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 DNA Z VYBRANÝCH DRUHŮ KOŘENÍ

THE USE OF MAGNETIC PARTICLES FOR DNA ISOLATION FROM SELECTED SPICES

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE — **Bc. Martina Gaňová**
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE — **RNDr. Aleš Kovařík, CSc.**
SUPERVISOR

BRNO 2017

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

Zadání diplomové práce

Číslo práce:	FCH-DIP1034/2016
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka:	**Bc. Martina Gaňová**
Studijní program:	Chemie a technologie potravin
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce:	**RNDr. Aleš Kovařík, CSc.**
Akademický rok:	2016/17

Název diplomové práce:

Využití magnetických částic pro izolaci DNA z vybraných druhů koření

Zadání diplomové práce:

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

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

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

Bc. Martina Gaňová student(ka)	RNDr. Aleš Kovařík, CSc. vedoucí práce	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc. vedoucí ústavu

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

V Brně dne 31.1.2017

ABSTRAKT

Izolácia DNA z rastlinného pletiva v požadovanej kvalite je veľmi komplikovaná, hlavne z dôvodu prítomnosti látok, ktoré môžu interferovať pri amplifikácii DNA. Týmito látkami sú hlavne polyfenoly, polysacharidy, proteíny a rôzne farbivá. Chemická rôznorodosť takýchto látok môže mať významný vplyv na výťažok a kvalitu DNA pri použití jedného izolačného postupu. Hlavným cieľom práce bolo vyhodnotiť použitie mikroizolačného protokolu u príbuzných matríc na kvalitu izolovanej DNA ako aj zhodnotenie vplyvu inhibítorov izolovaných spolu s nukleovou kyselinou na jej amplifikáciu v PCR. DNA bola izolovaná zo sušenej mletej papriky (*Capsicum annuum*). V prvej fáze boli vzorky homogenizované s použitím lyzačného roztoku s cetyl trimetyl amónium bromidom. Následne bola DNA purifikovaná pomocou reverzibilnej adsorbcie na magnetické nosiče. Celkom bolo testovaných šesť rôzne modifikovaných nosičov. Koncentrácia a čistota získanej DNA bola stanovená spektrofotometricky meraním absorbancie roztoku DNA v TE pufre. Kvalita DNA bola overená amplifikáciou v PCR. Boli použité priméry špecifické pre rastlinnú ribozomálnu DNA (rDNA). Prítomnosť produktov PCR bola dokázaná agarózovou gélovou elektroforézou. Bolo zistené, že použitou mikrometódou je možné izolovať DNA odpovedajúcej čistoty, ktorá je vhodná pre genetickú analýzu pomocou PCR. Boli zistené rozdiely medzi magnetickými nosičmi, ktoré boli testované pre izoláciu DNA.

KĽÚČOVÉ SLOVÁ

mletá paprika, mikroizolácia DNA, magnetické častice, PCR

ABSTRACT

The isolation of DNA from plant tissue of the required quality is very complicated, especially because of the presence of substances that can interfere during amplification of DNA. These substances are mainly polyphenols, polysaccharides, proteins and various dyes. The chemical diversity of such materials can have a significant effect on the yield and quality of DNA using one isolation procedure. The main aim of the work was to evaluate the use of microisolation protocol for related matrices to the quality of the isolated DNA as well as the evaluation of the effect of inhibitors isolated with the nucleic acid to the amplification in the PCR. DNA was isolated from dried paprika (*Capsicum annuum*). In the first step, the samples were homogenized using a lysis reagent with cetyltrimethylammonium bromide. Subsequently, the DNA was purified by reversible adsorption on magnetic particles. It was tested six different modified particles. The concentration and purity of the obtained DNA was determined by spectrophotometry measuring the absorbance of the DNA solution in TE buffer. The quality of the DNA was confirmed by amplification in PCR. For the PCR were used primers specific for plant ribosomal DNA (rDNA). The presence of PCR products was detected by agarose gel electrophoresis. It was found out that used microassay is suitable for isolating of the DNA of the corresponding purity that is suitable for the genetic analysis by PCR. The differences were found between the magnetic particles that were tested for DNA isolation.

KEYWORDS

grounded paprika, microisolation of the DNA, magnetic particles, PCR

GAŇOVÁ, M. *Využití magnetických částic pro izolaci DNA z vybraných druhů koření.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 105 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Aleš Kovařík, CSc..

PREHLÁSENIE

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

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Moje poďakovanie patrí vedúcemu diplomovej práce RNDr. Alešovi Kovaříkovi, CSc. za jeho odborné rady pri tvorbe práce. Ďalej chcem poďakovať doc. RNDr. Alene Španovej, CSc. za jej pomoc, konzultáciu a čas pri riešení diplomovej práce. Svojej rodine ďakujem za ich cennú podporu počas celého štúdia.

1 Úvod 10
2 Teoretická časť 11
2.1 Autenticita potravín 11
2.1.1 Autenticita a analytické metódy 11
2.1.1.1 Metódy analýzy DNA 13
2.2 Miniaturizácia metód 14
2.3 Vplyv matrice na kvalitu DNA a PCR 15
2.3.1 Extrakčné metódy rastlinnej DNA 16
2.4 Inhibítory PCR koextrahované s rastlinnou DNA 17
2.5 Separácia DNA na pevnej fáze s použitím magnetických častíc 18
2.5.1 Materiály magnetického jadra 18
2.6 Polymerázová reťazová reakcia (PCR) 21
3 Cieľ práce 23
4 Experimentálna časť 24
4.1 Materiál 24
4.1.1 Rastlinný materiál a kontrolné DNA 24
4.1.2 Výrobky 25
4.1.3 Magnetické nosiče 26
4.1.4 Chemikálie 28
4.1.5 PCR komponenty 29
4.2 Roztoky 29
4.2.1 Roztoky pre lýzu bakteriálnych buniek 29
4.2.2 Roztoky pre prípravu homogenátov rastlinných buniek 29
4.2.3 Roztoky pre izoláciu DNA pomocou magnetických častíc 30
4.2.4 Roztoky pre gélovú elektroforézu 30
4.3 Pomôcky a prístroje 30
5 Metódy 31
5.1 Homogenizácia buniek z luskov papriky a korenia (mletá paprika) s použitím lyzačného roztoku s CTAB 31
5.2 Homogenizácia buniek z korenia (mletá paprika) s použitím sterilnej vody 31
5.3 Izolácia DNA pomocou magnetických nosičov z homogenátov 32

5.4 Prezrážanie a zakoncentrovanie izolovanej rastlinnej DNA 32
5.5 Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty izolovanej DNA 33
5.6 Príprava PCR zmesí 33
5.6.1 Program pre PCR 34
5.7 Agarózová gélová elektroforéza 35
5.7.1 Agarózová gélová elektroforéza DNA z korenia (sušenej papriky) 35
5.7.2 Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR 35
6 Výsledky 36
I. časť 36
6.1 Testovanie metódy mikroizolácie DNA po homogenizácii v lyzačnom roztoku CTAB. 36
6.2 Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie DNA 37
6.2.1 Overenie kvality DNA pomocou PCR 38
6.2.1.1 Priméry F_18S a R_5,8S 39
6.2.1.2 Priméry F_26S a R_26S 41
6.3 Overenie intaktnosti DNA po prezrážaní etanolom 42
6.3.1 Prezrážanie DNA 42
6.3.2 Gélová elektroforéza DNA 44
6.4 Izolácia rastlinnej DNA mikročasticami P(HEMA-*co*-GMA) po homogenizácii v sterilnej vode 45
6.4.1 Overenie kvality DNA pomocou PCR 46
6.4.1.1 Priméry F_18S a R_5,8S 46
6.5 Optimalizovaný postup mikroizolácie DNA 48
II. časť 48
6.6 Testovanie magnetických nosičov 48
6.6.1 Paprika sladká, mletá 49
6.6.1.1 Priméry F_18S a R_5,8S 50
6.6.2 Paprika štipľavá, mletá 52
6.6.2.1 Priméry F_18S a R_5,8S 53
6.6.2.2 Priméry F_26S a R_26S 54
6.6.3 Žitavská paprika sladká, mletá 56
6.6.3.1 Priméry F_18S a R_5,8S 57
6.6.3.2 Priméry F_26S a R_26S 58

6.7 Overenie intaktnosti DNA po prezrážaní etanolom 59
6.7.1 Prezrážanie DNA 59
6.7.2 Gélová elektroforéza DNA 60
6.8 Porovnanie magnetických nosičov 61
6.8.1 Množstvo izolovanej DNA 62
6.8.2 Kvalita DNA 62
6.8.2.1 Znečistenie proteínami 62
6.8.2.2 Znečistenie polyfenolickými látkami 63
6.8.3 Amplifikácia DNA v PCR 64
6.8.3.1 Produkty PCR 700 bp 64
6.8.3.2 Produkty PCR 220 bp 64
6.9 Výber najvhodnejšieho nosiča pre izoláciu DNA z korenia (paprík) 65
III časť 65
6.10 Izolácia rastlinnej DNA z komplexných potravinových výrobkov 66
6.10.1 Overenie kvality DNA v PCR 67
6.10.1.1 Priméry F_18S a R_5,8S 67
6.11 Testovanie prítomnosti bakteriálnej DNA v korení 69
6.11.1 Overenie prítomnosti bakteriálnej DNA pomocou PCR 70
6.11.1.1 Priméry F_eub, R_eub 70
7 Diskusia 72
7.1 Testovanie metódy mikroizolácie DNA po homogenizácii v lyzačnom roztoku CTAB.... 72
7.1.1 Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie DNA 72
7.1.2 Overenie kvality DNA pomocou PCR s primérami F_18S a R_5,8S 73
7.1.3 Overenie kvality DNA pomocou PCR s primérami F_26S a R_26S 74
7.2 Overenie intaktnosti DNA po prezrážaní etanolom 74
7.2.1 Prezrážanie DNA 75
7.2.2 Gélová elektroforéza DNA 75
7.3 Izolácia rastlinnej DNA mikročasticami P(HEMA-*co*-GMA) po homogenizácii v sterilnej vode 75
7.3.1 Overenie kvality DNA s primérami F_18S a R_5,8S 76
7.4 Testovanie magnetických nosičov 77
7.4.1 Paprika sladká, mletá 77

7.4.1.1 Overenie kvality DNA s primérami F_18S a R_5,8S ... 78
7.4.2 Paprika štipľavá, mletá ... 79
7.4.2.1 Overenie kvality DNA s primérami F_18S a R_5,8S ... 79
7.4.2.2 Overenie kvality DNA s primérami F_26S a R_26S ... 80
7.4.3 Žitavská paprika sladká, mletá ... 80
7.4.3.1 Overenie kvality DNA s primérami F_18S a R_5,8S ... 81
7.4.3.2 Overenie kvality DNA s primérami F_26S a R_26S ... 81
7.5 Overenie intaktnosti DNA po prezrážaní etanolom ... 82
7.5.1 Prezrážanie DNA ... 82
7.5.2 Gélová elektroforéza DNA ... 82
7.6 Porovnanie magnetických nosičov ... 82
7.6.1 Množstvo izolovanej DNA ... 83
7.6.2 Kvalita DNA ... 83
7.6.2.1 Znečistenie proteínami ... 83
7.6.2.2 Znečistenie polyfenolickými látkami ... 84
7.6.3 Amplifikácia DNA v PCR ... 84
7.6.3.1 Produkty PCR 700 bp ... 84
7.6.3.2 Produkty PCR 220 bp ... 84
7.7 Izolácia rastlinnej DNA z komplexných potravinových výrobkov ... 85
7.7.1 Overenie kvality DNA s primérami F_18S a R_5,8S ... 86
7.8 Testovanie prítomnosti bakteriálnej DNA v korení ... 86
7.8.1 Overenie kvality DNA s primérami F_eub a R_eub ... 87
8 Záver ... 88
9 Zoznam použitej literatúry ... 89
10 Zoznam použitých skratiek a symbolov ... 94
11 Zoznam príloh ... 95
12 Prílohy ... 96

1 ÚVOD

Autenticita potravín, krmiva a súvisiace správne označovanie produktov sú veľmi dôležité nielen ako záruka bezpečnosti ľudského zdravia ale aj na ochranu tradičných výrobkov. Pre overenie pravosti a zabráneniu falšovaniu produktov sú potrebné spoľahlivé techniky pre kontrolu potravín/krmiva. S cieľom zaručiť pravosť výrobkov a zabrániť čoraz častejšiemu falšovaniu produktov je potrebné vyvíjať spoľahlivé techniky pre ich kontrolu [1]. Molekulárne techniky založené na detekcii DNA nielenže pomohli stanoviť príbuznosť medzi členmi rôznych taxonomických skupín, ale tiež majú významné uplatnenie v detekcii biologického falšovania a autentifikácii širokej škály potravinárskych a poľnohospodárskych komodít [2]. Mikrobiologická analýza je taktiež neoddeliteľnou súčasťou kontroly kvality potravín ako aj riadenia bezpečnosti potravinových reťazcov. Mikrobiologické testovanie potravín zahŕňa preventívny prístup založený hlavne na vykonávaní a uplatňovaní konceptu HACCAP (Hazard Analysis and Critical Control Points). Často patogény, ktoré existujú sú obtiažne kultivovateľné alebo nekultivovateľné. Okrem imunologických testov, molekulárne metódy, najmä tie založené na PCR sú dostupnou možnosťou pre kontrolné účely [3]. Bolo dokázané, že kontaminácia korenia ako je červená paprika mykotoxínami sa môže vyskytnúť v akejkoľvek fáze produkcie od dozrievania až po sušenie a skladovanie. Ovplyvňujú to faktory ako klimatické podmienky regiónu, genotyp plodiny a typ pôdy. Nedávne recenzie potravinových produktov uvádzajú, že mletá paprika patrí medzi najviac kontaminované produkty ochranotoxinom A spolu s muškátovým orieškom, čili a koriandrom [4].

Odhaduje sa, že potravinové alergie ovplyvňujú takmer 5 % dospelých a 8 % detí s čoraz viac narastajúcim výskytom. Jediným účinným prostriedkom ochrany zdravia alergických jedincov je vyhýbanie sa potravinovým alergénom. Legislatíva EÚ vyžaduje povinné označovanie alergických zložiek potravín. Toto nariadenie obsahuje zoznam látok alebo skupiny látok, ktoré bežne spôsobujú alergie alebo neznášanlivosť, ktoré musia byť zdôraznené v zozname ingrediencii, bez ohľadu na množstvo. Avšak úplné obmedzenie alergénov je tažko dosiahnuteľné, pretože mnoho spracovaných potravín obsahuje alergény zámerne pridané ako zložky potravín ale nie sú ozanačené (horčica ako korenie), alebo neúmyselne kontamináciou počas výroby, prepravy alebo uskladnenia. Alergickú reakciu môžu spôsobiť aj orechy alebo mandle. K detekcii orechových alergénov v čokoláde boli využité extrakčné metódy DNA s úspešnou amplifikáciou [5]. Aplikácia PCR so špecifickými primérami umožnila detekciu pšenice, jačmeňa a raže v bezlepkových potravinách [6].

Experti na rastlinné biotechnológie považujú geneticky modifikované plodiny, ktoré získali odolnosť proti hmyzu, toleranciu voči herbicídom alebo kombináciu takýchto vlastností za úspešné splnenie cieľov. Druhá generácia biotechnologických plodín nesie gény pre zvýšenie výživnosti a rezistencie proti abiotickému stresu [7]. Avšak produkcia biotechnologicky modifikovaných plodín rastie a v snahe vyhnúť sa nezamýšľaným dôsledkom si EÚ a väčšina krajín legislatívne reguluje geneticky modifikované plodiny. Obsah geneticky modifikovaných plodin sa bežne stanovuje kvantitatívnou PCR (qPCR) a rastlinná genomová DNA poskytuje templát pre počiatočný krok v tomto procese [8].

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Autenticita potravín

V súčasnosti sa kladie veľký dôraz a záujem na kvalitu potravín pred kvantitou. Toto súvisí so zvyšujúcim sa priemerným vekom populácie vo väčšine rozvinutých krajín, čo vedie k veľkej skupine náročných konzumentov s vysokými požiadavkami na chuť a kvalitu jedla. Potravinový priemysel reaguje na takéto trendy zavádzaním nových skupín výberového tovaru: potravinové produkty propagujúce zdravé výživové hodnoty alebo gurmánsku kvalitu (či už regionálnu alebo tradičnú) spojenú so špecifickými kritériami [9]. Na popularite naberajú aj rastlinné potravinové doplnky, vďaka povedomiu, že rastlinné produkty sú bezpečné, „prírodné“ je zdravé, nedôvery v konvenčnú medicínu a tendecii k samoliečbe. Navyše globalizácia obchodu priniesla do Európy širokú škálu rastlín tradične používaných na iných kontinentoch [10].

Definíciu autenticity v slovníku nájdeme ako: „stav, ktorý je pravdivý alebo je v súlade s tým z akých údajných zdrojov pochádza, nefalšovaný“. Táto definícia udáva dodržiavanie súčasných právnych predpisov o označovaní, ale len do tej miery, že sú potravinové produkty správne popísané. Nezahŕňa napríklad kontaminanty, nepovolené aditíva, ak boli pridané neskôr a teda majú funkciu ako riedidlo, plnivo alebo predĺžiť expiračnú dobu. Preto aby bola definovaná „autenticita“, potravina musí dostať meno právne zálohované súpisom charakteristík, aby sa predošlo nedorozumeniam na trhu. Na názvy pod ktorými sú produkty predávané sú stanovené základné princípy definície výrobku komisiou. Hlavné aspekty potravinovej autenticity je zamerať sa na nesprávne označovanie, nedostačujúci popis, a falšovanie potravinových výrobkov z ekonomických dôvodov [9]. V Nemecku sa vyskytol prípad falšovania marcipánu, kde mandle sú ako jediná ingrediencia povolená k produkcii. Zato percipán je náhrada marcipánu, v ktorom sú mandle nahradené broskyňovými alebo marhuľovými jadrami. Krížová kontaminácia marcipánu s percipánom sa môže vyskytnúť, ak pri produkcii oboch produktov sa používa rovnaká výrobná linka. Týmto spôsobom, látky s alergénnym potenciálom parcipánu sa môžu vyskytnúť v marcipáne. Predpokladať sa môže ale aj zámerné nahradzovanie lacnejšími rastlinnými materiálmi [11].

Kritérií, ktoré určujú nefalšovanosť potravinových produktov je mnoho a líšia sa medzi rozličnými komoditami. Autenticita môže byť spájaná s pôvodom, rokom produkcie, konkrétnou metódou spracovania, typom, odrodou (druhom) alebo obsahom určitých hlavných zložiek vo výrobku s mnohými inými kritériami [9].

2.1.1 Autenticita a analytické metódy

Záujem spotrebiteľov po bezpečnosti a nutričných hodnotách potravín spolu s veľkou konkurenciou na trhu zdôrazňuje význam analýzy potravín. Tým vzniká potreba vyvíjať rýchle, spoľahlivé, presnejšie, menej pracné a náročné analytické metódy, čo je ťažká úloha, keďže zložky potravinových produktov sú veľmi rôznorodé. Ideálna analytická metóda, by

mala kombinovať jednokrokovú izoláciu, zakoncentrovanie a kvantitatívne stanovenie analytov (ktoré sú obvykle prítomné v stopových množstvách). Najmodernejšie meracie techniky však nie sú vždy dostatočne citlivé pre priamu analýzu bez predchádzajúcej úpravy analytov. Treba brať do úvahy, že každý ďalší krok v analytickom postupe zvyšuje pravdepodobnosť úbytku analytu, kontaminácie vzorky a analytických chýb. Preto je žiadúce minimalizovať počet krokov pri príprave vzorky bez zníženia kvality vzorky [12].

Existujú legislatívne stanovené národné a medzinárodné štandardy, ktoré môžu byť použité na posúdenie autenticity výrobkov. Aby bola autenticita preukázaná alebo vyvrátená, musia sa použiť nevyvrátiteľné analytické metódy, ktoré sú schopné zanalyzovať produkt za stanovených podmienok a definovaných štandardov [3]. Nové a pokročilé technológie sa stali viac rozšírené, ale tiež falšovanie sa stalo viac sofistikovaným. Nie je len potreba nových analytických techník pre vyhodnotenie pravosti ale tiež prehodnotenie týchto techník s cieľom udržať tempo s meniacim sa priemyslom a narastajúcimi rozdielnymi falšovacími metódami producentov. Ak je zložka, ktorá by nemala byť detegovaná prítomná, potom je klasifikovanie produktu ako nepravý jednoduché. Avšak, keď vzorka obsahuje iba atribúty, ktoré sa mohli vyskytnúť prirodzene, vďaka napríklad geografickému pôvodu, je rozhodnutie o pravosti/nepravosti vzorky veľmi komplikované. Analytické techniky musia byť schopné rozlíšiť malé rozdiely medzi botanickým pôvodom alebo rozdielnym spôsobom spracovania, rozlíšiť falšovanie komponentami chemicky veľmi podobným k skutočným alebo detegovať prímesi v stopových množstvách [9]. Príkladom je falšovanie údenej papriky "Pimentón de la Vera", ktorá je uznaná chráneným označením pôvodu, odrodami, ktoré sú cudzie tejto oblasti. Z nepravých druhov sú získané vyššie výťažky spracovanej papriky na úkor kvality, pretože sa líšia v spôsobe spracovania. Nepravé odrody nie sú vhodné pre údenie, pretože majú hrubší perikarp na rozdiel od tenkého perikarpu originálnych druhov, čím sa získavajú rozdielne senzorické vlastnosti. Vďaka analýze PCR bolo umožnené rozlíšiť jednotlivé odrody spracované odlišným spôsobom [13].

Medzi výsledkami získanými analytickými metódami vznikajú nezrovnalosti vďaka výrobným a spracovateľským technikám produktov. Analytické metódy sú ovplyvnené poľnohospodárskymi technikami, environmentálnymi podmienkami, klimatickými zmenami. To vedie k nesúladu a použitie určitých techník je veľmi zložité pre presné a spoľahlivé rozoznanie rastlinných druhov a to najmä v potravinárskych výrobkoch [6].

Separačné techniky ako plynová alebo kvapalinová chromatografia sú používané na charakterizáciu určitých produktov pokiaľ ide o chemické zloženie. Spektroskopické techniky ukázali významný potenciál ako rýchle, nedeštruktívne metódy pre posúdenie kvality. Pre štúdium fyzikálnych a chemických vlastností sa v potravinárskom priemysle využíva nukleárna magnetická rezonancia. Pre určenie botanického poprípade geografického pôvodu spracovaných produktov alebo surových materiálov má veľký prínos analýza stabilných izotopov. Biochemické metódy ako identifikácia druhov a odrôd na základe DNA patria medzi najnovšie techniky v oblasti hodnotenia autenticity potravín [14].

2.1.1.1 Metódy analýzy DNA

Analýza založená na DNA má zásadný význam pre zhodnotenie autenticity, pretože akákoľvek zmienka v súvislosti s prítomnosťou genetických materiálov rôznych druhov v potravinách nevyhnutne zahŕňa genetické overenie. Priemyselné spracovanie robí analýzu na základe iných biochemických zložiek potravín menej účinnú [15]. Metódy analýzy DNA sú považované za spoľahlivejšie z dôvodu stability DNA za rozdielnych environmentálnych podmienok, poľnohospodárskych a výrobných techník použitých počas spracovania určitých potravinárskych výrobkov [6]. Okrem toho analýza DNA umožňuje aj kvantitatívne stanovenie, či je produkt z jedného druhu alebo odrody zmiešaný s iným lacnejším druhom alebo odrodou. K falšovaniu dochádza nahradzovaním deklarovaného kultivaru s iným s nižšou komerčnou hodnotou, ale znehodnotený produkt stále predstavuje potravinu s prijateľnými organoleptickými vlastnosťami (napr. chybne deklarované odrody kávy: Arabica vs. Robusta). Takéto náhrady sú často biochemicky rovnaké materiálom, ktoré úmyselne nahradzujú, čím ich identifikáciu a kvantifikáciu robia zložitejšou. Avšak keďže potravinové matrice sú veľmi komplexné a majú rozdielne zloženie, je možné izolovať DNA dostatočnej kvality z celého radu produktov. DNA je omnoho odolnejšia k priemyselnému spracovaniu oproti ostatným molekulám ako sú RNA, proteíny alebo sekundárne metabolity. Napriek tomu, že najčastejšie dochádza k chemickej alebo fyzikálnej zmene DNA, existuje niekoľko metód pre analýzu DNA v potravinách s cieľom jednoznačnej identifikácie použitých druhov alebo odrôd (Tabuľka 1). Spomedzi bežne dostupných techník, PCR metódy sú veľmi rozšírené, pretože poskytujú kvalitatívne a kvantitatívne informácie aj keď je množstvo templátovej DNA nízke. Štandardná PCR je pravdepodobne najlacnejšou technikou pre DNA analýzu. Môže byť jednoducho používaná v analytických laboratóriách, pretože väčšina činidiel a komerčné kity sú komerčne dostupné a je potrebné len základné baboratórne zariadenie (ako je PCR cycler, automatické pipety, termostat, centrifuga, očkovací box) [15].

Tabuľka 1: Príklady využitia metód analýzy DNA pri autenticite potravín rastlinného pôvodu. Prevzaté z [6]

Potravinový produkt	**Zložka**	**DNA metóda**
Potravinové alergény	mandle	HRM analýza
	lieskové orechy	qPCR
	vlaské orechy	Taqman sondy
	píniové orechy	konvenčná PCR
Pečivo/cestovina	Pšenica	PCR-RFLP
	tvrdá pšenica	CE

Potravinový produkt	Zložka	DNA metóda
Lepok v potravinách	pšenica, jačmeň, raž	qPCR
Korenie	ženšen	Mikročip
	údená paprika	konvenčná PCR
	šafrán	SCAR markery
Rajčinové produkty	odrody rajčín	CE
Med	6 rôznych rastlín	sekvenčná analýza
Ovocné džúsy	7 druhov ovocia	konvenčná PCR
Spracované produkty	rajčiny, mrkva, zeler	qPCR
Mušt/Víno	odrody hrozna	CE
Olej	odrody olív	Mikročip

Skratky: CE-kapilárna elektroforéza; HRM-analýza kriviek topenia produktov PCR s vysokým rozlíšením; RFLP-polymorfizmus dĺžky restrikčných fragmentov; SCAR-sekvenčne charakterizované amplifikované oblasti; qPCR -polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase

2.2 Miniaturizácia metód

Súčasné trendy vo vývoji analytických postupov sa zameriavanú na vývoj protokolov a zariadení, ktoré sú malé, rýchle, citlivé a špecifické. Tieto ciele vyžadujú nové činidlá a postupy, ktoré sú potrebné pre predpokladanú aplikáciu alebo prenástrojovanie existujúcich systémov. Bez ohľadu na zvolený metodický prístup, problémy a požiadavky zostávajú podobné. Zahŕňajú nešpecifické väzby a ich odstránenie, imobilizáciu ligandov a iných molekúl, účinok matrice, potrebu prečistenia vzorky, jedno alebo viacnásobné použitie, jednoduchosť použitia, používateľov, legislatívne a spotrebiteľské prijatie a zváženie nákladov [16]. Napríklad biomolekuly ako enzými a DNA je obtiažné získať vo veľkom množstve, preto je dôležité vyvíjať biosystémy, ktoré môžu byť použité v malých množstvách a opakovane. Mikroanalytické systémy patria medzi obľúbené predmety výskumu analytickej chémie. Pre integráciu analytických systémov, sú zahrnuté do funkčnej jednotky rôzne procesy, ako reakčná zmes, reakcia, extrakcia, separácia a sú integrované v malom priestore ako je mikročip alebo kapilára. Vysoká účinnosť takéhoto analytického systému je dosiahnutá znížením objemu vzorky alebo činidiel, vysokou citlivosťou a skrátením analytického času [17].

