j.seppur.2011.07.030. ISSN 13835866. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383586611004369>
- [9] GROB, David Tim, Naomi WISE, Olayinka ODUWOLE a Steve SHEARD. Magnetic susceptibility characterisation of superparamagnetic microspheres. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2018, 452, 134-140.



- DOI: 10.1016/j.jmmm.2017.12.007. ISSN 03048853. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304885317332663>
- [10] BERENSMEIER, Sonja. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, 73(3), 495-504. DOI: 10.1007/s00253-006-0675-0. ISSN 0175-7598. Dostupné tiež z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-006-0675-0>
- [11] BORLIDO, L., A.M. AZEVEDO, A.C.A. ROQUE a M.R. AIRES-BARROS. Magnetic separations in biotechnology. *Biotechnology Advances*. 2013, 31(8), 1374-1385. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.05.009. ISSN 07349750. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975013000906>
- [12] HE, Jincan, Meiyong HUANG, Dongmei WANG, Zhuomin ZHANG a Gongke LI. Magnetic separation techniques in sample preparation for biological analysis: A review. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2014, 101, 84-101 DOI: 10.1016/j.jpba.2014.04.017. ISSN 1873-264X. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708514002088>
- [13] CLARK, Kevin D., Omprakash NACHAM, Honglian YU, Tianhao LI, Melissa M. YAMSEK, Donald R. RONNING a Jared L. ANDERSON. Extraction of DNA by Magnetic Ionic Liquids: Tunable Solvents for Rapid and Selective DNA Analysis. *Analytical Chemistry*. 2015, 87(3), 1552-1559. DOI: 10.1021/ac504260t. Dostupné tiež z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac504260t>
- [14] WIERUCKA, Marta a Marek BIZIUK. Application of magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction in preparing biological, environmental and food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2014, 59, 50-58. DOI: 10.1016/j.trac.2014.04.007. ISSN 0165-9936. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993614001022>
- [15] RITTICH, Bohuslav a Alena ŠPANOVÁ. SPE and purification of DNA using magnetic particles. *Journal of Separation Science*. 2013, 36(15), 2472-2485. DOI: 10.1002/jssc.201300331. ISSN 16159306. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201300331>
- [16] HORÁK, Daniel, Michal BABIČ, Hana MACKOVÁ a Milan J. BENEŠ. Preparation and properties of magnetic nano- and micro-sized particles for biological and environmental separations. *Journal of Separation Science*. 2007, 30(11), 1751-1772. DOI: 10.1002/jssc.200700088. ISSN 16159306. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200700088>.
- [17] VASCONCELOS, Ingrid a Christian FERNANDES. Magnetic solid phase extraction for determination of drugs in biological matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2017, 89, 41-52. DOI: 10.1016/j.trac.2016.11.011. ISSN 0165-9936. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993616302795>
- [18] SPELTINI, Andrea, Michela STURINI, Federica MARASCHI a Antonella PROFUMO. Recent trends in the application of the newest carbonaceous materials for magnetic solid-phase extraction of environmental pollutants. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*. 2016, 10,