Detekcia DNA je rozhodujúca v mnohých oblastiach vrátane klinickej a veterinárnej diagnostiky, priemyselného a environmentálneho testovania, poľnohospodárskeho výskumu a forenznej vedy. Analýza DNA z pôvodných vzoriek je komplexný proces, zahrňujúci rozmanité chemické zloženie ako aj viacstupňové reakcie. Koncentrácia DNA analytu v testovaných vzorkách je obvykle nedostatočná pre priamu detekciu. Z tohto dôvodu amplifikácia DNA je vyžadovaný krok k zvýšeniu koncentrácie cieľovej sekvencie. Koncepty miniaturizácie boli nedávno využité aj v oblasti fluidov. V posledných 20-tich rokoch sa mikrofluidy ukázali ako výkonný nástroj pre analýzu DNA. Vývojom metód na báze mikrofluidných čipov pre analýzu DNA je možné extrahovať, amplifikovať a detegovať DNA v jednom kroku a vo veľmi krátkej dobe [18]. Miniaturizácia a nanotechnológie vyvolali nové výzvy. Napríklad využitie nanočastíc v analytickom procese predtavuje nový trend zjednodušenia analytických metód a zlepšenie ich výkonu. Hybridné nanočastice majú výnimočné vlastnosti, ktoré umožňujú ďalšie zlepšenie analytických metód. Napriek neustálemu vývoju v ich syntéze a charakterizácii sú hybridné nanomateriály málo využívané v analytickej chémii [19].

2.3 Vplyv matrice na kvalitu DNA a PCR

U techník založených na analýze DNA sa vyžaduje extrakcia nukleovej kyseliny, ktorá má byť použitá v testoch ako je napríklad PCR. Boli vyvinuté početné metódy pre vysoký výťažok a ekonomicky efektívnu extrakciu DNA z rastlinných pletív. Medzi ne patria rýchle protokoly špeciálne optimalizované pre rastliny. Jedna z najčastejšie používaných metód pre extrakciu DNA z rastlín používa iónový detergent CTAB, aby došlo k narušeniu membrány a zmes chloroform-izoamylalkoholu, ktorý oddeľuje nečistoty do organickej fázy a nukleovú kyselinu do vodnej fázy. Avšak mnohé rastliny obsahujú veľké množstvo sekundárnych metabolitov. Tie môžu byť ťažko odstraniteľné bez ďalšieho prečistenia, často s organickými rozpúšťadlami ako je fenol alebo iné toxické zlúčeniny. [20]. Bolo publikovaných len málo prací s úspešnou izoláciou čistej nukleovej kyseliny z rastlinných druhov obsahujúcich veľké množstvo sekundárnych metabolitov. Polysacharidy a polyfenoly vážne ovplyvňujú izolačný postup nevratnou interakciou s DNA. Polysacharidy v dôsledku svojich chemických vlastností koprecipitujú s DNA, vytvárajú viskózne roztoky a je známe, že inhibujú funkciu enzýmov. Fenolové látky, ako terpenoidy a triesloviny podliehajú rýchlej oxidácii po ich uvoľnení z rastlinného tkaniva a irreverzibilne sa viažu na fosfátové skupiny DNA. Oba kontaminanty zabraňujú použitiu DNA pre účely molekulárnej biológie ako je PCR, restrikčná analýza, sekvencovanie inhibíciou aktivity polymeráz a endonukleáz [2].

Kvalita a kvantita izolovanej DNA z potravinových produktov má tendenciu klesať s rastúcim stupňom spracovania potravín. Vystavenie DNA zahrievaniu má za následok fragmentáciu vysokomolekulárnej DNA a fyzikálne a chemické opracovanie spôsobuje náhodné zlomy v reťazcoch DNA, znižovanie veľkosti DNA fragmentov. DNA vysokej kvality, ktorá nie je porušená môže byť získaná z mletých vzoriek napríklad obilnín a olejnín. Naopak DNA extrahovaná z vysoko spracovaných potravín a krmív je väčšinou viac

nalámaná s nízkou molárnou hmotnosťou. Takáto DNA nemusí byť vhodná ako DNA templát pre PCR, čím sa znižuje limit detekcie a kvatifikácie [7].

Vek a druh zdrojového pletiva významne ovplyvňuje kvalitu a výťažok izolovanej DNA. Mladé, zdravé a mäkké pletivá sú ideálnou voľbou, pretože dávajú výťažky dobrej kvality aj kvantity DNA vďaka veľkému počtu buniek a menšiemu obsahu škrobu a sekundárnych metabolitov. Na rozdiel u DNA extrahovanej z dozretých listov sa uvádza, že kvalita a výťažky DNA sú nízke kvôli prítomnosti vysokej koncentrácie polyfenolov, tanínov, polysacharidov a iných sekundárnych metabolitov [21].

Účinnosť extrakcie DNA je jednoznačne závislá na veľkosti častíc analyzovanej vzorky matrice. So znižujúcou sa veľkosťou častíc vzorky, výťažky narastajú. Tento jav môže byť jednoducho vysvetlený tým, že menšie častice majú väčší špecifický povrch, ktorý je vystavený extrakčnému činidlu v porovnaní s väčšími časticami [7].

2.3.1 Extrakčné metódy rastlinnej DNA

Medzinárodná organizácia pre štandardizáciu navrhla metódy založené na detergentoch ako aj dostupne komerčné kity, ktoré sú využívané pre extrakciu DNA ale tiež zdôrazňuje, že výber metódy je nevyhnutne závislý na matrici vzorky. Cieľom extrakčných metód nukleových kyselín je izolácia DNA vhodnej integrity, čistoty a dostatočnej kvantity pre diagnostické účely prostredníctvom PCR [21]. Separácia nukleovej kyseliny z analyzovaných vzoriek je neoddeliteľnou súčasťou viacstupňového identifikačného postupu. Hlavné kroky extrakcie DNA zahŕňajú lýzu buniek, inaktiváciu bunkových nukleáz, extrakciu a prečistenie DNA. Exitujú rôzne techniky pre izoláciu a prečistenie genomovej DNA z biologických matríc využívajúce var, hydrolýzu proteinázami, inkubáciu s detergentami alebo alkáliami [22].

Metódy, ktoré využívajú pre extrakciu cetyltrimethylammonium bromid (CTAB) sú najviac používané pre extrakciu rastlinnej DNA zo vzoriek listov, semien, zŕn a spracovaných potravín a krmiva. Základný extrakčný roztok CTAB obsahuje 2% CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA a 100 mM tris(hydroxymetyl)aminometán (Tris)-HCl, pH 8,0. Pôvodný protokol zahrňuje použitie extrakčného roztoku CTAB a chloroform/izoamylalkoholu (24:1) pre odstránenie proteínov a polysacharidov [23]. Postupne bol tento protokol modifikovaný a boli pridávané rôzne chemické látky ako napríklad proteináza K, merkaptoethanol, polyvinylpyrolidon (PVP) a iné za účelom odstránenia inhibítorov. Dnes existuje niekoľko verzií a modifikácií CTAB protokolu, ktoré sa líšia v rozdielnych koncentráciách zložiek, ktoré sú súčasťou CTAB extrakčného roztoku. Táto extrakčná metóda je často zdĺhavá, pretože pre ďalšiu analýzu ako je kvantitatívna PCR je potrebné DNA ďalej purifikovať [7].

Základný extrakčný roztok dodecylsulfátu sodného (SDS) pozostáva z 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA pH 8,0, 500 mM NaCl, 10 mM merkaptoetanol a 1% SDS.

Koncentrácie zložiek extrakčného roztoku sa môžu líšiť. Proteíny a polysacharidy boli odstránené ako komplex s nerozpustným dodecylsulfátom draselným z rôznych matríc [7].

Polyvinylpyrolidinová metóda je vhodná pre izoláciu DNA z matríc, ktoré obsahujú vysoké množstvo polyfenolických látok. Metóda vyžaduje tepelnú lýzu v prítomnosti SDS a EDTA nasledovanú prídavkom PVP a octanu amónneho k odstráneniu kontaminantov ako sú polyfenolické zlúčeniny a polysacharidy. Protokol bol použitý k extrakcií DNA z rôznych matríc, napríklad z kukuričných lupienkov, tofu alebo cereálnych tyčiniek [7].

Väčšina komerčne dostupných kitov môže byť použitá pre DNA extrakciu a zároveň aj pre jej purifikáciu. Väčšinou je množstvo použitej vzorky obmedzené pre extrakciu DNA takouto súpravou na 20-200 mg. Práca s DNA extrakčnými kity je väčšinou rýchlejšia ako metódy využívajúce CTAB a SDS, ale zato môžu byť drahšie. Úspech DNA extrakcie je závislý na druhu rastlinného materiálu a použitej matrici. Súprava vhodná pre extrakciu DNA jedného druhu matrice nemusí byť použiteľná pre iný druh matrice [7]. Pri testovaní extrakčných metód z kakaa a kakaových produktov, kde využili viacero kitov. Bolo zistené, že The Wizard Genomic DNA kit prejavil najlepší PCR výkon, keď bol aplikovaný na kakaový prášok. QIAamp DNA Stool kit ukázal najlepšie výsledky pre PCR detekciu kakaovej hmoty [24].

2.4 Inhibítory PCR koextrahované s rastlinnou DNA

Inhibítory sú hlavnou prekážkou pre účinnú amplifikáciu v PCR. Existujú rôzne druhy takýchto inhibítorov a rozličné techniky na odstránenie účinku inhibície. Inhibičný mechanizmus účinku niektorých zlúčenín môže byť spojený s vyzrážaním DNA, denaturáciou DNA alebo schopnosťou polymerázy viazať horečnaté ionty. Inhibítory môžu kineticky modifikovať PCR amplifikáciu prostredníctvom chelatácie Mg^{2+}, kofaktory pre všetky DNA polymerázy, vrátane *Taq* polymerázy alebo naviazaním sa na cieľovú DNA alebo na DNA polymerázu. Inhibítory enzýmov môžu pochádzať z rastlinného pletiva alebo činidiel použitých pre DNA izoláciu [7].

Medzi hlavné inhibítory rastlinnej DNA sa radia polysacharidy. DNA roztok sa stáva viskóznym vzhľadom na prítomnosť polysacharidov a ďalších látok [21]. U kyslých rastlinných polysacharidov (dextran sulfát, kyselina alginová) boli preukázané inhibičné vlastnosti [25] zatiaľ čo u neutrálnych polysacharidov (škrob, arabinogalaktan) sa nepotvrdili. Prítomnosť 0,001% dextran sulfátu zapríčinila kompletnú inhibíciu PCR, ale prítomnosť 4% dextranu (neutrálny polysacharid) nemal žiaden efekt na PCR. K PCR inhibítorom sa radia tiež fenol, EDTA, chlorid sodný a chlorid lítny [7]. Fenol inhibuje PCR. Fenolické zlúčeniny zo vzorky alebo prenesené z purifikácie nukleovej kyseliny môžu inhibivať PCR denaturáciou alebo naviazaním sa na polymerázu. Rastlinné fenolické zlúčeniny (taniny) sa ľahko oxidujú za tvorby kovalentne naviazaných chinónov a môžu ireverzibilne viazať proteíny a nukleové kyseliny za tvorby vysokomolekulárnych komplexov s pozmenenými vlastnosťami biopolymérov [26]. Iónové detergenty ako SDS sú uvádzané s vyšším inhibičným účinkom ako neiónové detergenty (Tween 20, Triton X-100) [25]. Koncentrácia CTAB a SDS viac

ako 0,005% inhibuje PCR. Tieto detergenty sú používané v prvých krokoch extrakcie DNA a teda zvyškové množstvá sú odstránené následným premytím vzorky. Etanol a 2-propanol sú rutinne používané pri extrakcií DNA aj keď môžu zapríčiniť inhibíciu PRC. Zvyškový etanol je odstránený vysušením DNA pred resuspendáciou. Zriedenie DNA napomáha zredukovať koncentráciu prítomných inhibítorov a zvýšiť efektivitu PCR, avšak nízka koncentrácia nukleovej kyseliny môže znižovať citlivosť polymerázovej reťazovej reakcie [7].

2.5 Separácia DNA na pevnej fáze s použitím magnetických častíc

Použitie magnetických častíc pre izoláciu buniek a DNA založenú na pevnej fáze pozostáva z dvoch procesov: naviazanie analytu (DNA) na povrch častice a špecifické oddelenie častice z komplexnej zmesi vzorky [22]. Ich možnosť použitia vo výskume je široká, znižujú čas analýzy, ako aj spotrebu množstva vzorky [27]. Magnetické nosiče s vhodným pufrom môžu byť použité pre separáciu nukleovej kyseliny priamo z hrubého lyzátu buniek. Proces nevyžaduje centrifugáciu [22].

Magnetické nano- a mikročastice sa zvyčajne skladajú z viacerých zložiek: magnetické jadro, polymérna ochranná vrstva a povrchová funkčná molekula [22]. Priemer magnetických častíc je obyčajne medzi 0,05 a 10 μm. Ich príprava môže byť rôzna a v súčasnosti mnoho z nich je dostupných komerčne [28]. Jednotná veľkosť častíc poskytuje rovnaké chemické vlastnosti [22] a je zárukou reprodukovateľných výsledkov meraných diagnostickými prístrojami [27]. Anorganická alebo polymérna vrstva chráni analyt pred priamym kontaktom s kovom (najčastejšie oxidy železa). Výhodou je aj úprava častíc povrchovou funkcionalizáciou s ohľadom na následnú imobilizáciu cieľovej molekuly. Polyméry z celulózy, polystyrénu a polyakrylových derivátov boli funkcionalizované rozličnými skupinami napr. amínami, karboxylovými kyselinami, hydroxylovými skupinami, streptavidinom, biotinom a inými protilátkami. Separácia nukleových kyselín pre následnú anylýzu (DNA amplifikáciu, DNA hybridizáciu, sekvencovanie) je jedna z najviac využívaných metód s použitím magnetických častíc, ktorých magnetické jadro je kompletne pokryté a tým nezasahujú v PCR [22].

2.5.1 Materiály magnetického jadra

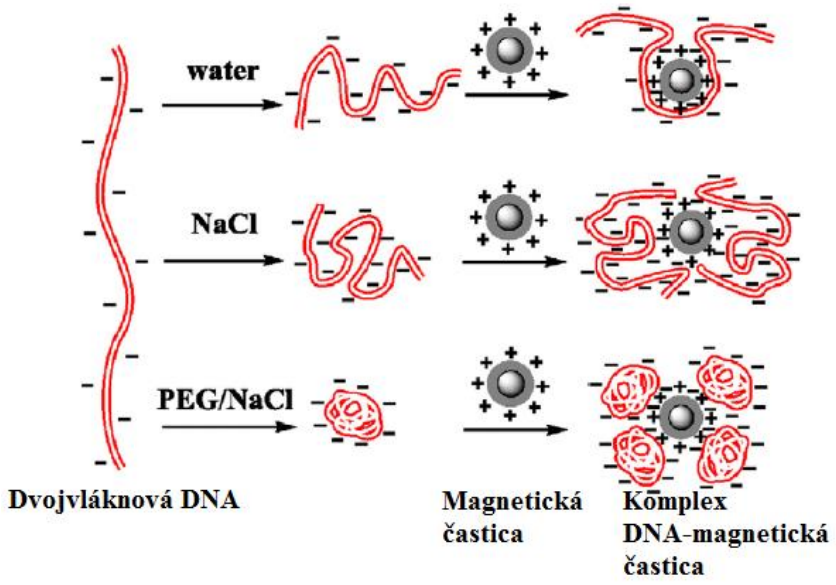
Magnetické jadro zaisťuje magnetické vlastnosti častíc. Ty môžu byť rozdelené do dvoch skupín podľa správania sa častíc v prítomnosti magnetického poľa. Rozlišujú sa slabé (paramagnetické, diamagnetické) a silné (feromagnetické) magnetické vlastnosti. Superparamagnetické vlastnosti sú kombináciou paramagnetických a feromagnetických vlastností . Takéto častice neprejavujú magnetické vlastnosti bez prítomnosti vonkajšieho magnetického poľa. Po odstránení magnetického poľa, väčšinou nevykazujú zbytkový magnetizmus, častice sú dobre rozptýlené a vytvárajú homogénnu suspenziu bez agregovania . Tieto požiadavky dobre splňujú niektoré oxidy železa (magnetit, maghemit a ferity). Materiály z oxidov železa sú relatívne bezpečné, netoxické a tolerantné k systémom *in vivo*. Avšak bolo dokázané, že niektoré typy nanočastíc môžu poškodzovať DNA [22].

Kobalt feritové magnetické jadro nanočastíc sa ukázalo ako genotoxické pre tkanivo pečene [29].

Fyzikálno-chemické vlastnosti nosičov, zvlášť ich povrchová úprava (funkcionalizácia) a náboj majú kľúčovú úlohu pri interakcii medzi časticou a cieľovou molekulovou alebo zlúčeninou z matrice [27]. Povrch magnetických častíc je často modifikovaný alebo pokrytý biokompatibilnými polymérnymi molekulami ako alginová kyselina, poly(vinylalkohol), dextran a inými nízko alebo vysoko molekulárnymi zlúčeninami. Hlavným cieľom pokrytia je zlepšiť koloidnú stabilitu častíc vo fyziologických roztokoch, znížiť toxicitu a minimalizovať adsorpciu proteínov a ďalších potenciálnych inhibítorov na povrch častíc. Pokrytie môže byť realizované aj prostredníctvom inertných materiálov ako fosforečnan vápenatý alebo zlato [22]. Ak sú magnetické nanočastice priamo vystavené biologickému systému budú sa pravdepodobne agregovať, čo bráni ich praktickému využitiu. Preto ich povrch musí byť modifikovaný vhodnou funkčnou skupinou a medzerníkom (organické ramienko, ktoré spája povrch častice s funkčnou molekulou), ktorý je veľmi dôležitý k zabráneniu takýchto limitácii. Na základe experimentov bolo preukázané, že dĺžka ramienka ovplyvňuje adsorpciu cieľovej molekuly [30].

Naviazanie pozitívne nabitých funkčných molekúl na povrch častíc je najjednoduchšia stratégia ako zaistiť interakciu DNA s časticou, pretože sa zvýši elekrostatická afinita fosfátových skupín nukleových kyselín, ktoré nesú negatívny náboj. Preferované častice pre extrakciu a purifikáciu nukleovej kyseliny je využitie amino skupín ($-NH_2$), ktoré vytvárajú kladne nabitý modifikovaný povrch častíc [22]. Rýchlosť interakcie môže byť ovplyvnená veľkosťou častíc a ich povrchom, hustotou distribúcie náboja a iontovou silou [31]. Využitím magnetických nanočastíc s naviazanými funkčnými skupinami akridínovej oranže bolo dokázané, že v prostredí solí so silno hydratovanými kationtami bola urýchlená adsorpcia [30]. Priestorová konformácia DNA má vplyv na jej adsorpciu na nanočastice. Schématické znázornenie adsorpcie DNA na magnetickú časticu v rôznom reakčnom prostredí je uvedené na Obrázku 1. Molekuly DNA nadobúdajú vo vodnom roztoku podlhovastú špirálovú konformáciu vďaka silnému odporu medzi negatívne nabitými fosfátovými skupinami. Dĺžka DNA je obyčajne niekoľko stoviek nanometrov, kým priemer nanočastíc je spravidla pod 100 nm. Preto, keď zmiešame DNA s magnetickými nanočasticami, voľne rozptýlené molekuly DNA môžu obaliť povrch nanočastice a tým obsadiť väčšinu väzbových miest na jej povrchu alebo dokonca asociovať s viacerými nanočasticami. Výsledkom je limitovaný počet molekúl DNA naviazaných na jednu nanočasticu. Pokiaľ sú molekuly DNA pred interakciou s časticami najskôr zmiešané s kondenzačnými činidlami (PEG a NaCl), je vyvolaný prechod štruktúry DNA z podlhovastej špirálovitej konformácie na veľmi husto kompaktný stav globulárneho tvaru. Dostupných negatívnych fosfátových skupín na DNA, ktoré sa môžu viazať na kladne nabité nanočastice je menej, eliminujú sa DNA špirály, ktoré obaľujú povrch nanočastíc. Iba časť z fosfátových skupín globulárnej DNA sa účastní elektrostatickej interakcie. V tejto súvislosti pozitívne nabité magnetické častice budú bez pochýb poskytovať silnejšiu elektrostatickú interakciu ako magnetické častice pokryté

karboxylovými skupinami, ktoré viažu DNA v prítomnosti PEGu a solí [31]. V prípade použitia polymerných častíc sa často vyskytuje problém s ireverzibilnou adsorpciou molekúl DNA. Množstvo desorbovanej DNA zostáva nízke aj keď sa zmení pH, iontová sila a teplota desorpčného média [22].



Obrázok 1: Schématické znázornenie adsorpcie DNA na magnetickú časticu v rôznom reakčnom prostredí. Upravené podľa [31].

Magnetické častice môžu byť pokryté napríklad veľmi často používaným polystyrénom. Jeho nevýhodou je jeho hydrofobicita. Vďaka čomu sa určité množstvo proteínov môže adsorbovať na hydrofóbny povrch častíc počas purifikácie DNA. Pre zníženie adsorpcie proteínov sa používajú hydrofilné P(HEMA) a PGMA častice. Najbežnejšie používanými funkčnými molekulami týchto častíc sú karboxylové skupiny, ktoré sú na povrch častíc zavedené napríklad oxidáciou povrchových hydroxymetylových skupín. U negatívne nabitých hydrofilných povrchov častíc sa nepredpokladá adsorpcia DNA, pretože povrch a DNA nesú rovnaký náboj. Zlúčenie DNA s negatívne nabitým sorbentom však môže prebiehať vďaka kondenzačnému mechanizmu vyvolaným polymérom a solami prítomnými v separačnej zmesi. Roztok umožňujúci kondenzačný proces obsahuje PEG 6 000 (alebo PEG 8 000) a NaCl, ktoré sú potrebné pre adsorpciu DNA na P(HEMA) magnetické častice modifikované karboxylovými skupinami [22]. DNA je desorbovaná vo vodnom roztoku, vďaka veľkej zmene odporu medzi negatívnymi karboxylami magnetických častíc a fosfátovými skupinami DNA [31].

Izolácia DNA založená na sekvencii báz a nie na chemických vlastnostiach ako v predchádzajúcich prípadoch je umožnená magnetickými časticami s naviazanými oligonukleotidami pre selektívnu izoláciu DNA. DNA/DNA hybridizácia je jeden z najviac selektívnych molekulárnych mechanizmov schopných rozpoznať cieľovú DNA sekvenciu v zmesi. Špecifické naviazanie cieľovej DNA podstatne odstraňuje kontamináciu necieľovou DNA a ďalšími nechcenými bunkovými zložkami (ako je RNA a proteíny). Metóda je

založená na silnej interakcii medzi dvoma komplementárnymi vláknami nukleovej kyseliny. Jednovláknový oligonukleotid (sonda) je imobilizovaný na povrch magnetických nano/mikročastíc. Takto upravené častice sú použité na rozpoznanie komplementárnej cieľovej DNA sekvencie pomocou hybridizácie [22]. Čím sú častice menšie, tým je väčšia miera hybridizácie sondy s cieľovou molekulou [27]. Cieľová DNA izolovaná magnetickými časticami hybridizáciou môže byť priamo použitá k amplifikácii. Ďalšou výhodou je eliminácia PCR inhibítorov a necieľových (nekomplementárnych) DNA molekúl [22].

2.6 Polymerázová reťazová reakcia (PCR)

V potravinových kontrolných laboratóriách na celom svete molekulárne biologické techniky zohrávajú čoraz dôležitejšiu úlohu v analýze potravín a zložiek potravín. Hoci klasické metódy využívajúce kultivačné, biochemické, cytologické alebo imunochemické postupy sa stále bežne používajú, molekulárne biologické metódy využívajúce PCR sú čoraz viac polpulárnejšou alternatívou v mnohých kontrolných potravinárskych inštitúciách. Popularitu PCR zabezpečuje rýchlosť, špecifickosť a dostatočná citlivosť tejto analýzy. Často veľmi degradované vzorky potravín môžu byť stanovené detekciou DNA pomocou PCR, pretože DNA môže byť stále amplifikovateľná, na rozdiel od iných metód využívajúce napríklad k detekcii proteíny [32].

Polymerázová reťazová reakcia sa stala jednou z najviac využívaných techník v molekulárnej biológii. Metóda umožňujúca amplifikáciu (namnoženie) špecifického úseku DNA „*in vitro*“, čím vznikajú špecifické sekvencie DNA v mnohých identických kópiach. Cyklicky sa opakuje syntéza určitého úseku DNA (nukleotidová sekvencia vymedzená pripojením dvoch primérov) v smere 5´→3´prostredníctvom DNA polymerázy [33].

PCR pozostáva z troch cyklicky sa opakujúcich krokov:

- **Denaturácia**: Zvýšením reakčnej teploty na 94 °C/30 – 60 s sa porušia vodíkové väzby medzi komplementárnymi bázami nukleových kyselín, teda templátové dvojvláknové DNA (dsDNA) sa rozpletú a vznikajú jednovláknové DNA (ssDNA).
- **Hybridizácia**: Priméry sa pripoja k templátu (ssDNA). Teplota tohto kroku sa zníži asi o 5 °C pod teplotu topenia priméru naviazaného na cieľovú DNA, zvyčajne je to 30 - 65°C/30 s. Teplota tohto kroku je závislá na obsahu báz G+C primérov.
- **Syntéza nového reťazca DNA**: Teplota je zvýšená obvykle na 65 - 75 °C/30 s, čo predstavuje teplotné optimum pre aktivitu DNA-polymerázy, ktorá syntetizuje nové vlákno DNA komplementárne k pôvodnej molekule. Závisí na polymeráze a dĺžke produktu PCR [33].

Komponenty vyžadované pre reakčnú zmes PCR:

- Templát DNA (matrica, cieľová DNA) – slúži ako matrica pre syntézu nových komplementárnych reťazcov DNA. Obsahuje senkvenciu, ktorá má byť amplifikovaná. Účinnosť amplifikácie je ovplyvnená kvalitou matricovej DNA.

- Pár primérov – synteticky pripravené krátke oligonukleotidy, ktoré vymedzujú amplifikovanú sekvenciu. Templátová DNA obsahuje cieľové miesta pre väzbu primérov, ktoré musia byť komplementárne. Vzájomne by priméry nemali byť komplementárne, aby nedochádzalo k vzniku dimérov primérov.

- Termostabilná DNA polymeráza – syntetizuje nové reťazce vybraných úsekov v smere 5′→3′ v komplementárnom reťazci templátu DNA od miesta naviazania primérov. V súčasnej dobe sa využívajú termostabilné polymerázy izolované z termofilných mikroorganizmov ako je baktéria *Thermus aquaticus*, príslušná polymeráza tejto baktérie sa nazýva *Taq* DNA polymeráza.

- dNTP (2′-deoxynukleozid-5′-trifosfáty) – základné stavebné kamene pre výstavbu nového reťazca DNA. Radíme sem dATP, dCTP, dGTP, dTTP, ktoré by mali byť zastúpené v ekvimolárnom množstve.

- Mg^{2+} ióny – sú potrebné ako kofaktory pre aktivitu DNA polymerázy. Vytvárajú komplexy s dNTP, primérmi a DNA templátmi, preto je nutné optimalizovať koncentráciu Mg^{2+} iónov v reakčnej zmesi.

- Voda pre PCR – doplní reakčnú zmes na požadovaný objem.

- PCR pufor – zabezpečí správny priebeh reakcie, pretože vytvára optimálne prostredie pre DNA polymerázu udržiavaním pH a iónovej sily [34].

Medzi základné kroky pri prevedení PCR patrí: znalosť sekvencie DNA (z DNA databázy, vlastné sekvencovanie), voľba primérov (navrhnutievlastných primérov, prevzatie z publikácie), navrhnutie profilu reakcie (zloženie reakčnej zmesi, optimalizácia teplotného profilu reakcie), prevedenie reakcie a detekcia produktov PCR (gélová elektroforéza) [35].

Kľúčom k úspechu PCR sú priméry. Sú to párové krátke oligonukleotidy (ssDNA) o veľkosti 18 – 30 nukleotidov. Predný „forward“ sa pripája v smere 5′→ 3′ a zadný „reverse“ sa pripája na komplementárne vlákno DNA a to taktiež v smere 5′→ 3′. Priméry sa viažu na oba konce amplifikovaného úseku, zodpovedajú za špecifitu reakcie a vzdialenosť medzi primérami udáva veľkosť produktu PCR (amplikonu) [33].

Konvenčná PCR je citlivá, umožňujúca za optimalizovaných podmienok detegovať jedinú cieľovú molekulu DNA na reakciu v typickom objeme 25-50 µl. Takáto neobyčajná citlivosť PCR metódy môže však viesť k detekcií náhodných kontaminantov. Čas analýzy je niekoľko hodín, systém nie je automatizovaný a riziko kontaminácie je vyššie. Navyše pokiaľ je detekcia amplikónov prevedená agarózovou gélovou elektroforézou, množstvo DNA v amplikónoch nemusí odpovedať počiatočnej koncentrácií cieľových molekúl DNA. Nedostatky konvenčnej PCR odstraňujú rôzne modifikácie PCR, ktoré zahrňujú novšie kvantitatívne techniky PCR. [36].

3 CIEĽ PRÁCE

Cieľom prvej časti práce bolo vypracovať mikrometódu izolácie DNA zo sušenej mletej papriky s využitím reverzibilnej adsorpcie DNA na magnetické častice P(HEMA-*co*-GMA). Vyhodnotiť kvalitu izolovanej DNA vrátane jej amplifikácie v PCR.

Cieľom druhej časti práce otestovať a porovnať rôzne modifikované magnetické nosiče (HPS B-M-NH_2, P(HEMA-*co*-GMA)NH_2, MPG, PGMA ox, PLL) z hľadiska množstva, kvality a amplifikovateľnosti izolovanej DNA.

Cieľom tretej časti práce bolo navrhnutý izolačný protokol aplikovať pre izoláciu DNA z komplexných potravinových výrobkov (gulášová polievka, harrisa, budapešťský krém a tvarôžková pomazánka pikant) obsahujúcich mletú papriku s využitím nosičov umožňujúcich izoláciu DNA v kvalite pre PCR.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Materiál

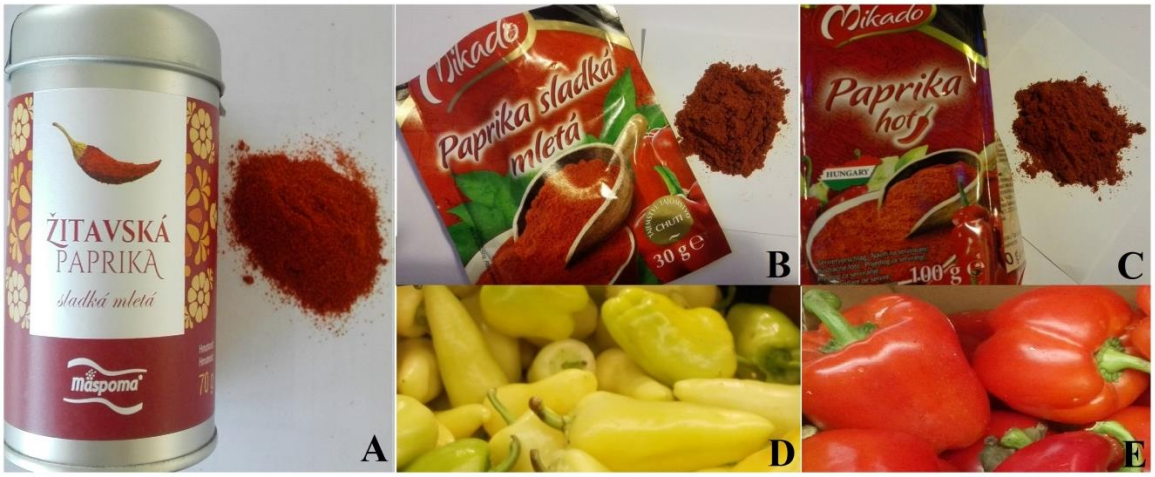
4.1.1 Rastlinný materiál a kontrolné DNA

Pre izoláciu DNA bolo použité nasledujúce korenie ako rastlinný materiál, zakúpené boli v komerčnej sieti Tabuľka 2 a Obrázok 2.

Tabuľka 2: Použité korenie/rastlinný materiál pre izoláciu rastlinnej DNA.

Korenie/rastlinný materiál	Časť rastliny	Typ obalu, spôsob uskladnenia	Spracovanie	Ďalšie zložky
Žitavská paprika, sladká mletá		Polyetyléntereftalát, polypropylén, hliník, lab. teplota	Mletie, sušenie	
Paprika sladká, mletá		Papier a lepenka/plasty/hliník, lab. teplota	Mletie, sušenie	Horčica, zeler, sója, mlieko, obilniny, vajcia
Paprika hot (Paprika štipľavá mletá)		Polyetylén nízkej hustoty, lab. teplota	Mletie, sušenie	
Paprika zelená, čerstvá	Lusk			
Paprika červená, čerstvá	Lusk			

Obrázok 2: Použité korenie/rastlinné materiálny: A) Žitavská paprika sladká, B) Paprika sladká, mletá, C) Paprika hot, D) Paprika zelená, čerstvá, E) Paprika červená, čerstvá.



Dodávateľom papriky sladkej, mletej je Lidl Česká republika v.o.s. pod značkou Mikado. Výrobcom papriky pikantnej, mletej je Maďarsko a dodávateľom je Lidl Česká Republika

v.o.s. pod značkou Mikado. Žitavská paprika sladká mletá je vyrábaná spoločnosťou Mäspoma spol. s r.o., Zvolen, Slovenská Republika.

Kontrolná DNA bola izolovaná z rastliny *Capsicum annuum* (paprikových luskov červenej 17,5 ng·µl^{-1} a zelenej papriky 18,2 ng·µl^{-1}),ktoré boli zakúpené v obchodnej sieti. Ďalšími kontrolnými DNA boli *Brassica oleracea* (10 ng·µl^{-1}) *a Nicotiana tabacum* (10 ng·µl^{-1}), ktoré boli získané od RNDr. A. Kovaříka, CSc. *Bifidobacterium animalis* CCM 4988^{T} (10 ng·µl^{-1}) a lambda DNA *Hind*III (50 ng·µl^{-1}) boli získané od doc. RNDr. A. Španovej, CSc.

4.1.2 Výrobky

Pre izoláciu DNA z komplexných potravinových produktov boli použité výrobky zakúpené v komerčnej sieti Tabuľka 3 a Obrázok 3.

Tabuľka 3: Použité výrobky

Názov výrobku	Typ obalu, spôsob uskladnenia	Spracovanie	Zloženie
Gulášová polévka	Kompozit/papier, lab. teplota	Dehydratovaný výrobok	Zemiaky, cibuľa, rajčinový prášok, cesnak, petržlen, pšeničná múka, palmový tuk, jedlá soľ chlorid draselný, kmín, majoránka, čierne korenie, hovädzie mäso, aromáty, hydrolyzované rastlinné bielkoviny, cukor kvasničný extrakt, cibuľová šťava, slnečnicový olej, mlieko, vajce, zeler, horčica
Harissa (Ostrá zeleninová pochoutka)	Bezfarebné sklo, 5°C	Spracovaná zelenina chemicky konzervovaná	Paprika, voda, ocot, soľ, cukor, modifikovaný škrob, korenie, konzervant E 211
Budapešťský krém	Plast, 5°C	Chemická konzervácia	Tvaroh (mlieko, jedlá soľ, syridlo), marinovaná cibuľa (cibuľa, kvasný liehový ocot,), margarín (palmový tuk, repkový olej, pitná voda, emulgátory-lecitíny, mono- a diglyceridy mastných kyselín, kyselina sorbová, maslová aróma,farbivo-koroteny), majonéza (repkový olej, pasterovaný vaječný žĺtok, cukor, kvasný ocot, zahusťovadla-guma guar, xanthan, kontervant-benzoan sodný), sterilovaná kapia, korenie

Názov výrobku	Typ obalu, spôsob uskladnenia	Spracovanie	Zloženie
Tvarůžková pomazánka pikant	Plast, 5°C	Chemická konzervácia	Palmový, repkový, kokosový rastlinný tuk, ztužený palmový a slnečnicový tuk, pitná voda, estery polyglycerolu, lecitíny, mono- a diglyceridy mastných kyselín, jedlá soľ, kyselina citrónová, karoteny, bravčové mäso, zemiakový škrob, bravčové sadlo, cesnak, stabilizátory (E450, E451, E452, E500), guarová guma, dusitan sodný, korenie, dextróza, maltodextrin, cukor, karmíny, olomoucké tvarôžky (tvaroh, mliekarenské kultúry), vaječné žĺtky, liehový kvasný ocot, sterilovaná cibuľa, pažitka, feferony, kápia, konzervanty (benzoán sodný, sorban draselný)

Obrázok 3: Použité výrobky

Distribútorom Knorr Gulášovej polievky je UNILEVER, spol. s r.o., Praha, Česká Republika. Harissa je vyrábaná spoločnosťou PIKA, a.s., Bzenec, Česká Republika pod značkou Hamé. Budapešťský krém a Tvarůžková pomazánka pikant boli zakúpené u predajcu Globus ČR k.s., Brno. Bližšie informácie o výrobcovi nie sú uvedené.

4.1.3 Magnetické nosiče

K izolácii DNA boli použité uvedené magnetické nosiče vždy s koncentráciou 2 $mg \cdot ml^{-1}$ okrem nanočastíc PLL o koncentrácii 0,2 $mg \cdot ml^{-1}$. Častice boli syntetizované na Ústave makromolekulárnej chémie Akadémie vied ČR v Prahe Ing. D. Horákom, CSc. Charakteristika, typ polyméru, obsah železa v jadre, priemer častíc (Dn), priemerná hmotnosť

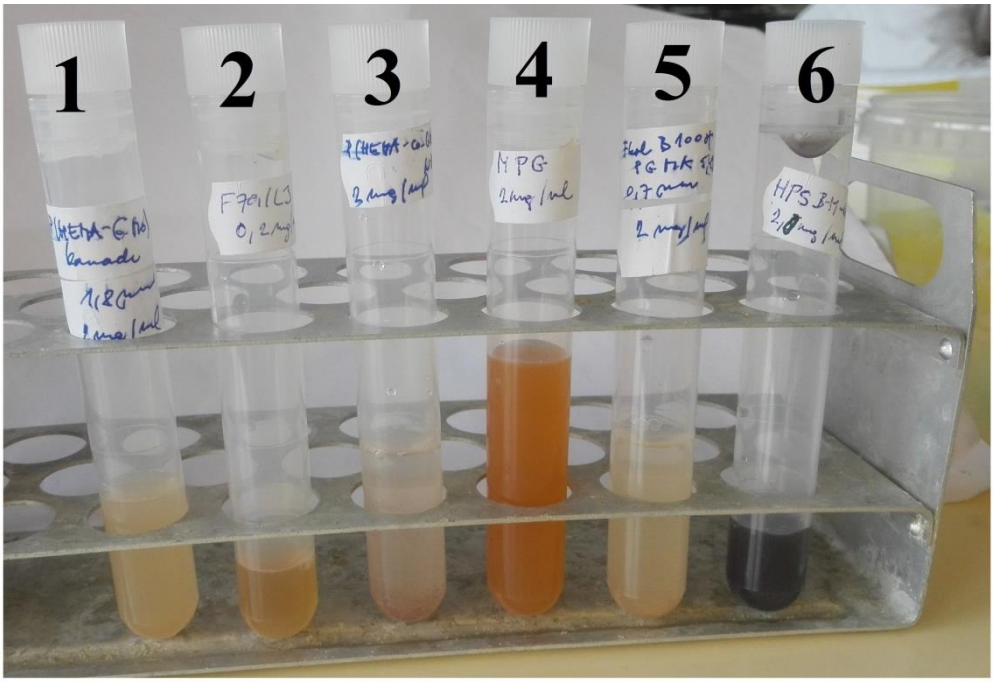
(Dw) a index polydisperzity (PDI) sú uvedené v Tabuľke 4, ak boli hodnoty charakteristiky jednotlivých častíc dostupné. Jednotlivé častice ukazuje Obrázok 4.

Tabuľka 4: Charakteristika magnetických častíc.

Častice	Popis	Fe [%]	Dn [μm]	Dw [μm]	PDI	Funkcionalizácia	Pôvod
P(HEMA-*co*-GMA)	mikročastice poly(2-hydroxyethyl methakrylát-co-glycidyl methakrylát)	10,02	2,23	2,24	1,81	-COOH (0,76 $mM \cdot g^{-1}$)	A
HPS B-M-NH_2	hypersieťované mikročastice poly(styren-co-divinyl benzenové)	-	5,7	-	-	-NH_2 (4,5 $mM \cdot g^{-1}$)	A
P(HEMA-*co*-GMA)NH_2	mikročastice poly(2-hydroxyethyl methakrylát-co-glycidyl methakrylátu)	-	-	-	-	-NH_2	A
MPG	mikročastice magnetické porézne sklo	-	5,0	-	-	-OH	B
PGMA ox	mikročastice poly(glycidyl methakrylátu)	5,36	0,7	0,810	1,16	-COOH (0,67 $mM \cdot g^{-1}$)	A
PLL	nanočastice oxidov železa pokryté poly(L-lysinom)	72,4	0,141	-	0,52	poly(L-lyzin)	A

A: Z Ústavu makromolekulárnej chémie AV ČR, Praha Ing. D. Horák, CSc.
B: Z komerčných zdrojov.

*Obrázok 4:**1:** P(HEMA-co-GMA), **2:** PLL, **3**: P(HEMA-co-GMA)NH_2, **4**: MPG, **5**: PGMA ox, **6**: HPS B-M-NH_2.*



4.1.4 Chemikálie

- Agaróza pre elektroforézu (Serva, Heidelberg, SRN)
- β-merkaptoetanol (Sigma, St. Louis, USA)
- Cetyltrimetylamonium bromid (Sigma, St. Louis, USA)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- DNA *Brasssica oleracea a Nicotiana tabacum* (RNDr. A. Kovařík, CSc.)
- DNA *Bifidobacterium animalis* CCM 4988^T (doc. RNDr. A. Španová, CSc.)
- DNA veľkostný štandard (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma, St. Louis, USA)
- Etanol, 70% (Penta, Chrudim, ČR)
- Etanol, 96% (Penta, Chrudim, ČR)
- Etídiumbromid (Sigma, St. Louis, USA)
- Chlorid sodný (Sigma, St. Louis, USA)
- Kyselina etyléndiamíntetraoctová (EDTA) (Sigma, St. Louis, USA)
- Lambda DNA *Hind*III (New England BioLabs, USA)
- Lyzozým p. a. (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- Nanášací pufor Yellow load (Top-Bio, Praha, ČR)
- Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)
- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- Polyetylén glykol 6 000 (PEG 6 000) (Sigma, St. Louis, USA)
- Proteináza K p. a. (Sigma, St. Louis, USA)
- Tris-HCl (Penta, Chrudim, ČR)
- Zmes dNTP, 10 mM (Top-Bio, Praha, ČR)

4.1.5 PCR komponenty

- Voda pre PCR
- PCR dNTP mix 10mM (Top-Bio, Praha, ČR)
- Oligonukleotidové priméry
  F_eub, R_eub [37]; F_18S, R_5,8S [38], [39]; F_26S, R_26S [38], [39]
- Taq DNA polymeráza 5U/µl (Top-Bio, Praha, ČR)
- Taq DNA polymeráza 1.1 1U/µl (Top-Bio, Praha, ČR)
- 10x koncentrovaný reakčný pufor (Top-Bio, Praha, ČR)
- 10x koncentrovaný PCR Blue Buffer (Top-Bio, Praha, ČR)

4.2 Roztoky

Roztoky boli pripravené podľa skript Španovej a Ritticha [34].

4.2.1 Roztoky pre lýzu bakteriálnych buniek

- 0,5 M kyselina etyléndiamíntetraoctová, pH 8,0
  186,1 g EDTA bolo rozpustených v 800 ml destilovanej vody za súčasného zahrievania na 68 °C. pH sa upravilo na 8,0, roztok bol doplnený destilovanou vodou na objem 1 l a sterilizovaný v autokláve (121 °C/20min).
- 1 M Tris-HCl, pH 7,8
  12,1 g Tris-bázy sa rozpustilo v 70 ml destilovanej vody, pH sa upravilo na 7,8, roztok sa destilovanou vodou doplnil na objem 100 ml a sterilizoval (121 °C/20min).
- Lyzačný roztok A
  Roztok sa pripravil sterilne zmiešaním 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,8) s 1 ml 0,5 M EDTA pH (8,0) a 98 ml destilovanej vody.
- Lyzačný roztok B
  Lyzozým sa pridal do lyzačného roztoku A v množstve 3 $mg \cdot ml^{-1}$
- 20% dodecylsulfát sodný
  20 g SDS sa rozpustilo v 80 ml sterilnej destilovanej vody, pH sa upravilo na 7,8 a roztok sa doplnil na objem 100 ml destilovanou vodou.

4.2.2 Roztoky pre prípravu homogenátov rastlinných buniek

- Lyzačný roztok CTAB
  1 g cetyl triethylamonium bromidu bol rozpustený v 10 ml 0,5 M Tris-HCl (pH8,0), 16 ml 5 M NaCl, 2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 42 ml destilované vody.
- 0,5 M Tris-HCl, pH 8,0
  6,05 g Tris-bázy sa rozpustilo v 70 ml destilovanej vody, pH sa upravilo na 8,0, roztok sa destilovanou vodou doplnil na objem 100 ml a sterilizoval (121 °C/20min).
- 5 M NaCl
  58,4 g NaCl sa rozpustilo v 150 ml destilovanej vody. Roztok sa doplnil na objem 200 ml destilovanou vodou a sterilizoval sa v atokláve (121 °C/20min).
- 0,5 M kyselina etyléndiamíntetraoctová, pH 8,0

186,1 g EDTA bolo rozpustených v 800 ml destilovanej vody za súčasného zahrievania na 68 °C. pH sa upravilo na 8,0, roztok bol doplnený destilovanou vodou na objem 1 l a sterilizovaný v autokláve (121 °C/20min).

4.2.3 Roztoky pre izoláciu DNA pomocou magnetických častíc

- 40% polyetylénglykol 6 000 (PEG 6 000)
  40 g PEG 6 000 sa rozpustilo v 60 ml sterilnej destilovanej vody. Roztok sa doplnil na objem 100 ml destilovanou vodou a sterilizoval sa v autokláve (121 °C/20min).
- 5 M chlorid sodný
  58,4 g NaCl sa rozpustilo v 150 ml destilovanej vody. Roztok sa doplnil na objem 200 ml destilovanou vodou a sterilizoval sa v atokláve (121 °C/20min).
- 70% etanol
  Pripravil sa riedením z 96% etanolu.
- Tris-EDTA pufor (TE pufor), pH 7,8
  Roztok sa pripravil sterilne zmiešaním zo zásobných roztokov 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,8), 200 μl 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 98 ml sterilnej destilovanej vody.

4.2.4 Roztoky pre gélovú elektroforézu

- 0,5x Tris-borát-EDTA (TBE) pufor
  54 g Tris-bázy a 27,5 g kyseliny boritej sa rozpustilo v 600 ml destilovanej vody, pridalo sa 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a doplnilo sa na objem 1 l destilovanou vodou. Pred použitím sa roztok nariedil 10x, aby výsledná koncentrácia bola 0,5x TBE.
- Roztok etídiumbromidu
  100 μl roztoku etídiumbromidu sa (0,5 $\mu g \cdot ml^{-1}$) sa zriedil 500 ml destilovanej vody.
- Lambda DNA *Hind*III (48 503, 23 130, 9 416, 6 557, 4 361, 2 322, 2 027, 564 bp)
- DNA veľkostný štandard Malamité
  100 bp rebríček obsahujúci DNA fragmenty o veľkosti 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1 000,1 200, 1 500 bp.
- Nanášací pufor Yellow load
  6x koncentrovaný, roztok s vysokou hustotou a s obsahom farbiva Oranž G.

4.3 Pomôcky a prístroje

- Analytické váhy OHAUS Pioneer (Ohaus, USA)
- Centrifúga MINI Spin 13 400 min^{-1} (Eppendorf, Nemecko)
- Huawei fotoaparát (Huawei Technologies Co. Ltd, Čína)
- Elektroforetická vaňa Owl D2 Wild Gel System (Thermo Scientific Owl Separation System, USA)
- Laboratorné váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, USA)
- Magnetický separátor Dynal (Oslo, Nórsko)
- Mikrovlnná rúra PROLINE SM117 (SENCOR, ČR)
- Mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Poľsko)
- Thermal cycler DNA Engine (BIO-RAD Lab., USA)

- MiniInkubátor Labnet (Labnet international Inc., USA)
- NanoDrop 2000 (Termo Scientific, Wilmington, USA)
- Transilluminátor TVR- 3121 (Spectroline, USA)
- Zdroj elektrického napätia pre elektroforézu Enduro 300 V (Labnet, USA)
- Bežné laboratórne sklo, laboratórne pomôcky a umelohmotný materiál

5 METÓDY

5.1 Homogenizácia buniek z luskov papriky a korenia (mletá paprika) s použitím lyzačného roztoku s CTAB

- Každá vzorka sa spracovala v štyroch paralelných opakovaniach.
- Asi 0,1 g analyzovaného materiálu bolo naväžených do 1,5 ml Eppendorfových skúmaviek a za stáleho chladenia vo vymrazenom kovovom stojane do Eppendorfovej skúmavky bolo pridané 500 µl lyzačného činidla s CTAB a 1 µl β-merkaptoetanolu.
- Následne bola prevedená homogenizácia za chladu pomocou kopistu.
- Vzorky sa nechali inkubovať pri 60 °C po dobu 30 minút v termostate.
- Nasledovala centrifugácia pri 14 500 ot·min^{-1} po dobu 10 minút a získaný supernatant bol odpipetovaný do čistej Eppendorfovej skúmavky.
- 100 µl takto pripraveného homogenátu buniek z rastlinného materiálu bolo použité k izolácií DNA magnetickými časticami.

5.2 Homogenizácia buniek z korenia (mletá paprika) s použitím sterilnej vody

a) Pre izoláciu rastlinnej DNA

- Približne 0,1 g rastlinného materiálu (iba vzorky mletých paprík) bolo naväžených do 1,5 ml Eppendorfových skúmaviek.
- Bolo pridané 500 µl sterilnej vody a následne bola prevedená homogenizácia pri laboratórnej teplote pomocou kopistu.
- Takto pripravený homogenát buniek z rastlinného materiálu (100 µl alebo 300 µl) bol použitý k izolácií DNA magnetickými časticami ako DNA (homogenát buniek).
- Homogenát bol veľmi viskózny a pre pipetovanie sa musela použiť špička s ustrihnutým koncom, preto bolo pipetované množstvo DNA len približné.

b) Pre izoláciu bakteriálnej DNA

- Približne 0,1 g mletej papriky, ktorá bola naväžená do 1,5 ml Eppendorfových skúmaviek bolo rozsuspendované v 500 µl sterilnej vody.
- Nasledovala centrifugácia pri 14 500 ot·min^{-1} po dobu 10 minút a supernatant sa opatrne zlial.
- K získanému sedimentu sa pridalo 500 µl lyzačného roztoku B. Suspenzia sa dokonale premiešala a nechala inkubovať 1 hodinu pri laboratórnej teplote.
- Následne sa pridalo 12,5 µl detergentu 10% SDS a 5 µl proteinázy K 100 mg·ml^{-1}. Roztoky boli premiešané a nechali sa inkubovať v termostate pri 55 °C cez noc.

- Nasledujúci deň sa vzorky zcentrifugovali pri 14 500 ot·min^{-1} po dobu 10 minút a 100 µl získaného supernatantu bolo použité v separačnej zmesi.

5.3 Izolácia DNA pomocou magnetických nosičov z homogenátov

- Bola izolovaná DNA nasledujúcim postupom. Výsledná koncentrácia PEG 6 000 bola 8 alebo 16 %.
- Do sterilných Eppendorfových skúmaviek bola namiešaná separačná zmes podľa Tabuľky 5 a bolo dodržané presné poradie jednotlivých zložiek.