- 11-23. DOI: 10.1016/j.teac.2016.03.001. ISSN 2214-1588. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214158816300034>
- [19] YAMAGUCHI, Akemi, Kazuyuki MATSUDA, Masayuki UEHARA, Takayuki HONDA a Yasunori SAITO. A novel automated device for rapid nucleic acid extraction utilizing a zigzag motion of magnetic silica beads. *Analytica chimica acta*. 2016, 906, 1-6. DOI: 10.1016/j.aca.2015.10.011. ISSN 1873-4324. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267015012775>
- [20] HERNÁNDEZ-NEUTA, Iván, Iago PEREIRO, Annika AHLFORD, Davide FERRARO, Qiongdi ZHANG, Jean-Louis VIOVY, Stéphanie DESCROIX a Mats NILSSON. Microfluidic magnetic fluidized bed for DNA analysis in continuous flow mode. *Biosensors & bioelectronics*. 2018, 102, 531-539. DOI: 10.1016/j.bios.2017.11.064. ISSN 1873-4235. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566317307959>
- [21] ZHANG, Xiaoling, Xudong WU, Ran PENG a Dongqing LI. Electromagnetically controlled microfluidic chip for DNA extraction. *Measurement*. 2015, 75, 23-28. DOI: 10.1016/j.measurement.2015.06.017. ISSN 0263-2241. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0263224115003310>
- [22] MONTET, D. a R.C. RAY. Food Traceability and Authenticity: Analytical Techniques. *Food Biology Series*. CRC Press, 2017. ISBN 9781351230902.
- [23] LO, Yat-Tung a Pang-Chui SHAW. DNA-based techniques for authentication of processed food and food supplements. *Food Chemistry*. 2018, 240, 767-774 DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.08.022. ISSN 0308-8146. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814617313407>
- [24] DANEZIS, Georgios P., Aristidis S. TSAGKARIS, Federica CAMIN, Vladimir BRUSIC a Constantinos A. GEORGIU. Food authentication: Techniques, trends & emerging approaches. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016, 85, 123-132. DOI: 10.1016/j.trac.2016.02.026. ISSN 0165-9936. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993615301291>
- [25] GANIE, Showkat Hussain, Priti UPADHYAY, Sandip DAS a Maheshwer PRASAD SHARMA. Authentication of medicinal plants by DNA markers. *Plant Gene*. 2015, 4, 83-99. DOI: 10.1016/j.plgene.2015.10.002. ISSN 2352-4073. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S235240731500030X>
- [26] SCARANO, Daria a Rosa RAO. DNA Markers for Food Products Authentication. *Diversity*. 2014, 6(3), 579-596. DOI: 10.3390/d6030579. Dostupné tiež z: <http://www.mdpi.com/1424-2818/6/3/579>
- [27] ESPINEIRA, M. a F.J. SANTA CLARA. *The Use of Molecular Biology Techniques in Food Traceability*. 2016. DOI: 10.1016/B978-0-08-100310-7.00006-5. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081003107000065>
- [28] CHEN, Shi-Yi, Yi-Ping LIU a Yong-Gang YAO. Species authentication of commercial beef jerky based on PCR-RFLP analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene. *Journal of genetics and genomics*. 2010, 37(11),

- 763-769. DOI: 10.1016/S1673-8527(09)60093-X. ISSN 1673-8527. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S167385270960093X>
- [29] CORRADO, Giandomenico. Advances in DNA typing in the agro-food supply chain. *Trends in Food Science & Technology*. 2016, 52, 80-89. DOI: 10.1016/j.tifs.2016.04.003. ISSN 0924-2244. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224415300972>
- [30] GUERRA, Rudy a Zhaoxia YU. *Single Nucleotide Polymorphisms and Their Applications*. DOI: 10.1007/0-387-26288-116. Dostupné tiež z: <http://link.springer.com/10.1007/0-387-26288-116>
- [31] SCARANO, Daria, Rosa RAO, Paolo MASI a Giandomenico CORRADO. SSR fingerprint reveals mislabeling in commercial processed tomato products. *Food Control*. 2015, 51, 397-401. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.12.006. ISSN 0956-7135. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713514006963>
- [32] CARAMANTE, Martina, Giandomenico CORRADO, Luigi Maria MONTI a Rosa RAO. Simple sequence repeats are able to trace tomato cultivars in tomato food chains. *Food Control*. 2011, 22(3), 549-554. DOI: 10.1016/j.foodcont.2010.10.002. ISSN 0956-7135. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713510003348>
- [33] GALVIN-KING, Pamela, Simon A. HAUGHEY a Christopher T. ELLIOTT. Herb and spice fraud; the drivers, challenges and detection. *Food Control*. 2018, 88, 85-97. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.12.031. ISSN 0956-7135. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713517306102>
- [34] P. WEDER, Jürgen K. Identification of Food and Feed Legumes by RAPD-PCR. *LWT - Food Science and Technology*. 2002, 35(6), 504-511. DOI: 10.1006/fstl.2002.0900. ISSN 0023-6438. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002364380290900X>
- [35] PEREIRA, Filipe, António AMORIM a Barbara VAN ASCH. Genetic and DNA-Based Techniques. *Comprehensive Analytical Chemistry: Food Protected Designation of Origin: Methodologies and Applications*. 2013, 2013, (60). DOI: 10.1016/B978-0-444-59562-1.00008-6. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444595621000086>
- [36] MALDINI, Milena, Francesco NONNIS MARZANO, Gloria González FORTES, Riccardo PAPA a Gilberto GANDOLFI. Fish and seafood traceability based on AFLP markers: Elaboration of a species database. *Aquaculture*. 2006, 261(2), 487-494. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2006.07.010. ISSN 0044-8486. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848606005060>
- [37] SOTELO, C.G. a R.I. PÉREZ-MARTÍN. Species identification in processed seafoods. *Food Science, Technology and Nutrition*. 2003, 323-346. DOI: 10.1533/9781855737181.2.323. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781855735262500194>