Tabuľka 5: Zloženie separačnej zmesi.

Krok	Zložka	Objem [µl]	
		16% PEG 6 000	8% PEG 6 000
1	5 M NaCl	400	400
2	DNA (homogenát buniek)	100	300
3	40% PEG 6 000	400	200
4	Magnetický nosič	100	100
Celkom		1000	

- Po zmiešaní všetkých komponent sa zmes inkubovala 15 minút pri laboratórnej teplote, následne sa zmes umiestnila do magnetického separatóru a magnetické častice sa separovali 5 minút (20 minút ak boli použité PLL nosiče) pri laboratórnej teplote.
- Supernatant sa odobral a do Eppendorfovej skúmavky sa pridalo 500 µl 70% etanolu, vzorka sa premiešala a magnetické častice sa separovali 2 minúty na magnetickom separátore. Etanol bol odobraný a magnetické častice s naviazanou DNA boli opäť premyté 100 µl 70% etanolom.
- Zvyšný etanol sa nechal odparovať pri teplote 55 °C v termostate a izolovaná DNA naviazaná na magnetické častice sa eluovala do 100 µl TE pufru pri laboratórnej teplote 1 hodinu.
- Častice boli odseparované pomocou separátoru 2 minúty pri laboratórnej teplote a eluát obsahujúci DNA sa odobral do čistých mikroskúmaviek.
- Takto pripravená DNA bola nariedenená 10x, poprípade 100x TE pufrom a použitá pre spektrofotometrické stanovenie koncentrácie DNA a PCR.

5.4 Prezrážanie a zakoncentrovanie izolovanej rastlinnej DNA

- Všetky paralelne izolované vzorky DNA z rovnakej matrice sa prepipetovali do jednej Eppendorfovej skúmavky.
- K 300 µl objemu vzorky DNA, bolo pridané 15 µl 3 M octanu sodného a vzorka DNA sa premiešala.
- Následne sa pridal 800 µl etanolu (96 %, -20 °C), zmes bola dobre premiešaná a DNA sa zrážala pri -20 °C po dobu 15 minút.
- Vzorka sa zcentrifugovala pri 14 500 ot·min^{-1} po dobu 15 minút, supernatant bol opatrne zliaty a sediment DNA sa sušil v exikátore 10 minút alebo do úplného

odparenia etanolu. Suchá vzorka DNA sa nechala rozpúšťať v 30 µl TE pufre pri teplote 4°C cez noc.

- Bola nameraná koncentrácia takto zakoncentrovanej DNA a vzorky boli použité pre určenie intaktnosti izolovanej rastlinnej DNA gélovou elektroforézou.

5.5 Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty izolovanej DNA

- Bola meraná absorbancia roztoku DNA v TE pufre na nanospektrofotometre NanoDrop 2000 oproti čistému TE pufru pH 7,8.
- 2 µl z objemu vzorky DNA bolo nadávkované na kyvetu spektrofotometeru a bolo merané absorpčné spektrum pri vlnovej dĺžke v rozsahu 220-340 nm. Zo získaných hodnôt A_{260nm} bola určená koncentrácia a z pomeru A_{260nm}/A_{280nm} čistota izolovanej DNA.

5.6 Príprava PCR zmesí

- Pre PCR boli použité priméry špecifické pre rastlinnú DNA uvedené v Tabuľke 6: F_18S a R_5,8S (veľkosť produktu PCR 700 bp), F_26S a R_26S (veľkosť produktu PCR 220 bp). Pre amplifikáciu bakteriálnej DNA boli použité priméry F_eub, R_eub (veľkosť produktu PCR 466 bp). Jednotlivé zložky boli najskôr dobre premiešané a zcentrifugované. Následne sa zmiešali v nasledujúcom poradí a objemoch podľa Tabuľky 7.

Tabuľka 6: Použité priméry.

Špecifická PCR	Primér	Sekvencia 5´- 3´	Veľkosť produktu PCR (bp)	Citácia
Rastlinná DNA	F_18S	GCG CTA CAC TGA TGT ATT CAA CGA G	700	[38], [39]
	R_5,8S	CGC AAC TTG CGT TCA AAG ACT CGA		
Rastlinná DNA	F_26S	GAA TTC ACC CAA GTG TTG GGA T	220	[38], [39]
	R_26S	AGA GGC GTT CAG TCA TAA TC		
Bakteriálna DNA	F_eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466	[37]
	R_eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT		

Tabuľka 7: Príprava zmesi pre špecifické PCR.

Komponenta	Objem [µl]	
	Rastlinná DNA	Doména *Bacteria*
Voda pre PCR	16,5	18,0
10x kompletný reakčný pufor	2,5	2,5
Primer F (10 pmol/µl)	1,0	0,5

Komponenta	Objem [µl]	
	Rastlinná DNA	Doména *Bacteria*
Primer R (10 pmol/µl)	1,0	0,5
Zmes dNTP (10 mM)	1,0	0,5
Taq DNA polymeráza (1U/µl)	1,0	1,0
Matrica DNA	2,0	2,0
Celkom	25,0	25,0

- Ako matrice DNA boli: 2 µl DNA z rastlinných materiálov (mleté papriky a lusky), izolované pomocou magnetických častíc v neriedenej koncentrácií, 10x a 100x riedenej koncentrácií.
- Rovnakým postupom bola pripravená aj negatívna kontrola, ale matrica DNA bola nahradená 2 µl vody pre PCR.
- Taktiež pozitívna kontrola bola pripravená zhodným postupom, kde ako matrica DNA bola DNA *Brassica oleracea* (1 $ng \cdot \mu l^{-1}$/10 $ng \cdot \mu l^{-1}$), *Nicotiana tabacum* (10 $ng \cdot \mu l^{-1}$) a DNA izolovaná z paprikových luskov *Capsicum annuum* (17,5 $ng \cdot \mu l^{-1}$, 18,2 $ng \cdot \mu l^{-1}$) alebo *Bifidobacterium animalis* CCM 4988T (10 $ng \cdot \mu l^{-1}$).

5.6.1 Program pre PCR

- Pre všetky špecifické PCR s rastlinou DNA bol použitý jeden teplotný program, pre doménu *Bacteria* bol použitý odlišný program.
- Zmes pre PCR sa pred prvým cyklom zahriala na teplotu 95 °C po dobu 5 minút.
- Následne PCR prebiehala v 35 cykloch pre rastlinnú DNA a v 30 cykloch pre doménu *Bacteria* za podmienok uvedených v Tabuľke 8.

Tabuľka 8: Podmienky pre špecifické PCR.

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Teplota [°C]	Čas [s]
	Rastlinná DNA		Doména *Bacteria*	
Denaturácia DNA	95	40	95	30
Hybridizácia primérov	57	40	55	30
Syntéza reťazca DNA	72	80	72	60

- V poslednom cykle sa doba syntézy reťazca DNA predĺžila na 10 minút pri teplote 72 °C pre PCR rastlinnej DNA a 5 minút pri teplote 72 °C pre PCR domény *Bacteria*.
- Po skončení programu bol prístroj nastavený aby udržiaval teplotu 10 °C.
- Produkty PCR boli analyzované pomocou 1,2% gélu agarózovej elektroforézy.

5.7 Agarózová gélová elektroforéza

5.7.1 Agarózová gélová elektroforéza DNA z korenia (sušenej papriky)

- 0,8% agarózový gél bol pripravený rozpustením 0,8 g agarózy v 100 ml TBE pufru (pre DNA izolovanú magnetickými časticami P(HEMA-*co*-GMA), alebo 1% gél pripravený rozpustením 1,0 g agarózy v 100 ml TBE pufru (pre DNA izolovanú ostatnými magnetickými časticami). Suspenzia sa rozvarila v mikrovlnnej trúbe, nechala vychladnúť na teplotu 60 °C. Takto pripravená suspenzia bola naliata do elektroforetickej vaničky.
- Gél sa nechal 30 minút tuhnúť, následne sa opatrne vybral hrebienok a na gél sa naniesli vzorky izolovanej DNA, ktoré boli pripravené zmiešaním nanášacieho pufru a vzorky v pomere 1:5 (20 µl vzorky a 4 µl nanášacieho pufru).
- Lambda DNA v rôznej konecentrácii bola zmiešaná s nanášacím pufrom v pomere 1:5 (15 µl lambdy a 3 µl nanášacieho pufru).
- Gél sa vložili do elektroforetickej vaničky, prevrstvili TBE roztokom do výšky asi 0,5 cm nad gél a elektroforéza prebiehala pri napätí 80 V po dobu približne 2-3 hodín.
- Po skončení elektroforézy sa DNA na géle farbil v roztoku etídiumbromidu (0,5 $ng \cdot ml^{-1}$, 30 minút), umiestnil na transiluminátor a vyhodnotil sa v UV svetle pri vlnovej dĺžke λ=305 nm.
- Gél bol dokumentovaný fotograficky.

5.7.2 Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR

- 1,2% agarózový gél bol pripravený rozpustením 1,2 g agarózy v 100 ml TBE pufru, suspenzia sa rozvarila v mikrovlnnej trúbe, nechala vychladnúť na teplotu 60 °C. Takto pripravená suspenzia bola naliata do elektroforetickej vaničky.
- Gél sa nechal 30 minút tuhnúť, následne sa opatrne vybral hrebienok a na 1,2% gél sa naniesli vzorky produktov PCR, ktoré boli pripravené zmiešaním nanášacieho pufru a vzorky v pomere 1:5 (25 µl amplifikovanej DNA s 5 µl nanášacieho roztoku).
- Pozitívna a negatívna kontrola bola pripravená rovnakým spôsobom ako vzorky amplifikovanej DNA a DNA veľkostný štandard sa naniesol o objeme 5 µl.
- Ako štandard bol použitý 100 bp DNA rebríček.
- Gél sa vložili do elektroforetickej vaničky, prevrstvili 0,5x TBE roztokom do výšky asi 0,5 cm nad gél a elektroforéza prebiehala pri napätí 80 V po dobu približne 2-3 hodín.
- Po skončení elektroforézy sa DNA na géle farbila v roztoku etídiumbromidu (0,5 $ng \cdot ml^{-1}$, 30 minút), gél sa umiestnil na transiluminátor a vyhodnotil sa v UV svetle pri vlnovej dĺžke λ=305 nm.
- Gél bol dokumentovaný fotograficky.

6 VÝSLEDKY

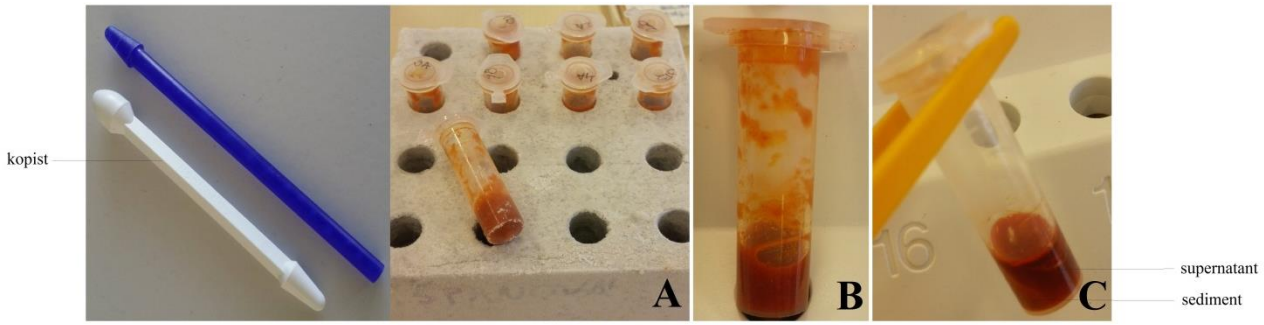
I. ČASŤ

Prvá časť bola zameraná na testovanie mikroizoláciu DNA s využitím reverzibilnej adsorpcie DNA na magnetické častice P(HEMA-*co*-GMA). Pre vypracovanie boli použité paprika sladká, mletá; paprika štipľavá, mletá a žitavská paprika sladká, mletá. Ako kontroly boli využité paprikové lusky čerstvé z papriky červenej a zelenej. Po homogenizácii vzoriek a vyizolovaní DNA bola spektrofotometricky stanovená koncentrácia a čistota DNA a pomocou PCR overená amplifikovateľnosť v PCR.

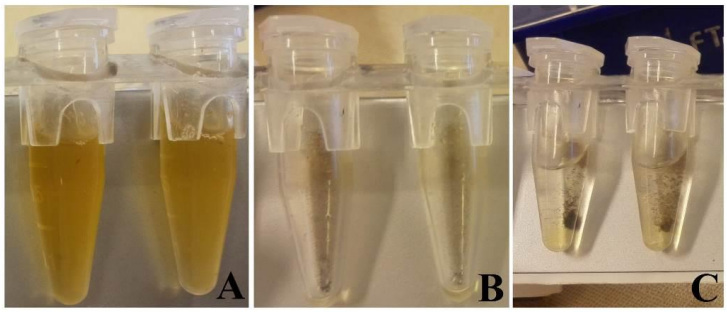
6.1 Testovanie metódy mikroizolácie DNA po homogenizácii v lyzačnom roztoku CTAB

Postupom uvedeným v kapitole 5.1 boli pripravené homogenáty z rôznych rastlinných matríc. Približne 0,1 g rastlinného materiálu sa homogenizovalo za chladu s 500 µl lyzačného roztoku s CTAB. Z každého druhu rastlinného materiálu boli pripravené štyri paralelné vzorky. Spolu tak bolo získaných 24 vzoriek. Príprava homogenátov je na Obrázku 5. 100 µl homogenátu bolo použité pre izoláciu DNA magnetickými časticami P(HEMA-*co*-GMA) postupom uvedeným v kapitole 5.3. Niektoré kroky izolácie DNA magnetickými časticami zo separačnej zmesi sú uvedené na Obrázku 6.

Obrázok 5: Príprava homogenátu buniek z luskov papriky alebo z korenia: A) Homogenizácia navážky mletej papriky kopistom, B) Homogenát po inkubácii s CTAB pufrom, C) Homogenát po centrifugácii .



Obrázok 6: Izolácia DNA magnetickými časticami zo separačných zmesí: A) Separovanie magnetických častíc pomocou magnetu, B) Odseparované magnetické častice s naviazanou DNA po odobratí supernatantu, B) Premývanie magnetický častíc a naviazanej DNA etanolom.



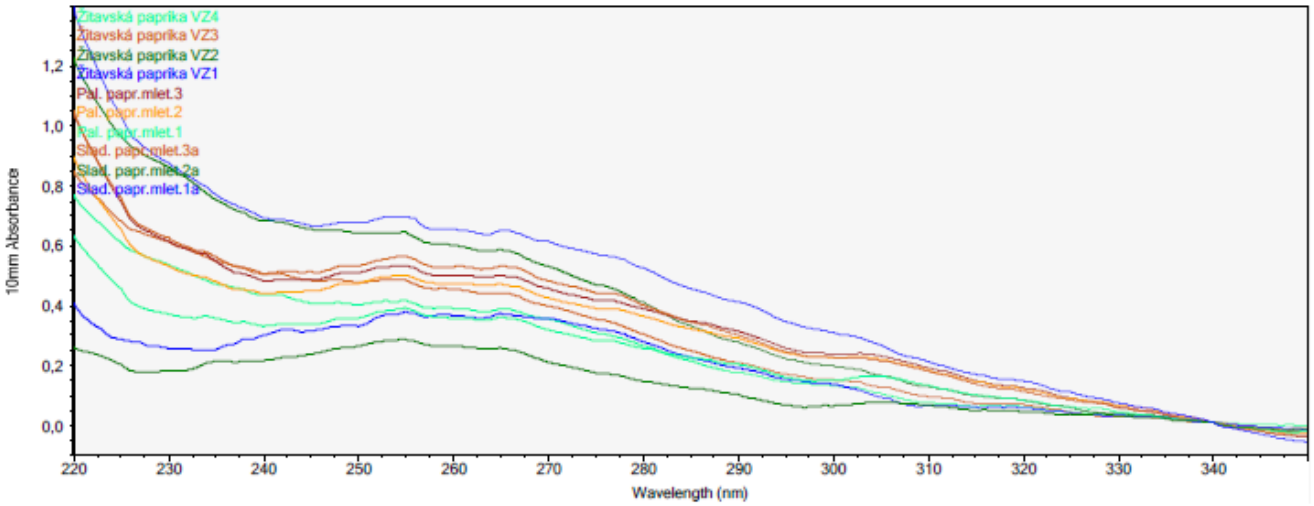
6.2 Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie DNA

Koncentrácia DNA bola stanovená spektrofotometricky postupom uvedeným v kapitole 5.5, meraním absorbčného spektra v rozmedzí vlnových dĺžok 220–340 nm. Výsledky spektrofotometrického stanovenia koncentrácie a absorbancie pri rôznych vlnových dĺžkach sú uvedené v Tabuľke 9. Absorpčné spektrum DNA je ukázané na Obrázku 7 a Obrázku 8, absorpčné spektrá pre každý druh papriky sú uvedené v prílohe (Obrázok 38), absorpčné spektrum purifikovanej rastlinnej DNA *Brassica oleracea* je ukázané v prílohe (Obrázok 39).

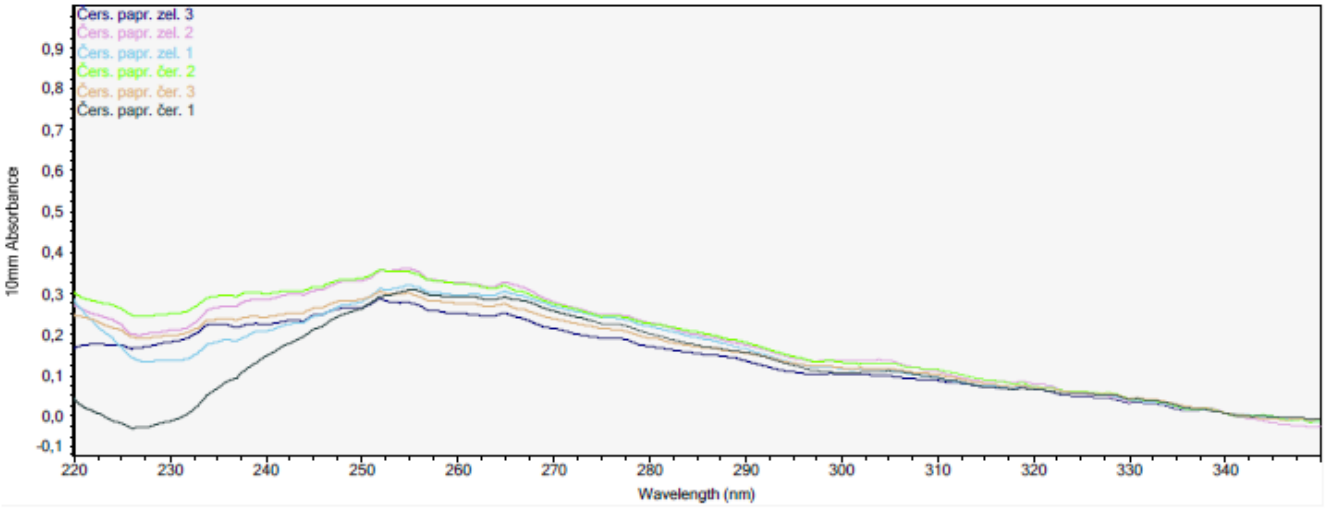
Tabuľka 9: Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie DNA. DNA bola izolovaná magnetickými časticami P(HEMA-co-GMA) v štyroch opakovaniach z korenia (mletej papriky) a luskov papriky.

Číslo	DNA	A_{260nm}	A_{280nm}	A_{260nm}/A_{280nm}	A_{260nm}/A_{230nm}	c [ng·µl^{-1}]	Množstvo izolovanej DNA [ng]
1	Paprika sladká, mletá	0,275	0,171	1,61	0,79	13,8	1 380
2		0,645	0,516	1,25	0,74	32,3	3 230
3		0,253	0,137	1,84	1,47	12,6	1 260
4		0,520	0,392	1,33	0,84	26,0	2 600
1	Paprika štipľavá, mletá	0,290	0,204	1,42	0,83	14,5	1 450
2		0,348	0,248	1,40	0,96	17,4	1 740
3		0,463	0,355	1,30	0,88	23,1	2 310
4		0,490	0,381	1,29	0,81	24,5	2 450
1	Žitavská paprika, sladká mletá	0,593	0,401	1,48	0,69	29,6	2 960
2		0,444	0,295	1,51	0,74	22,2	2 220
3		0,382	0,257	1,48	0,72	19,1	1 910
4		0,487	0,329	1,48	0,78	24,3	2 430
1	Paprika červená (lusk)	0,352	0,221	1,59		17,6	1 760
2		0,285	0,194	1,47		14,3	1 430
3		0,269	0,183	1,46	1,41	13,4	1 340
4		0,316	0,218	1,45	1,30	15,8	1 580
1	Paprika zelená (lusk)	0,112	0,071	1,58	1,80	5,6	560
2		0,289	0,212	1,36	2,24	14,5	1 450
3		0,318	0,220	1,45	1,58	15,9	1 590
4		0,243	0,163	1,50	1,40	12,2	1 220

Obrázok 7: Absorpčné spektrum DNA, ktorá bola izolovaná magnetickými časticami P(HEMA-co-GMA) z korenia (mletej papriky sladkej, štipľavej a žitavskej).



Obrázok 8: Absorpčné spektrum DNA, ktorá bola izolovaná magnetickými časticami P(HEMA-co-GMA) z luskov papriky.



→ Rastlinná DNA bola izolovaná zo všetkých použitých homogenátov v rôznej koncentrácii. Koncentrácia izolovanej DNA pre papriku sladkú mletú bola v rozmedzí 12,6 – 32,3 ng·µl^{-1}, pre papriku štipľavú mletú 14,5 – 24,5 ng·µl^{-1}, pre žitavskú papriku sladkú, mletú 19,1 – 29,6 ng·µl^{-}1, pre papriku červenú čerstvú 13,4 – 17,6 ng·µl^{-1} a pre papriku zelenú čerstvú 5,6 – 15,9 ng·µl^{-1}.

6.2.1 Overenie kvality DNA pomocou PCR

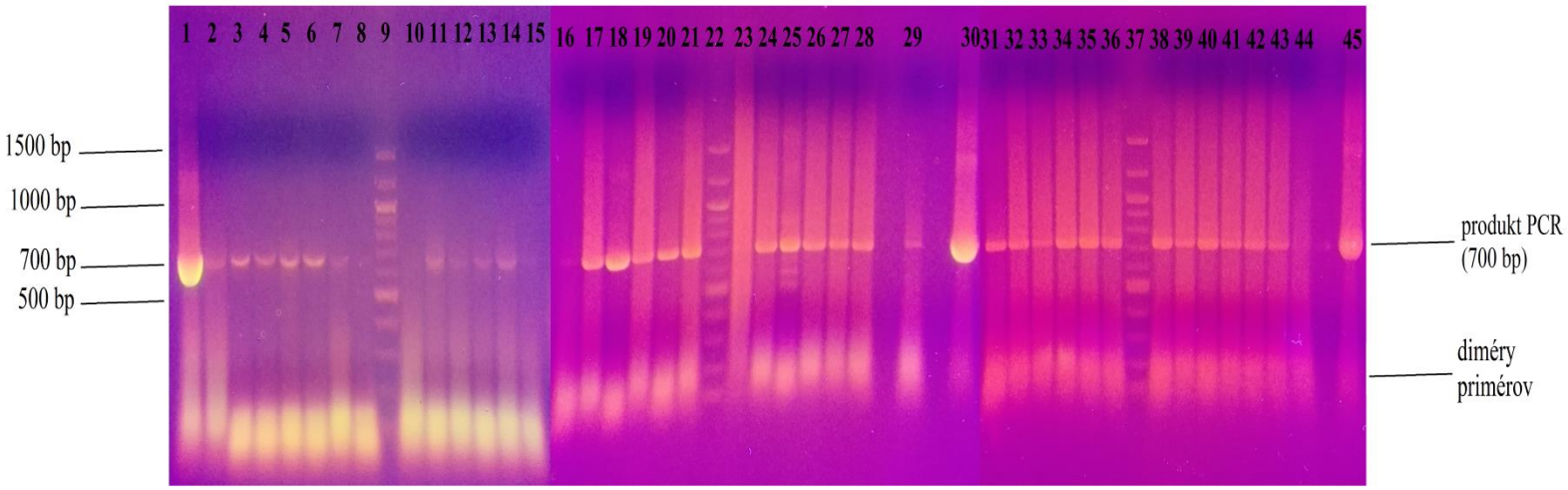
Kvalita DNA bola overená metódou polymerázovej reťazovej reakcie s dvoma sadami primérov F_18S, R_5,8S a F_26S, R_26S s následnou vizualizáciou pomocou agarózovej

gélovej elektroforézy produktov PCR (5.7.2). Príprava PCR zmesi a prevedenie PCR je uvedené v kapitole 5.6.

6.2.1.1 Priméry F_18S a R_5,8S

Metódou PCR bola overená prítomnosť rastlinnej DNA s využitím špecifických primérov pre rastlinnú DNA: F_18S a R_5,8S. Veľkosť špecifického amplikonu bola 700 bp. Vizualizácia produktov PCR je uvedená na Obrázku 9. Vzhľadom k znečisteniu DNA ako DNA matrica bola použitá neriedená a riedená DNA 10x a 100x. V zmesi pre PCR bola použitá *Taq* polymeráza $1U \cdot \mu l^{-1}$. Pre pozitívnu kontrolu bola využitá matrica DNA rastliny *Brassica oleracea* ($10\ ng \cdot \mu l^{-1}$).

Obrázok 9: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR (700 bp). Amplifikované bolo rôzne množstvo DNA izolované magnetickými časticami P(HEMA-co-GMA) v štyroch opakovaiach pomocou primérov F_18S a R_5,8S. Na gél bolo nanesené 25 µl amplifikovanej DNA.



Beh	DNA	Riedenie DNA (x)	Množstvo DNA v PCR zmesi [ng]	Detekcia produktov PCR	Prítomnosť inhibítorov PCR
1	PK	-	20,0	+++	
2	NK	-	-	+/-	
3	Paprika zelená, čerstvá (lusk)	100	0,1	+	
4		10	1,1	+	
5		0	11,2	+	
6	Paprika červená, čerstvá (lusk)	100	0,4	+	
7		10	3,5	+	+
8		0	35,2	-	+
9	DNA veľkostný štandard				
10	Paprika štipľavá, mletá	100	0,3	-	
11		10	2,9	+	
12		0	29	+	+

Beh	DNA	Riedenie DNA (x)	Množstvo DNA v PCR zmesi [ng]	Detekcia produktov PCR	Prítomnosť inhibítorov PCR
13	Paprika sladká, mletá	100	0,3	+	
14		10	2,8	+	
15		0	27,6	-	+
16		0	64,6	+	+
17		10	6,5	+	
18		0	25,2	+	
19		10	2,5	+	
20		0	52,0	+	
21		10	5,2	+	
22	DNA veľkostný štandard				
23	Paprika štipľavá, mletá	0	34,8	-	+
24		10	3,5	+	
25		0	46,2	+	
26		10	4,6	+	
27		0	49,0	+	
28		10	4,9	+	
29	NK	-	-	+/-	
30	PK	-	20,0	+++	
31	Paprika červená (lusk)	0	28,6	+	
32		10	2,9	+	
33		0	26,8	+	
34		10	2,7	+	
35		0	31,6	+	
36		10	3,2	+	
37	DNA veľkostný štandard				
38	Paprika zelená (lusk)	0	29,0	+	
39		10	2,9	+	
40		0	31,8	+	
41		10	3,2	+	
42		0	24,4	+	
43		10	2,4	+	
44	NK	-	-	-	
45	PK	-	20,0	+++	

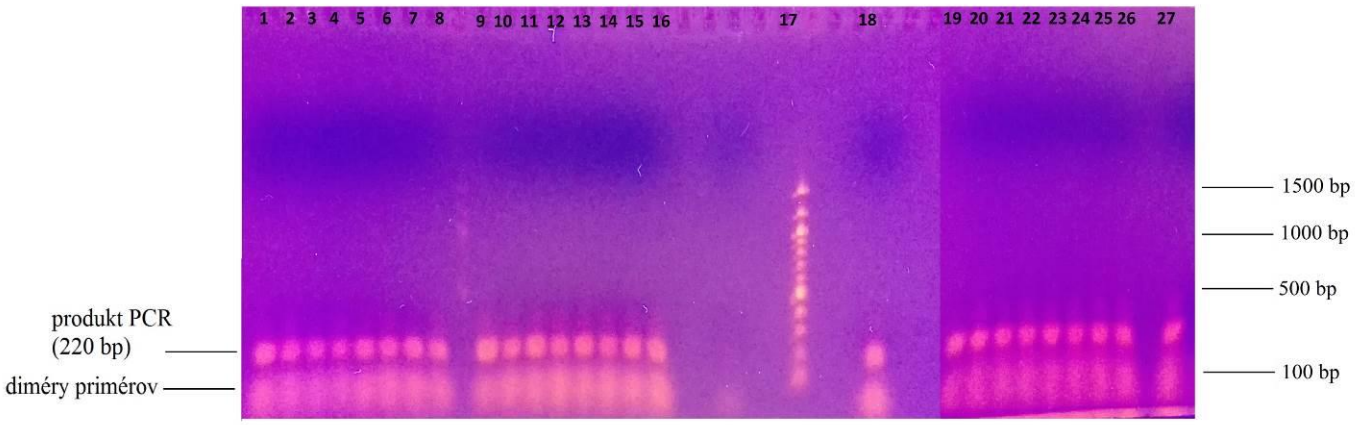
Detekcia produktu PCR:
detegovaný produkt PCR rôznej intenzity: +/-, +, ++, +++

nedetegovaný produkt PCR: -
PK: pozitívna kontrola DNA *Brassica oleracea* (10 ng·µl^{-1})
NK: negatívna kontrola

6.2.1.2 Priméry F_26S a R_26S

Metódou PCR bola overená amplifikácia DNA s využitím špecifických primérov: F_26S a R_26S. Veľkosť špecifického amplikonu bola 220 bp. Vizualizácia produktov PCR je uvedená na Obrázku 10. V zmesi pre PCR bola použitá *Taq* polymeráza 1U/µl. Pre pozitívnu kontrolu bola využitá matrica DNA rastliny *Brassica oleracea*.

Obrázok 10: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR (220 bp). Amplifikovaná bola DNA izolovaná magnetickými časticami P(HEMA-co-GMA) z rôznych rastlinných matríc pomocou primérov F_26S a R_26S. Na gél bolo nanesené 10 µl.



Beh	DNA	Riedenie DNA (x)	Množstvo DNA v PCR zmesi [ng]	Detekcia produktov PCR
1	Paprika sladká, mletá	0	27,6	+
2		10	2,8	+
3		0	64,6	+
4		10	6,5	+
5		0	25,2	+
6		10	2,5	+
7		0	52,0	+
8		10	5,2	+

Beh	DNA	Riedenie DNA (x)	Množstvo DNA v PCR zmesi [ng]	Detekcia produktov PCR
9	Paprika štipľavá, mletá	0	29,0	+
10		10	2,9	+
11		0	34,8	+
12		10	3,5	+
13		0	46,2	+
14		10	4,6	+
15		0	49,0	+
16		10	4,9	+
17	DNA veľkostný štandard			
18	NK	-	-	+
19	Paprika červená (lusk)	0	35,2	+
20		10	3,5	+
21		0	28,6	+
22		10	2,9	+
23		0	26,8	+
24		10	2,7	+
25		0	31,6	+
26		10	3,2	+
27	PK	-	20,0	+

Detekcia produktu PCR:
detegované produkty PCR:+
nedetegované produkty PCR: -
PK: pozitívna kontrola DNA *Brassica oleracea* (10 $ng \cdot \mu l^{-1}$)
NK: negatívna kontrola

6.3 Overenie intaktnosti DNA po prezrážaní etanolom

S cieľom získať DNA o vyššej koncentrácii boli vzorky prezrážané etanolom. Intaktnosť DNA bola overená pomocou gélovej elektroforézy na agaróze.

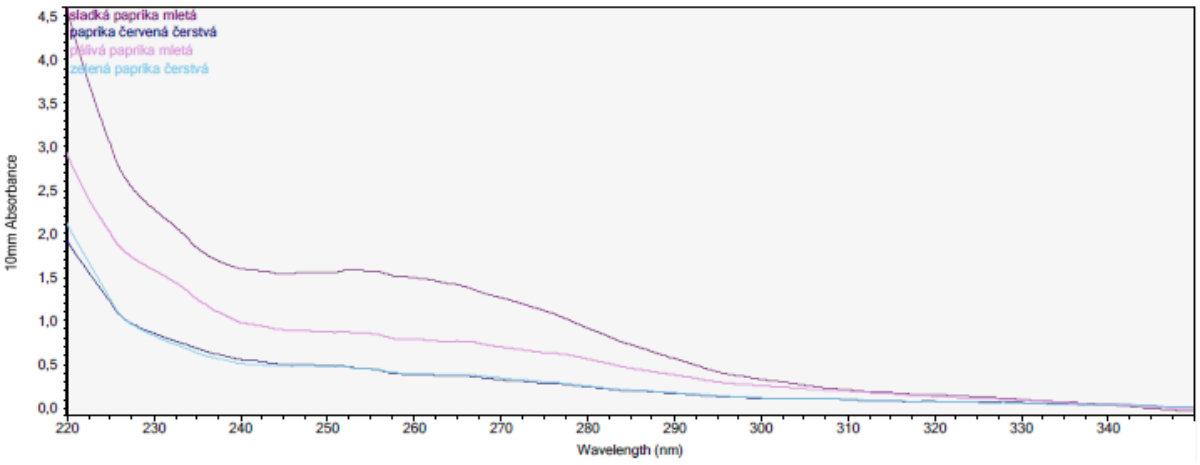
6.3.1 Prezrážanie DNA

Jednotlivé paralelné vzorky DNA izolované z tej istej matrice (viď Tabuľka 9) boli spojené a podľa postupu kapitoly 5.4 boli prezrážané. Koncentrácia DNA bola stanovená spektrofotometricky postupom uvedeným v kapitole 5.5, meraním absorbčného spektra v rozmedzí vlnových dĺžok 220–340 nm. Výsledky spektrofotometrického stanovenia koncentrácie a absorbancie pri rôznych vlnových dĺžkach sú uvedené v Tabuľke10. Absorpčné spektrum je ukázané na Obrázku 11.

Tabuľka 10: Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie DNA, ktorá bola izolovaná magnetickými časticami P(HEMA-co-GMA) a prezrážaná etanolom.

DNA	A_{260nm}	A_{280nm}	A_{260nm}/A_{280nm}	A_{260nm}/A_{230nm}	c [ng·µl^{-1}]	Množstvo izolovanej DNA [ng]
Paprika sladká, mletá	1,465	0,885	1,66	0,65	73,2	2 196
Paprika štipľavá, mletá	0,754	0,529	1,42	0,48	37,7	1 131
Paprika červená (lusk)	0,351	0,206	1,70	0,43	17,5	525
Paprika zelená (lusk)	0,363	0,219	1,66	0,45	18,2	546
Paprika žitavská sladká, mletá	2,425	1,508	1,61	0,68	121	3 033

Obrázok 11: Absorpčné spektrum DNA, ktorá bola izolovaná magnetickými časticami P(HEMA-co-GMA) a prezrážaná etanolom.

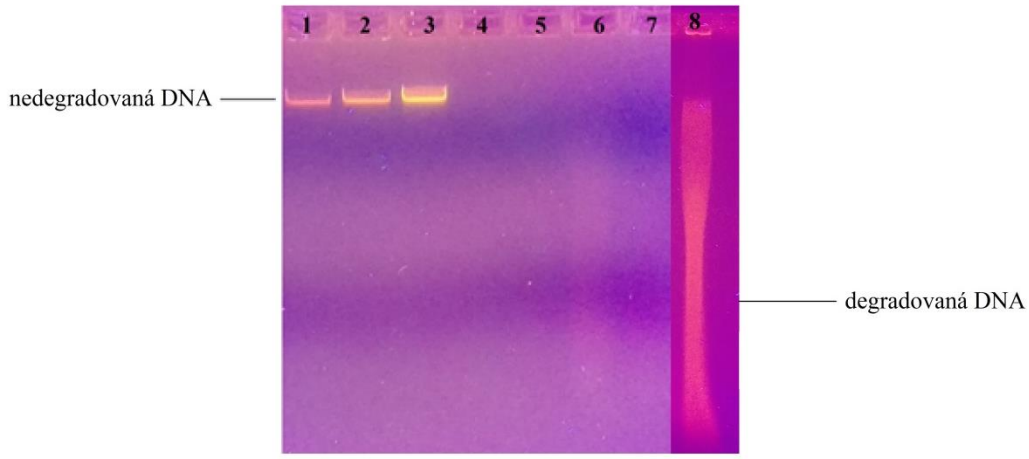


→ DNA bola zakoncentrovaná rôzne v závislosti od druhu papriky v koncentrácii od 17,5 – 121 ng·µl^{-1}.

6.3.2 Gélová elektroforéza DNA

Prítomnosť a relatívna intaktnosť zakoncentrovanej rastlinnej DNA bola vyhodnotená agarózovou gélovou elektroforézou podľa postupu uvedeným v časti 5.7.1. Ako štandard bola použitá Lambda DNA *Hind*III. Snímku gélu uvádza Obrázok 12.

Obrázok 12: Gélová elektroforéza rastlinnej DNA, izolovanej magnetickými časticami P(HEMA-co-GMA) a prezrážaná etanolom. Na gél bolo nanesené 20 µl DNA.



Beh	DNA	Množstvo DNA nanesené na gél[ng]	Vizualizácia DNA	Degradace DNA
1	Lambda DNA *Hind*III	50	+	-
2	Lambda DNA *Hind*III	100	+	-
3	Lambda DNA *Hind*III	200	+	-
4	Paprika zelená, čerstvá (lusk)	364	-	+
5	Paprika červená, čerstvá (lusk)	350	-	+
6	Paprika štipľavá, mletá	754	+ (šmuha)	+
7	Paprika sladká, mletá	1 464	-	+
8	Paprika žitavská sladká, mletá	3 033	+ (šmuha)	+

Degradácia DNA:
Degradovaná DNA: +
Nedegradovaná DNA: -

6.4 Izolácia rastlinnej DNA mikročasticami P(HEMA-*co*-GMA) po homogenizácii v sterilnej vode

Postupom podľa kapitoly 5.2 boli pripravené homogenáty len z mletých paprík, z ktorých bola izolovaná DNA pomocou magnetických mikročastíc P(HEMA-*co*-GMA) postupom uvedeným v kapitole 5.3.

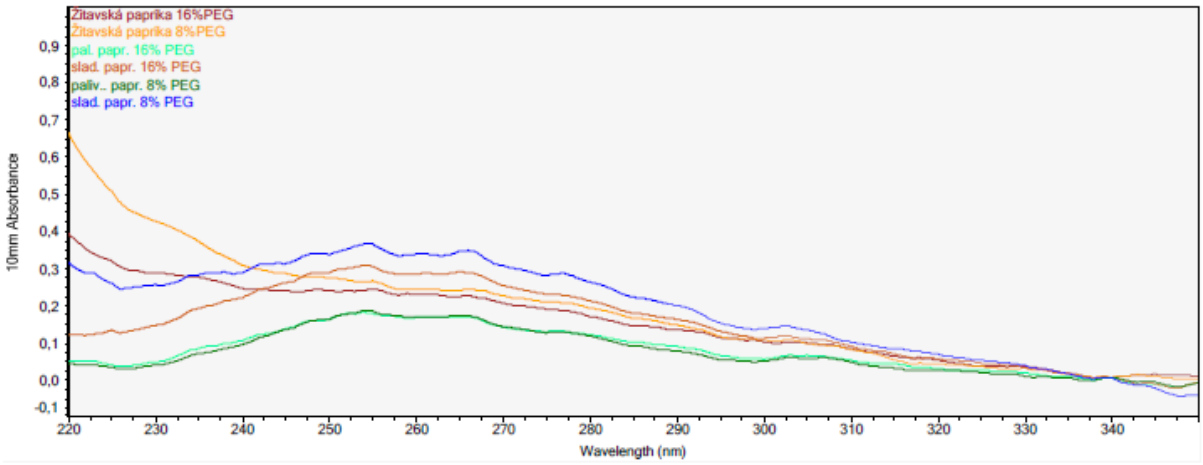
DNA bola izolovaná z papriky sladkej, mletej; papriky pikantnej, mletej a papriky žitavskej sladkej, mletej. Približne 100 mg rastlinného materiálu bolo homogenizovaného za laboratórnej teploty s 500 μl sterilnej vody. 100 μl homogenátu bolo použité pre izoláciu DNA magnetickými časticami P(HEMA-*co*-GMA) pre separačnú zmes s 8% PEG 6 000. 300 μl homogenátu bolo použité pre izoláciu DNA magnetickými časticami P(HEMA-*co*-GMA) pre separačnú zmes s 16% PEG 6 000.

Koncentrácia DNA bola stanovená spektrofotometricky postupom uvedeným v kapitole 5.5, meraním absorbčného spektra v rozmedzí vlnových dĺžok 220–340 nm. Výsledky spektrofotometrického stanovenia koncentrácie a absorbancie pri rôznych vlnových dĺžkach uvádza Tabuľka 11. Absorpčné spektrum je ukázané na Obrázku 13.

Tabuľka 11: Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie DNA, ktorá bola izolovaná s použitím sterilnej vody s využitím magnetických častíc P(HEMA-co-GMA).

Koncentrácia PEG 6 000 (%)	DNA	A_{260nm}	A_{280nm}	A_{260nm}/A_{280nm}	A_{260nm}/A_{230nm}	c [ng·μl^{-1}]	Množstvo izolovanej DNA [ng]
8	Paprika sladká, mletá	0,331	0,256	1,29	1,33	16,6	1 660
16		0,279	0,206	1,35	2,00	13,9	1 390
8	Paprika štipľavá, mletá	0,163	0,111	1,46	5,02	8,2	820
16		0,161	0,114	1,40	3,99	8,0	800
8	Paprika žitavská sladká	0,236	0,186	1,27	0,56	11,8	1 180
16		0,224	0,163	1,38	0,80	11,2	1 120

Obrázok 13: Absorpčné spektrum DNA ktorá bola izolovaná s použitím sterilnej vody s využitím magnetických častíc P(HEMA-co-GMA).



→ Koncentrácia DNA pre papriku sladkú mletú bola v rozmedzí od 13,9 – 16,6 ng·µl^{-1}; pre papriku štipľavú mletú 8,0 – 8,2 ng·µl^{-1} a pre papriku žitavskú sladkú 11,2 – 11,8 ng·µl^{-1}. Približne rovnaké množstvo DNA bolo izolované s využitím 16 a 8% PEG 6 000 v separačnej zmesi. Absorpčné spektrum bolo rovnaké u papriky sladkej mletej a papriky štipľavej, mletej. U žitavskej papriky sladkej, mletej bolo odlišné (viac polyfenolov).

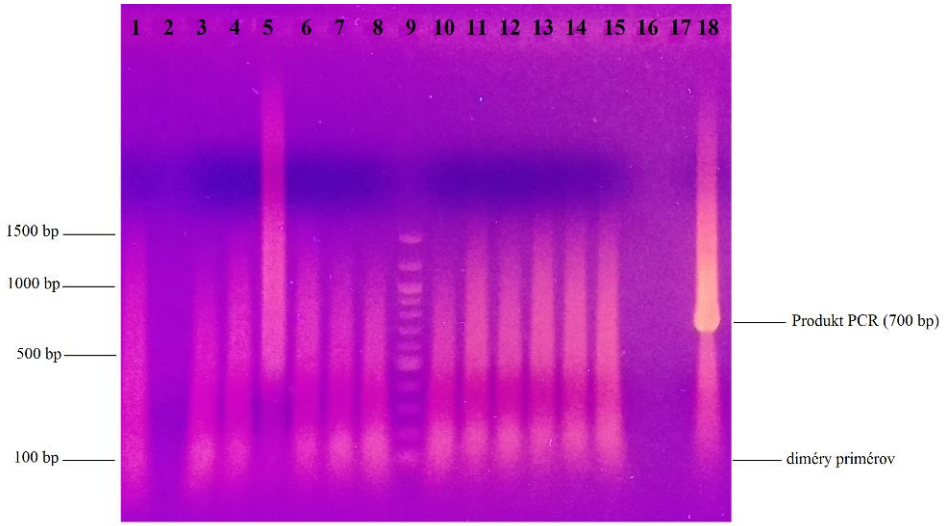
6.4.1 Overenie kvality DNA pomocou PCR

Prítomnosť DNA bola overená metódou polymerázovej reťazovej reakcie so špecifickými primérmi F_18S a R_5,8S s následnou vizualizáciou pomocou agarózovej gélovej elektroforézy produktov PCR. Postupovalo sa poľa postupov uvedených v kapitolách 5.6 – 5.7.

6.4.1.1 Priméry F_18S a R_5,8S

Vizualizácia produktov PCR (700 bp) je uvedená na Obrázku14. V zmesi pre PCR bola použitá *Taq* polymeráza 1U·µl^{-1}. Pre pozitívnu kontrolu bola využitá matrica DNA rastliny *Brassica oleracea* (10 ng·µl^{-1}).

Obrázok 14: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR (700 bp). Amplifikovaná bola DNA izolovaná v sterilnej vode a za použitia magnetických častíc P(HEMA-co-GMA). DNA bola izolovaná z homogenátov zo sušenej papriky, mletej. Na gél bolo nanesené 25 µl amplifikovanej DNA.



Beh	DNA	Riedenie DNA (x)	Množstvo DNA v PCR zmesi [ng]	Detekcia produktov PCR	Prítomnosť inhibítorov PCR
1	NK	-	-	-	
3	Paprika sladká,	0	33,2	-	+
4	mletá, 8%	10	3,3	-	+
5	PEG 6 000	100	0,3	-	+
6	Paprika	0	16,4	-	+
7	štipľavá, mletá,	10	1,6	-	+
8	8% PEG 6 000	100	0,2	-	+
9	DNA veľkostný štandard			-	
10	Paprika sladká,	0	27,8	-	+
11	mletá, 16%	10	2,8	-	+
12	PEG 6 000	100	0,3	-	+
13	Paprika	0	16,0	-	+
14	štipľavá, mletá,	10	1,6	-	+
15	16% PEG 6 000	100	0,2	-	+
18	PK	-	20,0	+	

Detekcia produktu PCR:
detegované produkty a inhibítory PCR:+
nedetegované produkty PCR: -
PK: pozitívna kontrola DNA *Brassica oleracea* (10 ng·µl^{-1})
NK: negatívna kontrola

6.5 Optimalizovaný postup mikroizolácie DNA

Optimálny postup mikroizolácie DNA z mletej papriky (korenia) pomocou častíc P(HEMA-*co*-GMA) je nasledujúci.

Približne 0,1 g analyzovaného materiálu sa naváži do 1,5 ml Eppendorfových skúmaviek a za stáleho chladenia vo vymrazenom kovovom stojane sa pridá 500 µl lyzačného pufru s CTAB a 1 µl β-merkaptoetanolu. Následne sa urobí homogenizácia za chladu pomocou kopistu a dobre zhomogenizované vzorky sa inkubujú pri 60 °C, 30 minút v termostate. Po inkubácii sa vzorky zcentrifugujú pri 14 500 ot·min^{-1} po dobu 10 minút a 100 µl získaného supernatantu sa použije k izolácii DNA magnetickými časticami s výslednou koncentráciou PEG 6 000 v separačnej zmesi 16 %.

II. ČASŤ

Na základe prvej časti s využitím častíc P(HEMA-*co*-GMA) bol vypracovaný postup pre izoláciu DNA v kvalite pre PCR z analyzovaných výrobkov a použitý v druhej časti práce pre testovanie magnetických nosičov. Optimálny postup zahŕňa homogenizáciu buniek s použitím lyzačného roztoku s CTAB a izoláciu DNA magnetickými časticami z homogenátov s použitím separačnej zmesi s výslednou koncentráciou PEG 6 000 16 %. Po homogenizácii vzoriek a vyizolovaní DNA bola spektrofotometricky stanovená koncentrácia a čistota DNA a pomocou PCR overená kvalita v PCR.

6.6 Testovanie magnetických nosičov

Pre tento experiment boli využité magnetické nosiče: HPS B-M-NH_2, P(HEMA-*co*-GMA)NH_2, MPG, PGMA ox, PLL a spolu bolo získaných 10 vzoriek pre každú rastlinnú matricu.

Táto časť bola zameraná na porovnanie piatich rôzne modifikovaných magnetický častíc. Ako matrice DNA boli použité paprika sladká, mletá; paprika štipľavá, mletá a žitavská paprika sladká, mletá.

Postupom uvedeným v kapitole 5.1 boli pripravené homogenáty v dvoch opakovaniach pre každý druh magnetických nosičov, pomocou ktorých bola izolovaná DNA postupom uvedeným v kapitole 5.3. DNA bola izolovaná z papriky sladkej, mletej; papriky pikantnej mletej a papriky žitavskej sladke, mletej. Približne 100 mg rastlinného materiálu bolo homogenizované za chladu s 500 µl lyzačného roztoku s CTAB. 100 µl homogenátu bolo použité v separačnej zmesi 16% PEG 6 000 pre izoláciu DNA magnetickými časticami.

Koncentrácia DNA bola stanovená spektrofotometricky postupom uvedeným v kapitole 5.5, meraním absorbčného spektra v rozmedzí vlnových dĺžok 220 – 340 nm.

Kvalita DNA bola overená metódou polymerázovej reťazovej reakcie s dvoma sadami primérov F_18S, R_5,8S a F_26S, R_26S s následnou vizualizáciou pomocou agarózovej gélovej elektroforézy produktov PCR. Príprava PCR zmesi a prevedenie PCR je uvedené v kapitole 5.6.

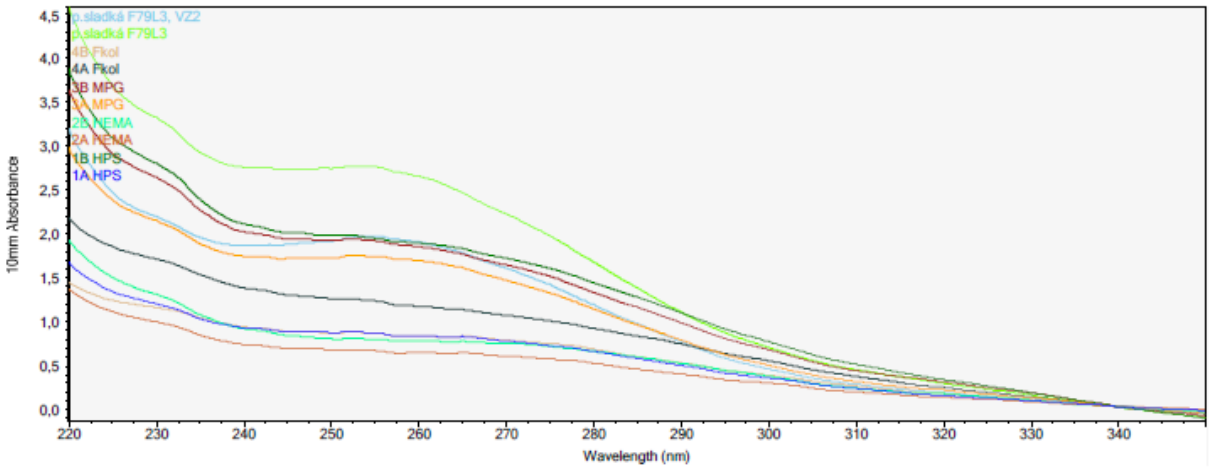
6.6.1 Paprika sladká, mletá

Výsledky spektrofotometrického stanovenia koncentrácie DNA a absorbancie pri rôznych vlnových dĺžkach uvádza Tabuľka12. Absorpčné spektrá sú ukázané na Obrázku 15.

Tabuľka 12: Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie DNA, ktorá bola izolovaná zo sušenej papriky sladkej, mletej rôznymi magnetickými časticami v dvoch paralelných opakovaniach.

Číslo vzorky	DNA	Magnetické častice	A_{260nm}	A_{280nm}	A_{260nm}/A_{280nm}	A_{260nm}/A_{230nm}	c [ng·µl^{-1}]	Množstvo izolovanej DNA [ng]
1	Paprika sladká, mletá	HPS B-M-NH_2	0,810	0,633	1,28	0,69	40,5	4 050
2			1,864	1,418	1,31	0,67	93,2	9 320
1		P(HEMA-*co*-GMA)NH_2	0,616	0,496	1,24	0,64	30,8	3 080
2			0,750	0,631	1,19	0,58	37,5	3 750
1		MPG	1,662	1,119	1,49	0,78	83,1	8 310
2			1,823	1,308	1,39	0,70	91,1	9 110
1		PGMA ox	1,145	0,895	1,28	0,68	57,2	5 720
2			0,805	0,659	1,22	0,71	40,3	4 030
1		PLL	2,629	1,656	1,59	0,80	131	13 150
2			1,876	1,165	1,61	0,86	93,8	9 380

Obrázok 15: Absorpčné spektrum DNA, ktorá bola izolovaná rôznymi magnetickými časticami zo sušenej papriky sladkej, mletej v dvoch paralelných stanoveniach pre každý magnetický nosič.