- [38] LENSTRA, J.A. DNA markers for animal and plant traceability. *Improving Traceability in Food Processing and Distribution*. 2006, 147-164. DOI: 10.1533/9781845691233.3.147. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781855739598500082>
- [39] GALIMBERTI, Andrea, Fabrizio DE MATTIA, Alessia LOSA, Ilaria BRUNI, Silvia FEDERICI, Maurizio CASIRAGHI, Stefano MARTELLOS a Massimo LABRA. DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Research International*. 2013, 50(1), 55-63. DOI: 10.1016/j.foodres.2012.09.036. ISSN 0963-9969. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096399691200395X>
- [40] TECHEN, Natascha, Iffat PARVEEN, Zhiqiang PAN a Ikhlas A KHAN. DNA barcoding of medicinal plant material for identification. *Current opinion in biotechnology*. 2014, 25, 103-110. DOI: 10.1016/j.copbio.2013.09.010. ISSN 1879-0429. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166913006721>
- [41] VAN DIJK, Erwin L., Hélène AUGER, Yan JASZCZYSZYN a Claude THERMES. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in genetics*. 2014, 30(9), 418-426. DOI: 10.1016/j.tig.2014.07.001. ISSN 0168-9525. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168952514001127>
- [42] TILLMAR, Andreas O., Barbara DELL'AMICO, Jenny WELANDER, Gunilla HOLMLUND a Manfred KAYSER. A Universal Method for Species Identification of Mammals Utilizing Next Generation Sequencing for the Analysis of DNA Mixtures. 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0083761. Dostupné tiež z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0083761>
- [43] BUERMANS, H.P.J. a J.T. DEN DUNNEN. Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochimica et biophysica acta*. 2014, 1842(10), 1932-1941. DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.06.015. ISSN 0006-3002. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092544391400180X>
- [44] SONG, Qinxin, Guijiang WEI a Guohua ZHOU. Analysis of genetically modified organisms by pyrosequencing on a portable photodiode-based bioluminescence sequencer. *Food chemistry*. 2014, 154, 78-83. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.01.001. ISSN 0308-8146. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614000065>
- [45] WILLEMS, Sander, Marie-Alice FRAITURE, Dieter DEFORCE, et al. Statistical framework for detection of genetically modified organisms based on Next Generation Sequencing. *Food chemistry*. 2016, 192, 788-798. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.07.074. ISSN 0308-8146. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615011073>
- [46] YOONG LIM, K., A. KOVARIK, R. MATYÁSEK, M. BEZDĚK, C. P. LICHTENSTEIN a A. R. LEITCH. Gene conversion of ribosomal DNA in *Nicotiana tabacum* is associated with undermethylated, decondensed and probably active gene units. *Chromosoma*. 2000, roč. 109, č. 3, s. 161-172. ISSN 1432-0886. DOI: 10.1007/s004120050424. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s004120050424>

- [47] ZHANG, Lingling, Bo WANG, Lei PAN a Junhua PENG. Recycling Isolation of Plant DNA, A Novel Method. *Methods in enzymology. Journal of genetics and genomics*. 2013, 40(1), 45-54. DOI: 10.1016/j.jgg.2012.10.001. ISSN 1673-8527. ISSN 0076-6879. Dostupné tiež z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1673852712001920>

## 9. Zoznam použitých skratiek a symbolov

DNA	deoxyribonukleová kyselina
PCR	polymerázová reťazová reakcia
CTAB	cetyltrimethylammonium bromid
PVP	polyvinylpyrrolidon
PVPP	polyvinylpolypyrrolidon
DIECA	diethylthiokarbamová kyselina
SPE	extrakcia na pevnej fázy
TEOS	tetraethoxysilan
HEMA	hydroxyethylmethakrylát
PGMA	poly(glycidil methakrylát)
mCNT	magnetické uhlíkové nanotrubičky
RFLP	polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov
RAPD	náhodne amplifikovaná polymorfná DNA
AFLP	polymorfizmus dĺžky amplifikovaných fragmentov
SNP	polymorfizmus jedného nukleotidu
SSR	opakované jednoduché sekvencie
GMO	geneticky modifikovaný organizmus