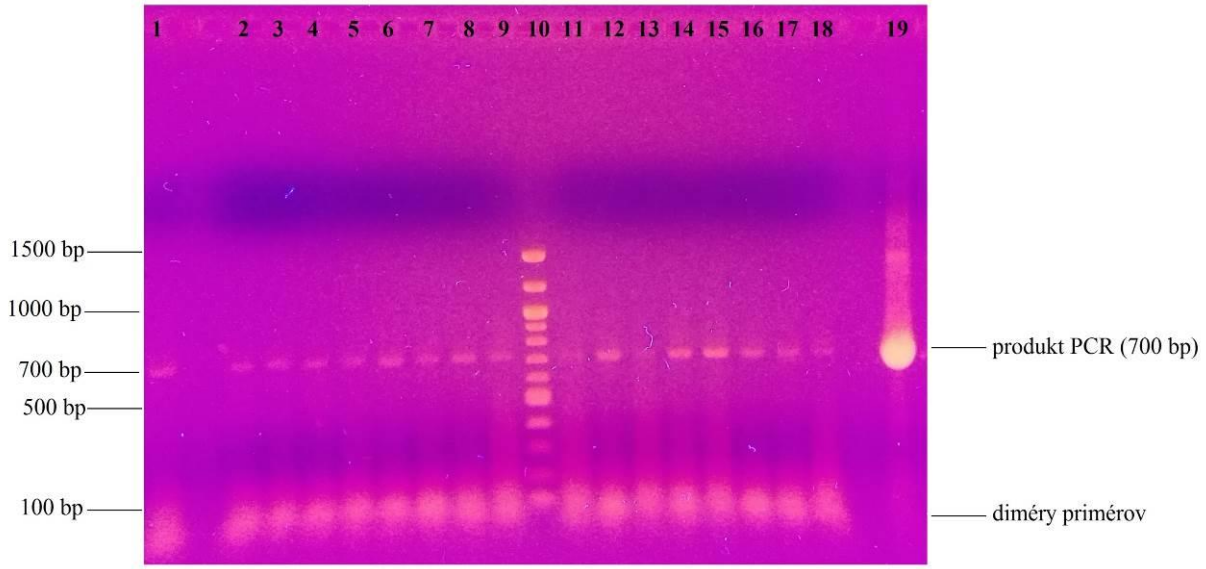
→ Rastlinná DNA z papriky sladkej mletej bola izolovaná v rôznej koncentrácii. Koncentrácia izolovanej DNA pre papriku sladkú mletú bola v rozmedzí 30,8 – 131 ng·µl^{-1} v závislosti od použitého nosiča. Množstvo získanej DNA týmto postupom je postačujúce pre PCR.

6.6.1.1 Priméry F_18S a R_5,8S

Kvalita DNA bola overená v PCR s následnou detekciou amplikónov gélovou elektroforézou. Vizualizácia produktov PCR (700 bp) je uvedená na Obrázku 16. V zmesi pre PCR bola použitá *Taq* polymeráza 1U·µl^{-1}. Pre pozitívnu kontrolu bola využitá matrica DNA rastliny *Brassica oleracea* (10 ng·µl^{-1}).

Opakované overenie kvality izolovanej DNA rôznymi magnetickými časticami z papriky sladkej, mletej pomocou PCR ukazuje Obrázok 40 v prílohe.

Obrázok 16: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR (700 bp). Amplifikovaná bola DNA izolovaná rôznymi magnetickými časticami zo sušenej papriky sladkej, mletej pomocou primérov F_18S a R_5,8S . Na gél bolo nanesené 15 µl amplifikovanej DNA.



Beh	DNA	Magnetické častice	Riedenie DNA (x)	Množstvo DNA v PCR zmesi [ng]	Detekcia produktov PCR	Prítomnosť inhibítorov PCR
1	NK	-	-	-	+	
2	Paprika sladká, mletá	HPS B-M-NH_2	0	81,0	+	
3			10	8,1	+	
4			0	186	+	
5			10	18,6	+	
6		P(HEMA-*co*-GMA)NH_2	0	61,6	+	
7			10	6,2	+	
8			0	75,0	+	
9			10	7,5	+	
10	DNA veľkostný štandard					
11	Paprika sladká, mletá	MPG	0	166	+	+
12			10	16,6	+	
13			0	182	+	+
14			10	18,2	+	
15		PGMA ox	0	114	+	
16			10	11,4	+	
17			0	80,6	+	
18			10	8,1	+	
19	PK	-	-	20,0	+++	

Detekcia produktu PCR:

detegované produkty PCR rôznej intenzity:+, +++
nedetegované produkty PCR: -
PK: pozitívna kontrola DNA *Brassica oleracea*
NK: negatívna kontrola

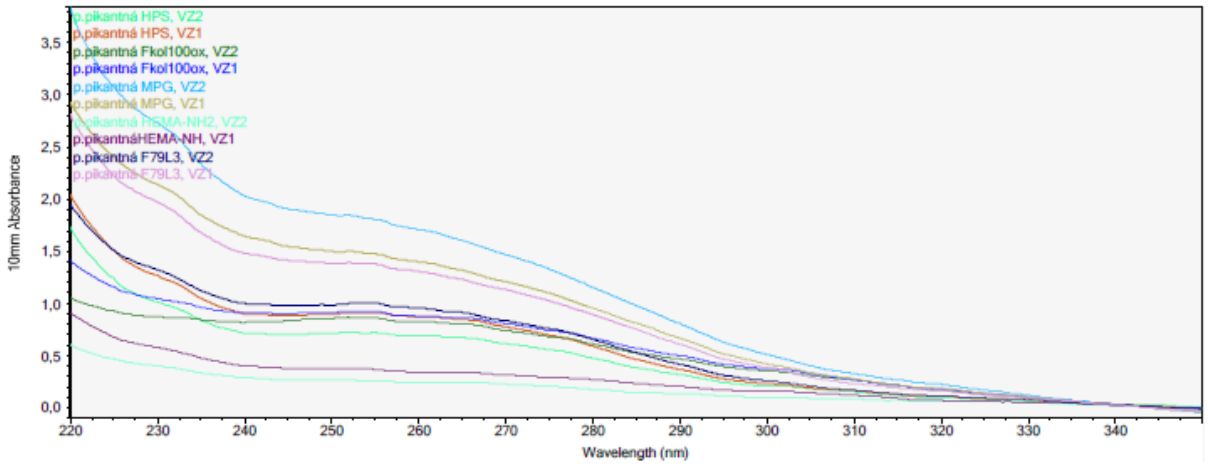
6.6.2 Paprika štipľavá, mletá

Výsledky spektrofotometrického stanovenia koncentrácie a absorbancie pri rôznych vlnových dĺžkach sú uvedené v Tabuľke 13. Absorpčné spektrá sú ukázané na Obrázku17.

Tabuľka 13: Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie DNA, ktorá bola izolovaná zo sušenej papriky pikantnej, mletej rôznymi magnetickými časticami v dvoch paralelných opakovaniach.

Číslo vzorky	DNA	Magnetické častice	A_{260nm}	A_{280nm}	A_{260nm}/A_{280nm}	A_{260nm}/A_{230nm}	c [$ng \cdot \mu l^{-1}$]	Množstvo izolovanej DNA [ng]
1	Paprika štipľavá, mletá	HPS B-M-NH_2	0,852	0,565	1,51	0,69	42,6	4 260
2			0,666	0,451	1,48	0,67	33,3	3 330
1		P(HEMA-*co*-GMA)NH_2	0,319	0,245	1,30	0,57	15,9	1 590
2			0,215	0,146	1,47	0,57	10,8	1 080
1		MPG	1,374	0,931	1,48	0,65	68,7	6 870
2			1,687	1,131	1,49	0,62	84,3	8 430
1		PGMA ox	0,852	0,642	1,33	0,83	42,6	4 260
2			0,797	0,586	1,36	0,94	39,8	3 980
1		PLL	1,280	0,872	1,47	0,65	64,0	6 400
2			0,932	0,633	1,47	0,72	46,6	4 660

Obrázok 17: Absorpčné spektrum DNA, ktorá bola izolovaná rôznymi magnetickými časticami zo sušenej papriky štipľavej, mletej v dvoch paralelných stanoveniach pre každý magnetický nosič.

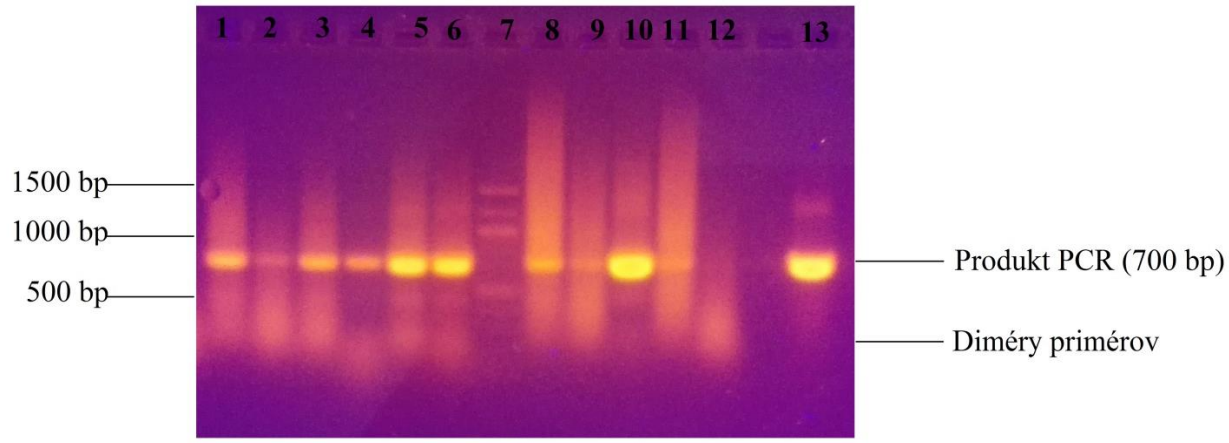


→ Rastlinná DNA bola izolovaná v rôznej koncentrácii podľa použitého nosiča. Koncentrácia izolovanej DNA pre papriku štipľavú, mletú bola 10,8 – 84,3 ng·µl^{-1}. Množstvo získanej DNA týmto postupom je postačujúce pre PCR.

6.6.2.1 Priméry F_18S a R_5,8S

Kvalita DNA bola overená v PCR s následnou detekciou amplikónov gélovou elektroforézou. Vizualizácia produktov PCR (700 bp) je uvedená na Obrázku 18. V zmesi pre PCR bola použitá *Taq* polymeráza 5U·µl^{-1}. Pre pozitívnu kontrolu bola využitá matrica DNA rastliny *Brassica oleracea* (1 ng·µl^{-1}).

Obrázok 18: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR (700 bp). Amplifikovaná bola DNA izolovaná rôznymi magnetickými časticami zo sušenej papriky štipľavej, mletej pomocou primérov F_18S a R_5,8S. Na gél bolo nanesené 25 µl amlifikovanej DNA.



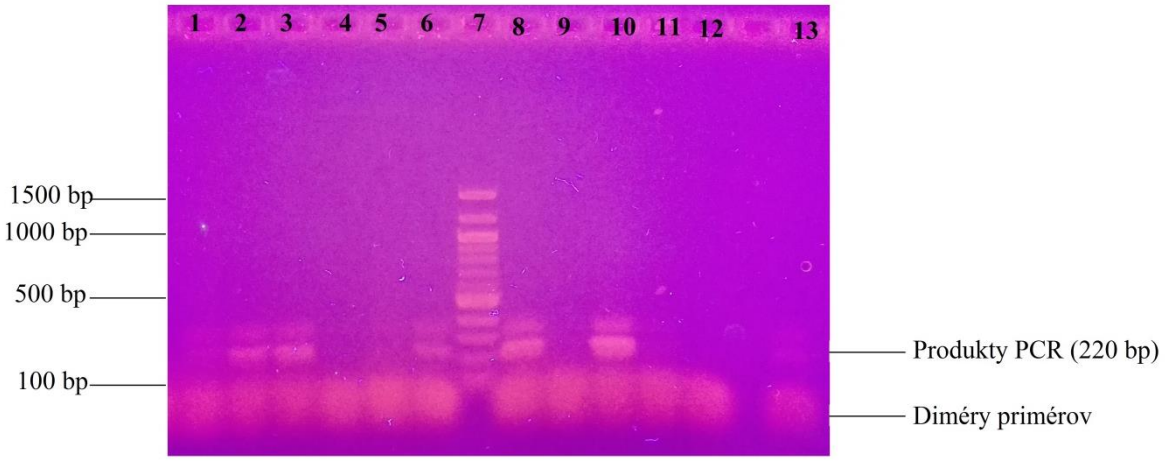
Beh	DNA	Magnetické častice	Riedenie DNA (x)	Množstvo DNA v PCR zmesi [ng]	Detekcia produktov PCR
1	Paprika štipľavá, mletá	PLL	0	128	++
2			10	12,8	+
3		P(HEMA-*co*-GMA)NH2	0	31,8	++
4			10	3,2	++
5		MPG	0	137	+++
6			10	13,7	+++
7	DNA veľkostný štandard				
8	Paprika štipľavá, mletá	PGMA ox	0	85,2	+
9			10	8,5	+
10		HPS B-M-NH2	0	85,2	+++
11			10	8,5	+
12	NK	-	-	-	-
13	PK	-	-	2,0	+++

Detekcia produktu PCR:
detegované produkty PCR rôznej intenzity:+, ++, +++
nedetegované produkty PCR: -
PK: pozitívna kontrola DNA *Brassica oleracea*
NK: negatívna kontrola

6.6.2.2 Priméry F_26S a R_26S

Kvalita DNA bola overená v PCR s následnou detekciou amplikónov gélovou elektroforézou. Vizualizácia produktov PCR (220 bp) je uvedená na Obrázku 19. V zmesi pre PCR bola použitá *Taq* polymeráza 5 U/µl. Pre pozitívnu kontrolu bola využitá matrica DNA rastliny *Brassica oleracea* (1 ng·µl^{-1}).

Obrázok 19: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR (220 bp). Amplifikovaná bola DNA izolovaná rôznymi magnetickými časticami zo sušenej papriky pikantnej, mletej pomocou primérov F_26S a R_26S Na gél bolo nanesené 25 µl amplifikovanej zmesi.



Beh	DNA	Magnetický nosič	Riedenie DNA (x)	Množstvo DNA v PCR zmesi [ng]	Detekcia produktov PCR	Prítomnosť inhibítorov PCR
1	Paprika štipľavá, mletá	PLL	0	128	+/-	+
2			10	12,8	+	
3		P(HEMA-*co*-GMA)NH2	0	31,8	+	
4			10	3,2	-	
5		MPG	0	137	+/-	+
6			10	13,7	+	
7	DNA veľkostný štandard					
8	Paprika štipľavá, mletá	PGMA ox	0	85,2	+	
9			10	8,5	-	
10		HPS B-M-NH2	0	85,2	+	
11			10	8,5	-	
12	NK	-	-	-	-	
13	PK	-	-	2,0	+	

Detekcia produktu PCR:
detegované PCR rôznej intenzity:+/-, +
nedetegované produkty PCR: -
PK: pozitívna kontrola DNA *Brassica oleracea*
NK: negatívna kontrola

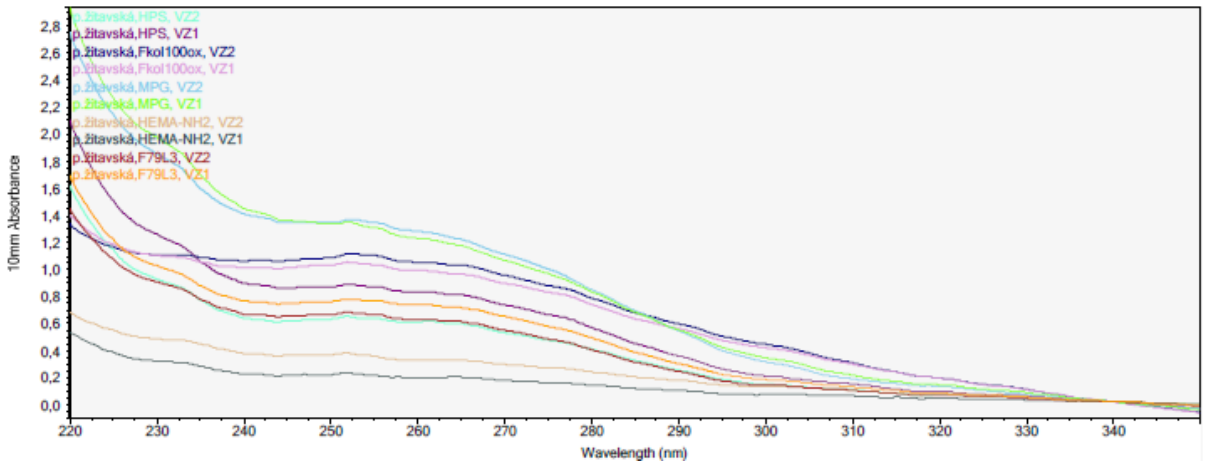
6.6.3 Žitavská paprika sladká, mletá

Výsledky spektrofotometrického stanovenia koncentrácie a absorbancie pri rôznych vlnových dĺžkach sú uvedené v Tabuľke 14. Absorpčné spektrá sú ukázané na Obrázku 20.

Tabuľka 14: Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie DNA, ktorá bola izolovaná zo sušenej papriky žitavskej, mletej rôznymi magnetickými časticami v dvoch paralelných opakovaniach.

Číslo vzorky	DNA	Magnetický nosič	A_{260nm}	A_{280nm}	A_{260nm}/A_{280nm}	A_{260nm}/A_{230nm}	c [ng·µl^{-1}]	Množstvo izolovanej DNA [ng]
1	Paprika žitavská, mletá	HPS B-M-NH_2	0,818	0,552	1,48	0,66	40,9	4 090
2			0,593	0,393	1,51	0,65	29,7	2 970
1		P(HEMA-*co*-GMA)NH_2	0,182	0,125	1,46	0,60	9,1	910
2			0,311	0,224	1,39	0,66	15,6	1 560
1		MPG	1,213	0,818	1,48	0,62	60,6	6 060
2			1,265	0,834	1,52	0,69	63,3	6 330
1		PGMA ox	0,973	0,724	1,34	0,90	48,7	4 870
2			1,034	0,772	1,34	0,95	51,7	5 170
1		PLL	0,721	0,477	1,51	0,71	36,1	3 610
2			0,612	0,388	1,58	0,69	30,6	3 060

Obrázok 20: Absorpčné spektrum DNA, ktorá bola izolovaná rôznymi magnetickými časticami zo sušenej papriky žitavskej, mletej v dvoch paralelných stanoveniach pre každý magnetický nosič.

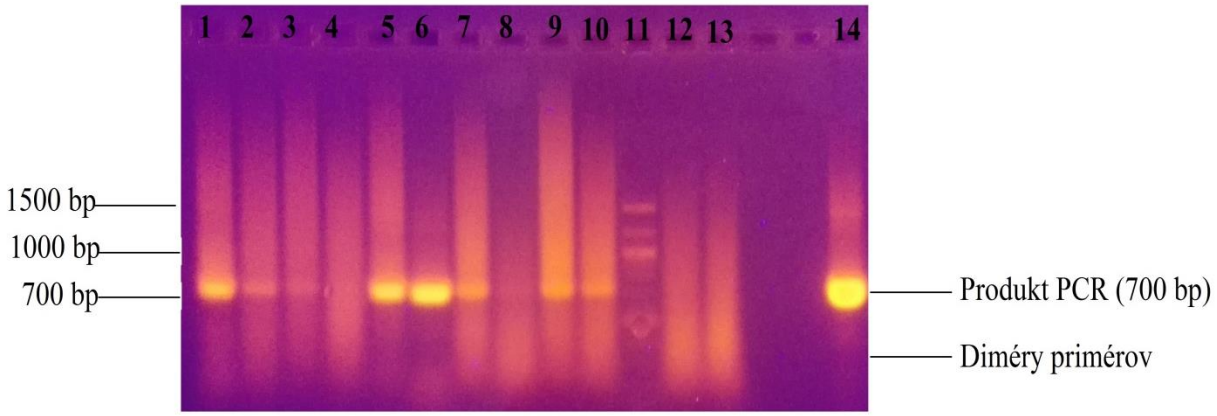


→ Koncentrácia izolovanej DNA pre žitavskú papriku sladkú, mletú bola 9,1 – 63,3 ng·µl^{-1} podľa použitého nosiča. Množstvo získanej DNA týmto postupom je postačujúce pre PCR.

6.6.3.1 Priméry F_18S a R_5,8S

Vizualizácia produktov PCR (700 bp) je uvedená na Obrázku 21. V zmesi pre PCR bola použitá *Taq* polymeráza 5U/µl. Pre pozitívnu kontrolu bola využitá matrica DNA rastliny *Capsicum annuum* (paprika červená lusk 17,5 ng·µl^{-1}, paprika zelená lusk 18,2 ng·µl^{-}1), *Nicotiana tabacum* (10 ng·µl^{-1}).

Obrázok 21: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR (700 bp). Amplifikovaná bola DNA izolovaná rôznymi magnetickými časticami zo sušenej papriky žitavskej sladkej, mletej pomocou primérov F_18S a R_5,8S Na gél bolo nanaesené 25 µl amplifikovanej DNA.



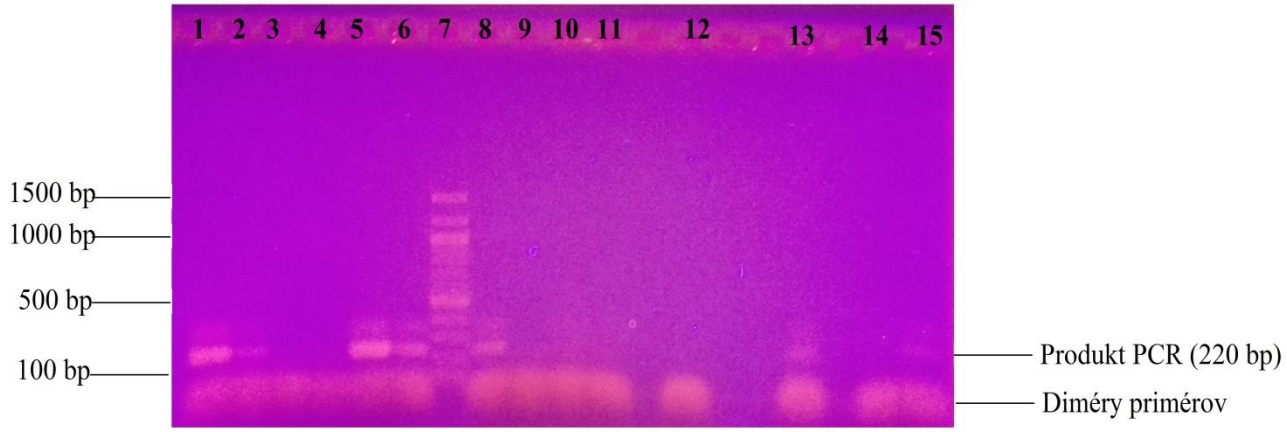
Beh	DNA	Magnetické častice	Riedenie DNA (x)	Množstvo DNA v PCR zmesi [ng]	Detekcia produktov PCR
1	Paprika žitavská sladká, mletá	PLL	0	72,2	++
2			10	7,2	+
3		P(HEMA-*co*-GMA)NH2	0	18,2	+
4			10	1,8	+/-
5		MPG	0	121	++
6			10	12,1	++
7		PGMA ox	0	97,4	+
8			10	9,7	+/-
9		HPS B-M-NH2	0	81,8	+
10			10	8,2	+
11	DNA veľkostný štandard				
12	PK1	-	-	35,0	-
13	PK1	-	-	36,4	-
13	PK2	-	-	20,0	++

Detekcia produktu PCR:
detegované produkty PCR rôznej intenzity:+/-, +, ++
nedetegované produkty PCR: -
PK1: pozitívna kontrola DNA *Capsicum annuum*
PK2: pozitívna kontrola DNA *Nicotiana tabacum*
NK: negatívna kontrola

6.6.3.2 Priméry F_26S a R_26S

Vizualizácia produktov PCR (220 bp) je uvedená na Obrázku 22. V zmesi pre PCR bola použitá *Taq* polymeráza 5U·µl^{-1}. Pre pozitívnu kontrolu bola využitá matrica DNA rastliny *Capsicum annuum* (paprika červená lusk 17,5 ng·µl^{-1}, paprika zelená lusk 18,2 ng·µl^{-}1), *Nicotiana tabacum* (10 ng·µl^{-1}).

Obrázok 22: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR (220 bp). Amplifikovaná bola DNA izolovaná rôznymi magnetickými časticami zo sušenej papriky žitavskej sladkej, mletej pomocou primérov F_26S a R_26S. Na gél bolo nanesené 25 µl amplifikovanej DNA.



Beh	DNA	Magnetické častice	Riedenie DNA (x)	Množstvo DNA v PCR zmesi [ng]	Detekcia produktov PCR
1	Paprika žitavská sladká, mletá	PLL	0	72,2	+
2			10	7,2	+
3		P(HEMA-*co*-GMA)NH2	0	18,2	-
4			10	1,8	-
5		MPG	0	121	+
6			10	12,1	+
7	DNA veľkostný štandard				

Beh	DNA	Magnetické častice	Riedenie DNA (x)	Množstvo DNA v PCR zmesi [ng]	Detekcia produktov PCR
8	Paprika žitavská sladká, mletá	PGMA ox	0	97,4	+
9			10	9,7	-
10		HPS B-M-NH2	0	81,8	-
11			10	8,2	-
12	NK	-	-	-	-
13	PK1	-	-	20,0	+
14	PK2	-	-	35,0	-
15	PK2	-	-	36,4	+

Detekcia produktu PCR:
detegované produkty PCR:+
nedetegované produkty PCR: -
PK1: pozitívna kontrola DNA *Nicotiana tabacum*
PK2: pozitívna kontrola DNA *Capsicum annuum*
NK: negatívna kontrola

6.7 Overenie intaktnosti DNA po prezrážaní etanolom

S cieľom získať DNA o vyššej koncentrácii boli vzorky prezrážané etanolom a zakoncentrované. Intaktnosť DNA bola overená pomocou gélovej elektroforézy na agaróze.

6.7.1 Prezrážanie DNA

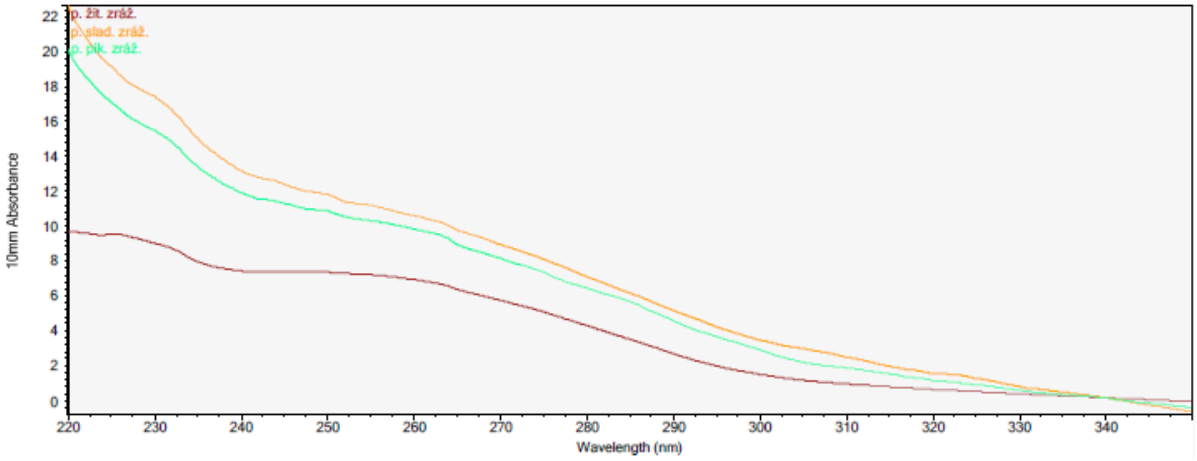
Jednotlivé vzorky DNA izolované z tej istej matrice boli spojené a podľa postupu kapitoly 5.4 boli prezrážané. Koncentrácia DNA bola stanovená spektrofotometricky postupom uvedeným v kapitole 5.5, meraním absorbčného spektra v rozmedzí vlnových dĺžok 220–340 nm. Výsledky spektrofotometrického stanovenia koncentrácie a absorbancie pri rôznych vlnových dĺžkach sú uvedené v Tabuľke 15. Absorpčné spektrum je ukázané na Obrázku 23.

Tabuľka 15: Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie DNA, ktorá bola izolovaná rôznymi magnetickými časticami (okrem P(HEMA-co-GMA)) , spojená do jednej vzorky, prezrážaná etanolom a zakoncentrovaná.

DNA	A_{260nm}	A_{280nm}	A_{260nm}/A_{280nm}	A_{260nm}/A_{230nm}	c [$ng \cdot \mu l^{-1}$]	Množstvo izolovanej DNA [ng]
Paprika sladká, mletá	10,465	6,957	1,50	0,60	523	13 083

DNA	A_{260nm}	A_{280nm}	A_{260nm}/A_{280nm}	A_{260nm}/A_{230nm}	c [ng·µl^{-1}]	Množstvo izolovanej DNA [ng]
Paprika štipľavá, mletá	9,692	6,308	1,54	0,63	484	12 115
Paprika žitavská sladká, mletá	6,784	4,141	1,64	0,76	339	8 480

Obrázok 23: Absorpčné spektrum DNA, ktorá bola izolovaná rôznymi magnetickými časticami (okrem P(HEMA-co-GMA)), spojená do jednej vzorky, prezrážaná etanolom a zakoncentrovaná.

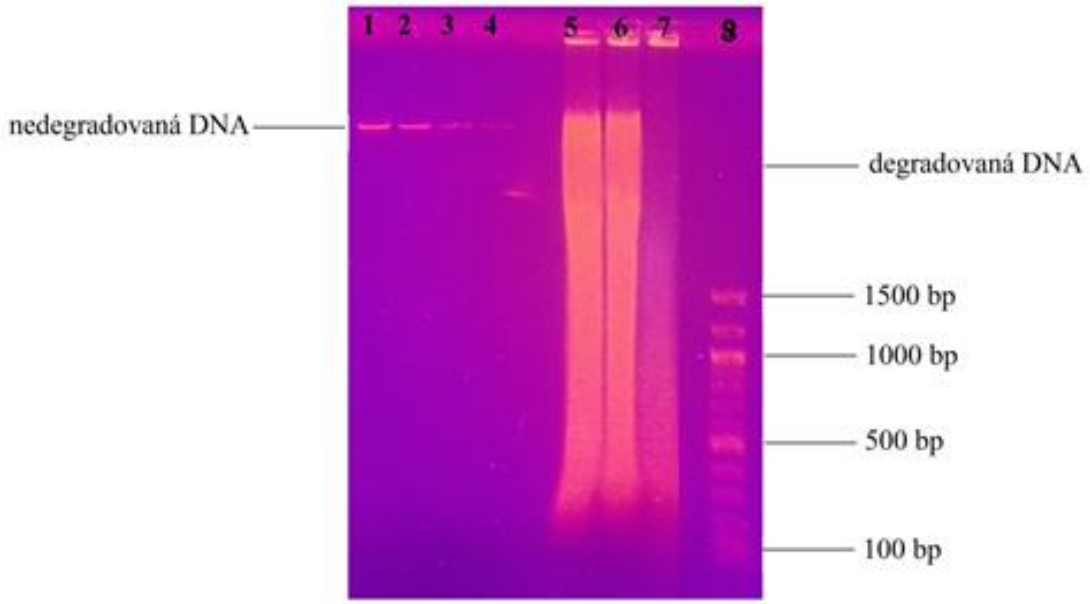


→ DNA bola zakoncentrovaná rôzne v závislosti od vzorky matrice v koncentrácii od 339 – 523 ng·µl^{-1}.

6.7.2 Gélová elektroforéza DNA

Relatívna intaktnosť DNA bola vyhodnotená agarózovou gélovou elektroforézou podľa postupu uvedeným v časti 5.7.1. Ako štandard bola použitá DNA fága λ v množstve 100, 50, 25 a 10 ng. Snímku gélu uvádza Obrázok 24.

Obrázok 24: Gélová elektroforéza zakoncentrovanej DNA, izolovaná rôznymi magnetickými časticami (okrem P(HEMA-co-GMA)) z rôznych výrobkov, Na gél bolo nanesené 23 µl DNA.



Beh	DNA	Množstvo DNA nanesené na gél[ng]	Vizualizácia DNA	Degradace DNA
1	Lambda DNA *Hind*III	100	+	-
2	Lambda DNA *Hind*III	50	+	-
3	Lambda DNA *Hind*III	25	+	-
4	Lambda DNA *Hind*III	10	+	-
5	Paprika žitavská sladká, mletá	7 802	+ (šmuha)	+
6	Paprika štipľavá, mletá	11 146	+ (šmuha)	+
7	Paprika sladká, mletá	12 036	+ (šmuha)	+
8	DNA veľkostný štandard			

Degradace DNA:
Degradovaná DNA: +
Nedegradovaná DNA: -

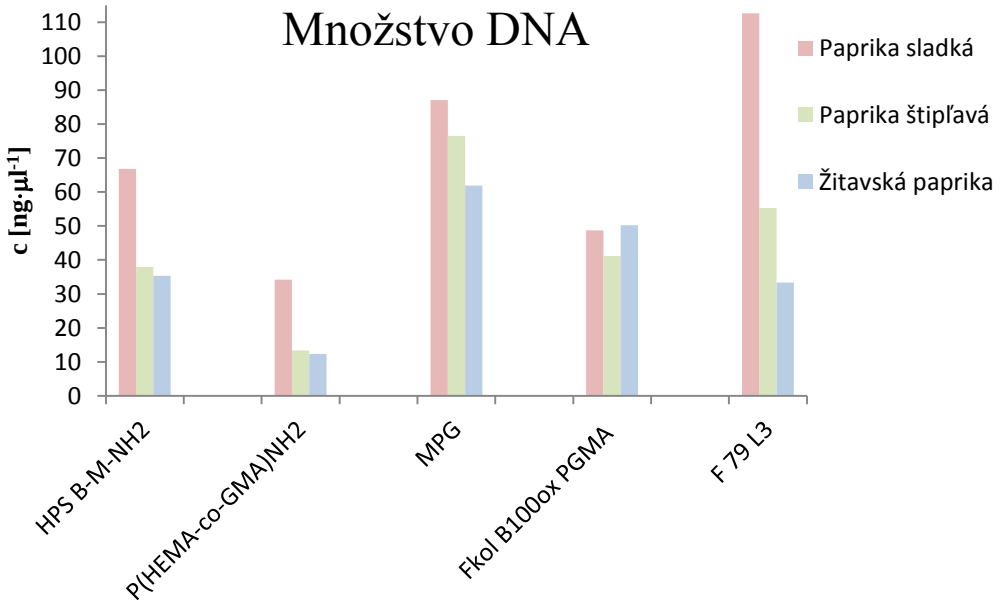
6.8 Porovnanie magnetických nosičov

Pre rôzne modifikované magnetické častice bolo zhodnotené množstvo, kvalita a amplifikovazeľnosť izolovanej DNA pre každý druh mletej papriky formou stĺpcových grafov na základe dát, ktoré sú ukázané v predchádzajúcej časti.

6.8.1 Množstvo izolovanej DNA

Namerané koncentrácie DNA izolované z koreniapre boli spriemerované a priemerné hodnoty boli použité v grafe (Obrázok 25). Vychádzalo sa z dát nameraných koncentrácií uvedených v Tabuľke 12 - 14.

Obrázok 25: Závislosť koncentrácie izolovanej DNA na použitom magnetickom nosiči.



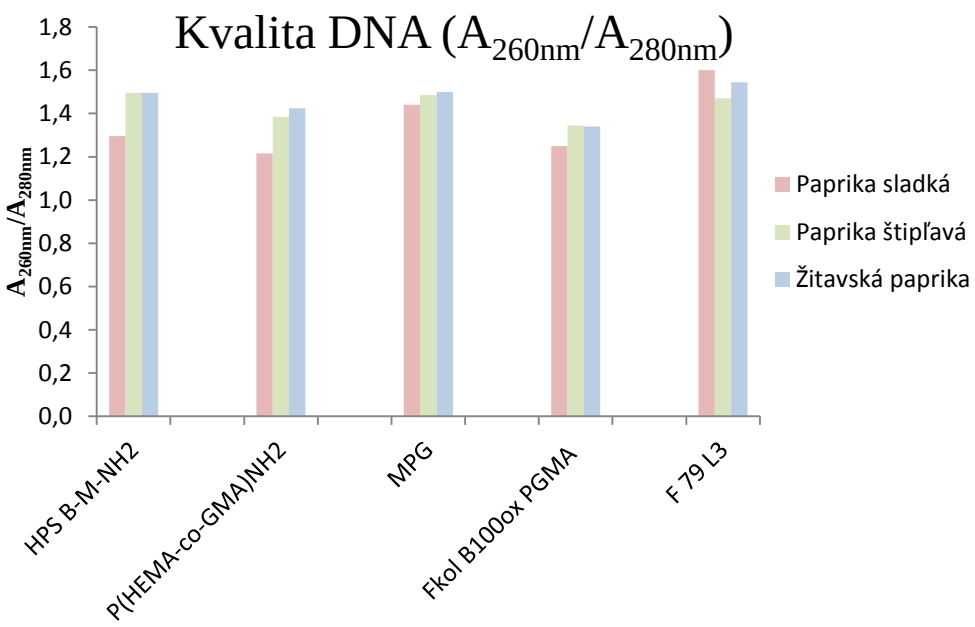
6.8.2 Kvalita DNA

Namerané hodnoty absorbancie A_{260nm}/A_{280nm} a A_{260nm}/A_{230nm} pre paralelné vzorky korenia (paprík) boli spriemerované a priemerné hodnoty boli použité v grafe. Vychádzalo sa z dát nameraných absorbancii uvedených v Tabuľke 12 - 14.

6.8.2.1 Znečistenie proteínami

Z pomeru hodnoty absorbancie pri vlnovej dĺžke 260 nm a 280 nm (A_{260nm}/A_{280nm}) sa dá usúdiť znečistenie izolovanej DNA bielkovinami. DNA sa považuje za čistú, bez prítomnosti proteínov ak je hodnota tohto pomeru medzi 1,8 – 2,0. V prípade, že je pomer nižší spolu s DNA boli izolované aj bielkovinové látky. Porovnanie magnetických častíc z hľadiska hodnôt A_{260nm}/A_{280nm} a prítomnosti proteínov ukazuje Obrázok 26.

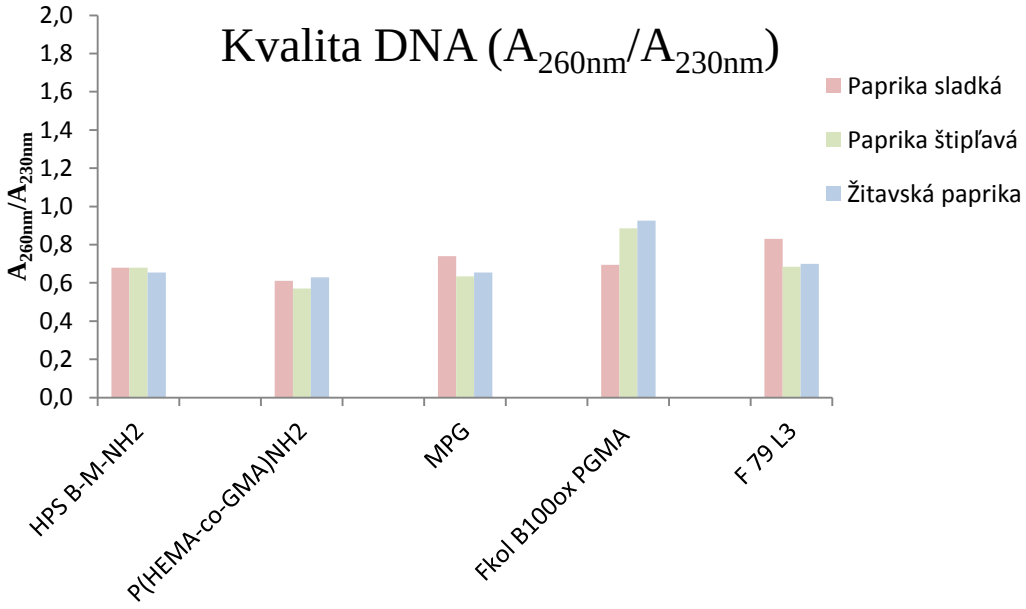
Obrázok 26: Závislosť A_{260nm}/A_{280nm} na použitom magnetickom nosiči.



6.8.2.2 *Znečistenie polyfenolickými látkami*

Z pomeru hodnoty absorbancie pre vlnovej dĺžke 260 nm a 230 nm (A_{260nm}/A_{230nm}) sa dá usúdiť znečistenie izolovanej DNA polyfenolami. DNA sa považuje za čistú, bez prítomnosti polyfenolov ak je hodnota tohto pomeru okolo 2,0. V prípade, že je pomer nižší spolu s DNA boli izolované aj polyfenolické látky. Porovnanie magnetických častíc z hľadiska hodnôt A_{260nm}/A_{230nm} a prítomnosti polyfenolov ukazuje Obrázok 27.

Obrázok 27: Závislosť hodnôt A_{260nm}/A_{230nm} na použitom magnetickom nosiči.



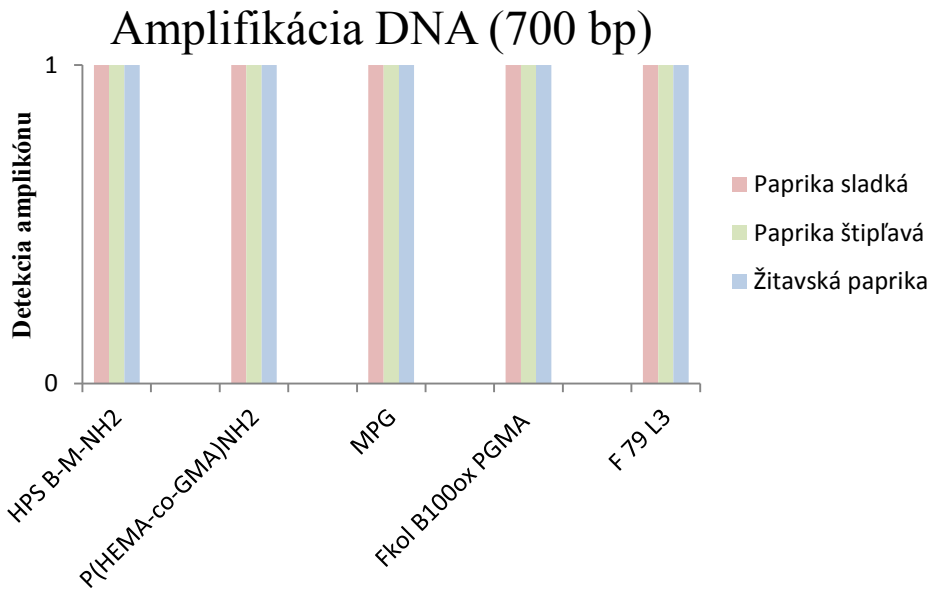
6.8.3 Amplifikácia DNA v PCR

Vychádzalo sa z obrázkov agarózových gélových elektroforéz produktov PCR (700 bp/220 bp). DNA bola izolovaná rôznymi magnetickými časticami z mletých paprík. Ak bol produkt PCR vizualizovaný na géle (z neriedenej, 10x alebo aj 100x riedenej matrice DNA) je v grafe ukázaný pri hodnote 1.

6.8.3.1 Produkty PCR 700 bp

Porovnanie magnetických častíc z hľadiska vizualizácie produktov PCR 700 bp agarózovou gélovou elektroforézou pre analyzované výrobky ukazuje Obrázok 28. Overenie kvality DNA v PCR izolovanej z papriky sladkej nanočasticami PLL nie je uvedená v tejto práci, ale bola overená a amplikóny 700 bp boli vizualizované.

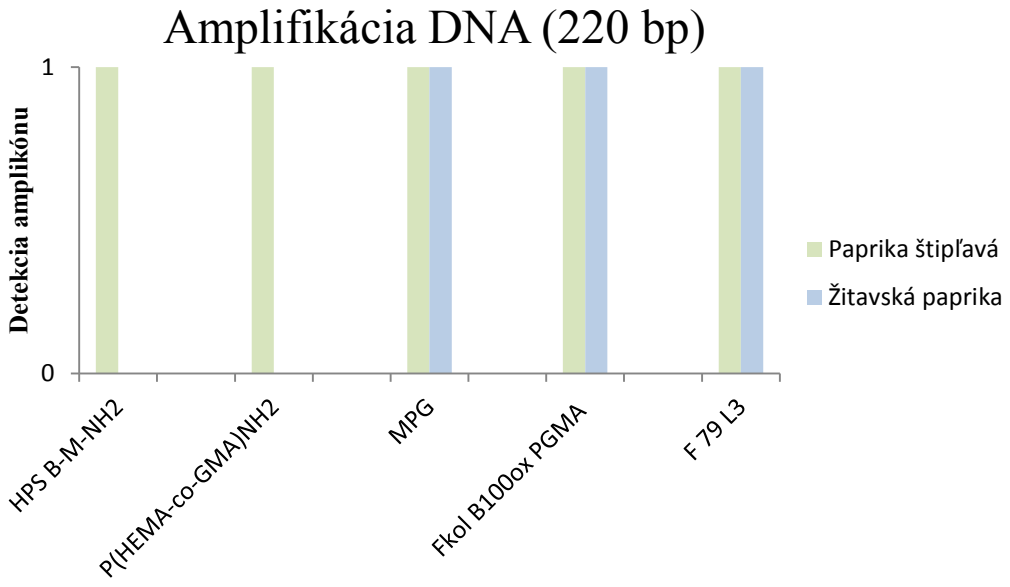
Obrázok 28:Závislosť detekcie amplikónu 700 bp na použitom magnetickom nosiči.



6.8.3.2 Produkty PCR 220 bp

Porovnanie magnetických častíc z hľadiska vizualizácie amplikónov 220 bp agarózovou gélovou elektroforézou pre analyzované výrobky ukazuje Obrázok 29.Overenie kvality DNA v PCR izolovanej z papriky sladkej mletej rôznymi magnetickými časticami, kde veľkosť špecifického produktu PCR je 220 bp nebola overená v tejto práci.

Obrázok 29: Závislosť detekcie amplikónu 220 bp na použitom magnetickom nosiči.



6.9 Výber najvhodnejšieho nosiča pre izoláciu DNA z korenia (paprík)

Na základe získaných výsledkov z testovania magnetických častíc boli vybrané nanočastice PLL, komerčné mikročastice MPG a mikročastice HPS B-M-NH_2, pomocou ktorých bola izolovaná DNA z komplexných potravinových výrobkov obsahujúcich mletú papriku optimálnym postupom vypracovaným v prvej časti.

Magnetické častice MPG a PLL boli zvolené pre izoláciu DNA z komplexných výrobkov, pretože podľa kapitoly 6.8.1 bolo nimi izolované najväčšie množstvo DNA a v kvalite vhodnej pre PCR. Pre porovnanie ako tretie nosiče boli zvolené mikročastice HPS B-M-NH_2 z dôvodu, že sú taktiež porézne ako nosiče MPG.

III ČASŤ

Pre izoláciu DNA z komplexných výrobkov boli vybrané magnetické mikročastice MPG, HPS B-M-NH_2 a nanočastice PLL. Ako matrice DNA boli použité potravinové výrobky gulášová polievka, harrisa, budapešťský krém a tvarôžková pomazánka pikant.

Izolácia DNA z komplexných potravinárskych produktov zahŕňala homogenizáciu buniek s použitím lyzačného roztoku s CTAB a izoláciu DNA vybranými magnetickými časticami z homogenátov s použitím separačnej zmesi s výslednou koncentráciou 16 % PEG 6 000. Po homogenizácii vzoriek a vyizolovaní DNA bola spektrofotometricky stanovená koncentrácia a čistota DNA a pomocou PCR overená kvalita v PCR.

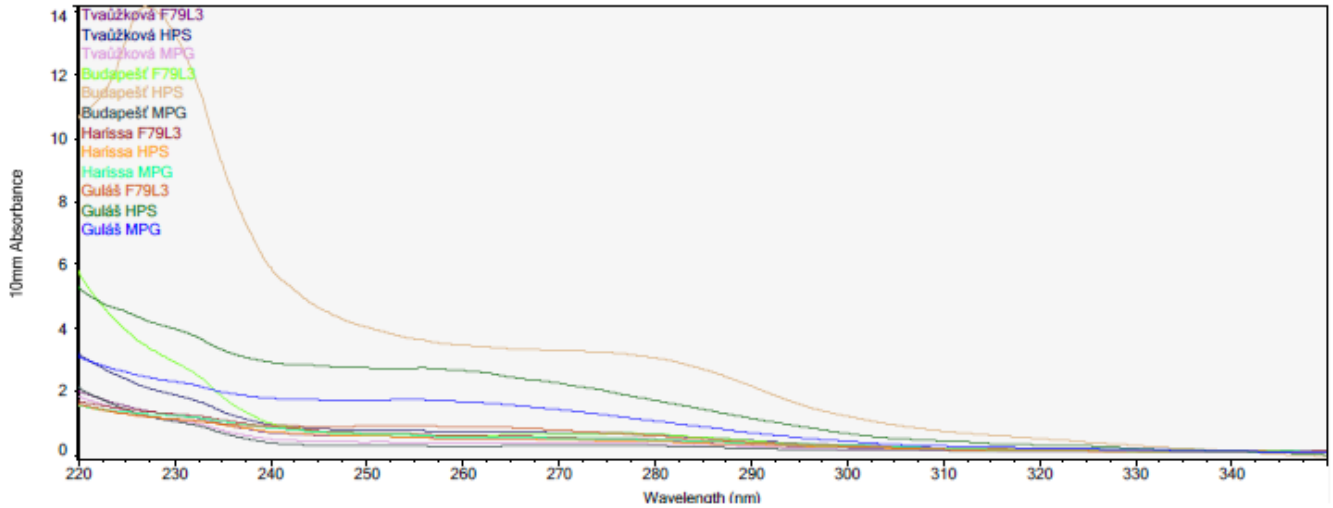
6.10 Izolácia rastlinnej DNA z komplexných potravinových výrobkov

Postupom uvedeným v kapitole 5.1 boli pripravené homogenáty z testovaných výrobkov. Približne 0,1 g materiálu sa homogenizovalo za chladu s 500 µl lyzačného roztoku s CTAB. 100 µl homogenátu bolo použité pre izoláciu DNA magnetickými časticami postupom uvedeným v kapitole 5.3. Koncentrácia DNA bola stanovená spektrofotometricky postupom uvedeným v kapitole 5.5, meraním absorbčného spektra v rozmedzí vlnových dĺžok 220–340 nm. Výsledky spektrofotometrického stanovenia koncentrácie a absorbancie pri rôznych vlnových dĺžkach sú uvedené v Tabuľke 16. Absorpčné spektrum DNA je ukázané na Obrázku 30. Jednotlivé absorpčné spektrá pre každý potravinový výrobok zvlášť sú uvedené na Obrázku 41 - 43 v prílohe.

Tabuľka 16: Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie DNA, ktorá bola izolovaná vybranými magnetickými časticami z komplexných potravinových výrobkov.

DNA	Magnetické častice	A_{260nm}	A_{280nm}	A_{260nm}/A_{280nm}	A_{260nm}/A_{230nm}	c [$ng \cdot \mu l^{-1}$]	Množstvo izolovanej DNA [ng]
Gulášová polievka	MPG	1,565	0,953	1,64	0,71	78,2	7 820
	HPS	2,553	1,609	1,59	0,66	128	12 760
	PLL	0,769	0,494	1,56	0,76	38,5	3 850
Harissa	MPG	0,452	0,368	1,23	0,41	22,6	2 260
	HPS	0,396	0,306	1,29	0,39	19,8	1 980
	PLL	0,483	0,381	1,27	0,41	24,2	2 420
Budapešťský krém	MPG	0,144	0,163	0,88	0,15	7,2	720
	HPS	3,357	2,962	1,13	0,25	168	16 780
	PLL	0,492	0,534	0,92	0,17	24,6	2 460
Tvarůžková pomazánka pikant	MPG	0,266	0,244	1,09	0,27	13,3	1 330
	HPS	0,613	0,528	1,16	0,34	30,6	3 060
	PLL	0,413	0,328	1,26	0,36	20,6	2 060

Obrázok 30: Absorpčné spektrum DNA, ktorá bola izolovaná vybranými magnetickými časticami z komplexných potravinových výrobkov.



→ Rastlinná DNA bola izolovaná zo všetkých použitých homogenátov pripravených z komplexných výrobkov v rôznej koncentrácii. Koncentrácia izolovanej DNA pre gulášovú polievku bola v rozmedzí 38,5 – 128 ng·µl^{-1}, pre harissu 19,8 – 24,2 ng·µl^{-1}, pre budapešťský krém 7,2 – 168 ng·µl^{-1} a pre tvarôžkovu pomazánku pikant 13,3 – 30,6 ng·µl^{-1} v závislosti na použitých časticiach. Množstvo získanej DNA týmto postupom môže byť postačujúce pre PCR.

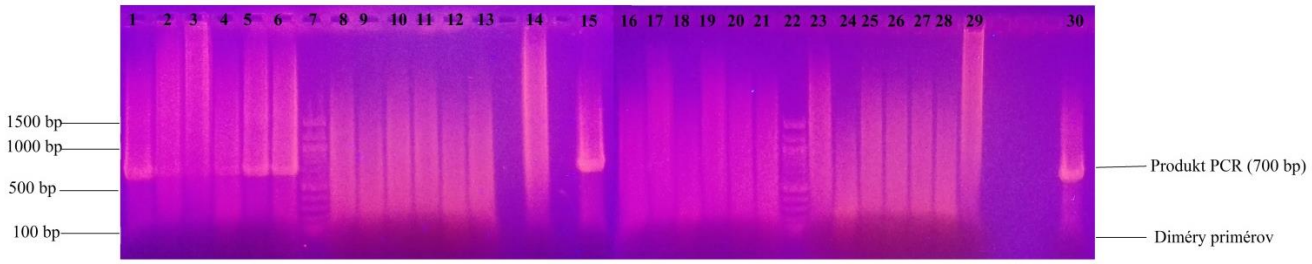
6.10.1 Overenie kvality DNA v PCR

Kvalita DNA bola overená metódou polymerázovej reťazovej reakcie primérami F_18S, R_5,8S s následnou vizualizáciou pomocou agarózovej gélovej elektroforézy produktov PCR. Príprava PCR zmesi a prevedenie PCR je uvedené v kapitole 5.6.

6.10.1.1 Priméry F_18S a R_5,8S

Metódou PCR bola overená prítomnosť rastlinnej DNA s využitím špecifických primérov pre rastlinnú DNA*:* F_18S a R_5,8S. Veľkosť špecifického amplikonu bola 700 bp. Vizualizácia produktov PCR je uvedená na Obrázku 31. Ako DNA matrica bola použitá neriedená a riedená izolovaná DNA 10x z výrobkov. V zmesi pre PCR bola použitá 5U/µl *Taq* polymeráza. Pre pozitívnu kontrolu bola využitá matrica DNA rastliny *Brassica oleracea* (1,0 ng·µl^{-1}) a *Nicotiana tabacum* (10 ng·µl^{1}).

Obrázok 31: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR (700 bp). Amplifikovaná bola DNA izolovaná vybranými magnetickými časticami z komplexných výrobkov pomocou primérov F_18S a R_5,8S. Na gél bolo nanesené 25 µl amplifikovanej DNA.



Beh	DNA	Magnetické častice	Riedenie DNA (x)	Množstvo DNA v PCR zmesi [ng]	Detekcia produktov PCR	Prítomnosť inhibítorov PCR
1	Gulášová polievka	MPG	0	156	+	
2			10	15,6	+	
3		PLL	0	77	+	
4			10	7,7	+	
5		HPS	0	255	+	
6			10	25,5	+	
7	DNA veľkostný štandard					
8	Harissa	MPG	0	45,2	-	+
9			10	4,5	-	+
10		PLL	0	48,4	-	+
11			10	4,8	-	+
12		HPS	0	39,6	-	+
13			10	4,0	-	+
14	NK	-	-	-	-	
15	PK1	-	-	2	++	
16	Budapešťský krém	MPG	0	14,4	-	+
17			10	1,4	-	+
18		PLL	0	49,2	-	+
19			10	4,9	-	+
20		HPS	0	335	-	+
21			10	33,6	-	+
22	DNA veľkostný štandard					

Beh	DNA	Magnetické častice	Riedenie DNA (x)	Množstvo DNA v PCR zmesi [ng]	Detekcia produktov PCR	Prítomnosť inhibítorov PCR
23	Tvarůžková pomazánka pikant	MPG	0	26,6	-	+
24			10	2,7	-	+
25		PLL	0	41,2	-	+
26			10	4,1	-	+
27		HPS	0	61,2	-	+
28			10	6,1	-	+
29	NK	-	-	-	-	
30	PK2	-	-	20	++	

Detekcia produktu PCR:
detegované produkty PCR rôznej intenzity:+, ++
nedetegované produkty PCR: -
PK1: pozitívna kontrola DNA *Brassica oleracea*
PK2: pozitívna kontrola DNA *Nicotiana tabacum*
NK: negatívna kontrola

6.11 Testovanie prítomnosti bakteriálnej DNA v korení

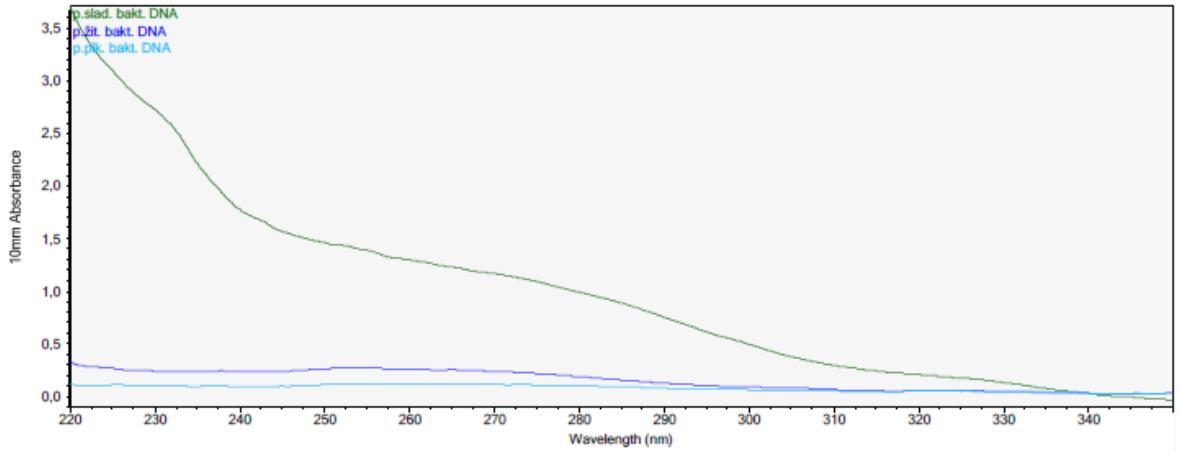
Postupom uvedeným v kapitole 5.2 b) boli pripravené homogenáty z rôznych výrobkov mletých paprík (korenia). Približne 0,1 g materiálu sa rozsuspendovalo v 500 µl sterilnej vody. Po centrifugácii sa k sedimentu pridalo 500 µl lyzačného roztoku B. Po inkubácii bolo pridané 12,5 µl SDS a 5 µl proteináty K. 100 µl hrubého lyzátu bolo použité pre izoláciu DNA magnetickými časticami postupom uvedeným v kapitole 5.3. Koncentrácia DNA bola stanovená spektrofotometricky postupom uvedeným v kapitole 5.5, meraním absorbčného spektra v rozmedzí vlnových dĺžok 220–340 nm. Výsledky spektrofotometrického stanovenia koncentrácie a absorbancie pri rôznych vlnových dĺžkach sú uvedené v Tabuľke 17. Absorpčného spektrum DNA je ukázané na Obrázku 32. Absorpčné spektrum purifikovanej bakteriálnej DNA *Bifidobacterium animalis* CCM 4988T je ukázané na Obrázku 45.

Tabuľka 17: Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie bakteriálnej DNA. DNA bola izolovaná magnetickými časticami MPG z hrubých lyzátov bakteriálnych buniek v korení.

DNA	A_{260nm}	A_{280nm}	A_{260nm}/A_{280nm}	A_{260nm}/A_{230nm}	c [$ng \cdot \mu l^{-1}$]	Množstvo izolovanej DNA [ng]
Paprika štipľavá, mletá	0,090	0,075	1,21	1,22	4,5	450
Paprika žitavsk, mletá	0,228	0,160	1,42	1,08	11,4	1 140

DNA	A_{260nm}	A_{280nm}	A_{260nm}/A_{280nm}	A_{260nm}/A_{230nm}	c [ng·µl^{-1}]	Množstvo izolovanej DNA [ng]
Paprika sladká, mletá	1,268	0,966	1,31	0,47	63,4	6 340

Obrázok 32: Absorpčné spektrum bakteriálnej DNA. DNA bola izolovaná magnetickými časticami MPG z hrubých lyzátov bakteriálnych buniek v korení.



→ Bakteriálna DNA bola izolovaná zo všetkých hrubých lyzátov bakteriálnych buniek v korení mletých paprík v rôznej koncentrácii. Koncentrácia DNA pre papriku sladkú mletú bola 63,4 ng·µl^{-1}, pre papriku pikantnú mletú 4,5 ng·µl^{-1} a pre žitavskú papriku sladkú, mletú 11,4 ng·µl^{-1}.

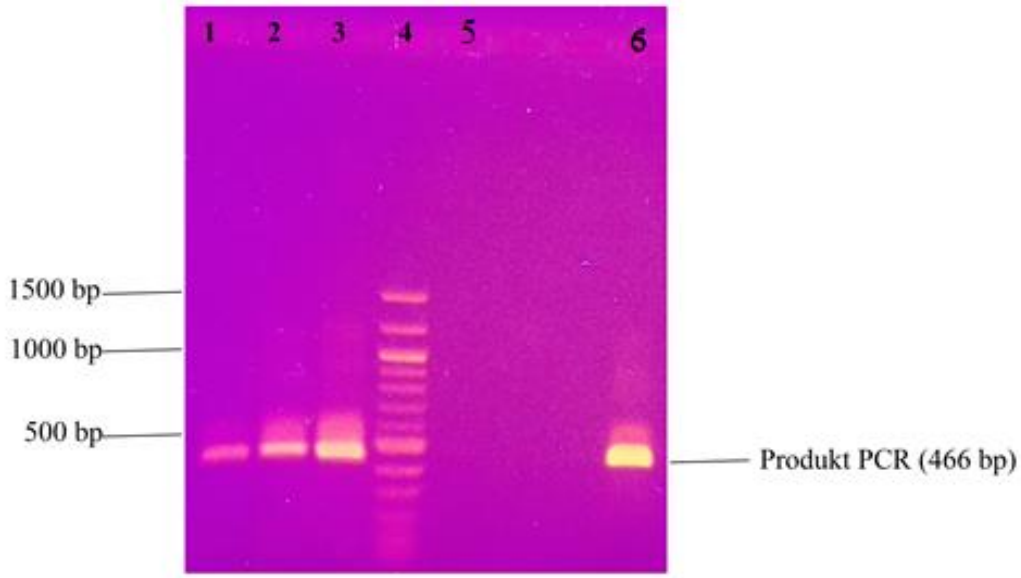
6.11.1 Overenie prítomnosti bakteriálnej DNA pomocou PCR

Prítomnosť DNA bola overená metódou polymerázovej reťazovej reakcie so špecifickými primérmi pre doménu *Bacteria* s následnou vizualizáciou pomocou agarózovej gélovej elektroforézy produktov PCR. Postupovalo sa poľa postupov uvedených v kapitolách 5.6 – 5.7.

6.11.1.1 Priméry F_eub, R_eub

Metódou PCR bola overená prítomnosť bakteriálnej DNA s využitím špecifických primérov pre doménu *Bacteria:* F_eub a R_eub. Veľkosť špecifického amplifikačného produktu PCR bola 466 bp. Vizualizácia produktov PCR je uvedená na Obrázku 33. V zmesi pre PCR bola použitá *Taq* polymeráza 5U/µl. Pre pozitívnu kontrolu bola využitá matrica DNA baktérie *Bifidobacterium animalis* CCM 4988T (10 ng·µl^{-1}).

Obrázok 33: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR (466 bp). Amplifikovaná bola DNA izolovaná magnetickými časticami MPG pomocou primérov F_eub, R_eub špecifických pre doménu Bacteria z mletých paprík .



Beh	DNA	Množstvo DNA v PCR zmesi [ng]	Detekcia produktov PCR
1	Paprika sladká, mletá	126	+
2	Paprika štipľavá, mletá	9,0	+
3	Paprika žitavská sladká, mletá	22,8	+
4	DNA veľkostný štandard		
5	NK	-	-
6	PK	20,0	++

Detekcia produktu PCR:

Detegované produkty PCR rôznej intenzity:+, ++

Nedetegované produkty PCR: -

PK: pozitívna kontrola DNA *Bifidobacterium animalis* CCM 4988T (10 ng·µl^{-1})

NK: negatívna kontrola

→ Bola preukázaná prítomnosť bakteriálnej DNA. Produkty PCR boli rôznej intenzity v závislosti na čistote izolovanej DNA.

7 DISKUSIA

Izolácia DNA z rastlinného pletiva v požadovanej kvalite je veľmi komplikovaná, hlavne z dôvodu prítomnosti látok, ktoré môžu interferovať pri amplifikácii DNA. Týmito látkami sú hlavne polyfenoly, polysacharidy, proteíny a rôzne farbivá. Chemická rôznorodosť takýchto látok môže mať významný vplyv na výťažok a kvalitu DNA pri použití jedného izolačného postupu. Bolo potvrdené, že použitie jedného izolačného protokolu u príbuzných matríc má vplyv na množstvo, kvalitu a amplifikáciu izolovanej DNA [40].

7.1 Testovanie metódy mikroizolácie DNA po homogenizácii v lyzačnom roztoku CTAB

Pre mikroizoláciu DNA z korenia boli vybrané koreniny sladká paprika mletá, štipľavá paprika mletá, žitavská paprika sladká, mletá a paprikové lusky papriky červenej a papriky zelenej. Analyzovaný materiál bol homogenizovaný s lyzačným roztokom CTAB pomocou kopistu za chladu. Takto spracované vzorky boli inkubované. Z homogenátov buniek bola DNA separovaná magnetom spolu s magnetickými mikročasticami P(HEMA-*co*-GMA) a eluovaná do TE pufru. Po inkubácií boli vzorky z mletých paprík veľmi viskózne, čo môže značiť prítomnosť polysacharidov, ktoré môžu mať vplyv na citlivosť PCR. Touto problematikov sa zaoberá viacero prací, napríklad pre izoláciu rastlinnej DNA z *Entelea arborescens*, čo je rastlina bohatá na polysacharidy boli úspešne navrhnuté dve mikroextrakčné modifikované CTAB metódy [41].

7.1.1 Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie DNA

Koncentrácia a čistota izolovanej DNA bola stanovená spektrofotometricky zo získaných nameraných dát absorbancií v rozmedzí vlnových dĺžok 220-340 nm. Z hodnoty A_{260nm} bola určená koncentrácia izolovanej DNA. Množstvo izolovanej DNA bolo rozdielne v závislosti od použitej matrice ale aj v rámci paralelných izolácii. Rozdiely mohli byť spôsobené približnou navážkou vzorky 0,1 g a nerovnomernou homogenizáciou. Najväčšia koncentrácia DNA bola získaná izolovaním DNA z výrobku papriky sladkej, mletej, kde sa koncentrácia pohybovala v rozmedzí 12,6 $ng \cdot \mu l^{-1}$ - 32,3 $ng \cdot \mu l^{-1}$. Najmenšie množstvo DNA bolo izolované z lusku papriky zelenej, kde bola koncentrácia v rozmedzí od 5,6 $ng \cdot \mu l^{-1}$ do 15,9 $ng \cdot \mu l^{-1}$.

Zo sušených, mletých paprík bolo izolované väčšie množstvo DNA ako z luskov paprík. Pre sušenú papriku mletú bola koncentrácia izolovanej DNA v rozmedzí od 12,6 – 32,3 $ng \cdot \mu l^{-1}$. Z luskov bola koncentrácia izolovanej DNA v rozmedzí od 5,6 – 17,6 $ng \cdot \mu l^{-1}$. Dôvodom môže byť, že u sušených matríc vplyvom spracovania (mletie, sušenie) došlo k inaktivácii poprípade k odstráneniu DNA endonukleáz, ktoré mohli štiepiť DNA (degradovať) a tým znižovať výťažky [21]. Zároveň sa dá predpokladať, že rastlinné bunky boli čiastočne narušené vplyvom spracovania a teda prístupnejšie pre lyzačný roztok CTAB a izolácia DNA bola výnosnejšia. Tiež účinnosť extrakcie DNA je jednoznačne závislá na veľkosti častíc. So znižujúcou sa veľkosťou častíc vzorky, výťažky narastajú [7].

Z pomeru hodnôt absorbancie A_{260nm}/A_{230nm} bolo stanovené znečistenie DNA fenolickými látkami. Fenol má maximum absorbancie pri 230 nm. Hodnota pomeru A_{260nm}/A_{230nm} by mala byť okolo 2,0 a absorpčná krivka by mala mať hodnotu A_{230nm} oveľa nižšiu ako pri A_{260nm}, kde by mala dosahovať svoje maximum [34]. Príklad správneho absorpčného spektra je uvedený na Obrázku39. Z absorpčného spektra izolovanej DNA (Obrázok 7 a Obrázok 8) je vidieť, že izolovaná DNA bola do značnej miery znečistená fenolickými látkami, ktoré boli izolované z rastlinného pletiva spolu s DNA. Avšak vzorky DNA luskov papriky boli menej znečistené polyfenolickými látkami (1,3 – 2,2) ako koreniny (0,7 – 1,5). Dá sa predpokladať, keďže u mletých paprík bolo množstvo izolovanej DNA väčšie, tak aj obsah fenolických látok (flavanoidy, alkaloidy. farbivá) izolovaných spolu s DNA bol vyšší a DNA bola izolovaná v menšej kvalite. Uvádza sa, že koreniny obsahujú veľké množstvo polyfenolických látok. Ukázalo sa, že modifikáciou extrakčného protokolu CTAB bolo možné izolovať a následne amlifikovať DNA zo sušeného čierneho korenia bohatého na polyfenoly [42].

Zo získaných výsledkov je možné usúdiť aj znečistenie proteínami. Pokiaľ je hodnota absorbancie pri A_{260nm}/A_{280nm} menšia ako 1,8, potom je DNA znečistená proteínami [34]. Z nameraných hodnôt vyplýva, že znečistenie proteínovými látkami sa prejavilo u izolovanej DNA z korenín a luskov paprík približne v rovnakej miere. DNA nebola izolovaná v dostatočnej kvalite a čistote, čo mohlo mať vplyv na ďalšie výsledky [34].

7.1.2 Overenie kvality DNA pomocou PCR s primérami F_18S a R_5,8S

Prítomnosť rastlinnej DNA bola dokázaná agarózovou gélovou elektroforézou, využitím primérov F_18S a R_5,8S a veľkosť špecifického amplikonu bola 700 bp (Obrázok 9). Najlepšie sa amplifikovala DNA z lusku zelenej papriky, čo sa dalo predpokladať, pretože aj podľa spektrofotometrického stanovenia bola kvalita tejto DNA najlepšia, napriek tomu, že množstvo izolovanej DNA bolo najnižšie. Niektorá DNA z lusku červenej papriky a z papriky mletej sa lepšie amplifikovali po zriedení. Čo môže značiť prítomnosť inhibítorov (polyfenoly, proteíny, polysacharidy, farbivá). Čím by sa nariedili práve prítomné inhibítory a nie DNA, ktorá bola následne v PCR reakcií lepšie amplifikovaná (bol detekovaný produkt PCR vyššej intenzity) ako neriedená DNA v pôvodnej koncentrácii. Desiatkové riedenie bolo vyhodnotené ako dostačujúce, kedy dôjde k vyriedeniu inhibítorov. U stovkového riedenia boli vyriedené nielen inhibítory ale aj DNA, ktorá následne nebola amplifikovateľná vďaka nízkej koncentrácií DNA použitej pre PCR reakciu. Tento jav je možné sledovať na Obrázku 9 behy 13-15. Preto v ďalších experimentoch sa pracovalo len s desiatkovým zriedením DNA. Riedenie vzorky, alebo extrahovanej nukleovej kyseliny je všeobecne a široko používaná metóda, ktorá automaticky vedie k riedeniu inhibítorov PCR. Avšak, riedenie je sprevádzané znížením citlivosti [25].

Ďalším faktorom mohla byť degradácia DNA (Obrázok 12), ktorá je sprevádzaná štiepením DNA na menšie fragmenty, čím sa redukuje citlivosť PCR.

Overenie kvality DNA v PCR izolovanej zo žitavskej papriky sladkej magnetickými časticami P(HEMA-*co*-GMA) nie je uvedené, ale bolo overené a amplikóny 700 bp boli vizualizované.

7.1.3 Overenie kvality DNA pomocou PCR s primérami F_26S a R_26S

Prítomnosť rastlinnej DNA bola overená agarózovou gélovou elektroforézou, aj s využitím primérov F_26S a R_26S veľkosť špecifického amplikónu bola 220 bp. Ako je vidieť na snímke gélu Obrázok 10, produkty PCR boli rovnakej intenzity nezávisle na kvalite alebo kvantite izolovanej DNA. Keďže sa preukázalo, že DNA bola izolovaná v degradovanej forme (Obrázok 12), vzorky DNA obsahovali viac kratších fragmentov DNA (viac úsekov o veľkosti 220 bp) a amplifikácia DNA mohla byť výnosnejšia. V tomto prípade zriedenie izolovanej DNA za účelom zriediť prítomné inhibítory PCR, nemalo žiaden vplyv na amplifikáciu DNA. Iný autori, ktorý sa zaoberali vplyvom tepelného spracovania na degradáciu DNA z rastlinných matríc preukázali, že u sójovej múky, veľkosť častíc, stupeň a čas tepelného spracovania môže negatívne ovplyvňovať detekciu a kvantifikáciu potravinových zložiek. Obyčajne, veľkosť amplikónu by mala byť okolo 200 bp pre analýzu spracovaných potravín pomocou PCR [32].

Overenie kvality DNA v PCR izolovanej zo žitavskej papriky sladkej a lusku papriky zelenej magnetickými časticami P(HEMA-*co*-GMA) nie je uvedené, ale bolo overené a amplikóny 220 bp boli vizualizované pre obe matrice.

Amplikón bol detegovaný aj v negatívnej kontrole pravdepodobne z dôvodu kontaminácie primérov. Ako ukazuje Obrázok 46 kde bola testovaná pozitívna kontrola s dvoma sadami reakčných PCR komponent (používané a zásobné) pre negatívnu kontrolu bol detegovaný produkt PCR o veľkosti 220 bp pre obe sady. Zatiaľ čo pre negatívne kontroly amplikóny o veľkosti 700 bp neboli detegované napriek tomu, že boli používané tie isté komponenty okrem primérov. Uvádza sa, kontaminácia i jedinou molekulou exogénnej alebo neznámej DNA postačuje pre získanie falošne pozitívneho výsledku. Najčastejšie je kontaminácia spôsobená prenosom kontaminujúcej DNA z predošlých amplifikovaných produktov PCR a vzájomnou kontamináciou zdrojových materiálov. Takže aj zlá čistota reakčných komponent môže viesť k falošne pozitívnym výsledkom [34].

7.2 Overenie intaktnosti DNA po prezrážaní etanolom

Množstvo izolovanej DNA bolo dostačujúce pre analýzu PCR, avšak treba brať do úvahy vplyv spracovania korenín na degradáciu DNA, čo je sprevádzané štiepením DNA na menšie fragmenty, čím sa redukuje citlivosť PCR. Preto bola overená intaktnosť DNA. Vo väčšine prípadov, korenie je sušené a/alebo fermentované v dôsledku čoho môže byť DNA degradovaná počas technologického spracovania [43].

7.2.1 Prezrážanie DNA

S cieľom získať DNA o vyššej koncentrácii a väčšej čistote boli vzorky prezrážané etanolom. Jednotlivé paralelné vzorky DNA izolované z toho istého rastlinného materiálu boli spojené do jednej Eppendorfovej skúmavky a podľa postupu kapitoly 5.4 boli použité na ďalšiu analýzu. Koncentrácia DNA bola stanovená spektrofotometricky meraním absorbčného spektra v rozmedzí vlnových dĺžok 220–340 nm. Výsledky nameraných hodnôt uvádza Tabuľka 10. DNA bola zakoncentrovaná rôzne v závislosti od druhu papriky. Najviac sa podarilo zakoncentrovať DNA izolovanú zo žitavskej papriky sladkej na koncentráciu 121,3 $ng \cdot \mu l^{-1}$ a DNA izolovanú z lusku papriky červenej sa nepodarilo zakoncentrovať, koncentrácia zostala 17,5 $ng \cdot \mu l^{-1}$.

Vplyv prezrážania DNA na čistotu pôvodne izolovanej DNA nebol preukázaný. Ako je ukázané na absorpčnom spektre (Obrázok11), prezrážaná DNA zostala znečistená polyfenolickými látkami a proteínami. Hodnota pomeru A_{260nm}/A_{280nm} (1,42 – 1,70) je o málo vyššia ako u pôvodných vzoriek, čím bola prezrážaná DNA aspoň z časti zbavená proteínov. Za účelom odstránenia kontaminantov (sfarbenie, polyfenoly, viskozita) izolovanej DNA zo sušeného čierneho korenia bolo zopakované prezrážanie etanolom alebo izopropanolom aj inými autormi. Výsledkom bolo, že kontaminanty neboli odstránené a dokonca nepriaznivo ovplyvnili výťažok a kvalitu DNA. Preto použili pre prezrážanie polyetylén glykol, čím dosiahli pomerne čistú DNA zabavenú proteínov a polysacharidov [42].

7.2.2 Gélová elektroforéza DNA

Zo snímky gélovej elektroforézy DNA izolovanej magnetickými časticami P(HEMA-*co*-GMA) a prezrážanej etanolom (Obrázok 12) nie je pre beh č. 4 (paprika zelená, lusk), 5 (paprika červená, lusk) a 7 (paprika sladká, mletá) zreteľná prítomnosť rastlinnej DNA. Pre beh č. 6 (paprika štipľavá, mletá) a 8 (žitavská paprika sladká, mletá) je viditeľná len degradovaná DNA (šmuha). Dôvodom neprítomnosti nukleovej kyseliny mohlo byť malé množstvo DNA, ktoré bolo nanesená na gél, ako tiež vysoký stupeň degradácie na veľmi malé fragmenty DNA. Degradácia bola hlavne spôsobená spracovaním rastlinného materiálu (sušenie a mletie), homogenizácoiu a izolovaním DNA ako aj inhibítormi PCR ako sú DNA endonukleázy. Potvrdil sa vplyv degradácie DNA na množstvo amplifikovanej DNA. V práci [42] bolo publikované, že použitá extrakčná metóda má vplyv na integritu DNA. DNA izolovaná Doyle&Doyle [23] CTAB metódou bola viac degradovaná ako DNA izolovaná modifikovanou metódou, kedy boli vizualizované viditeľné pásy.

7.3 Izolácia rastlinnej DNA mikročasticami P(HEMA-*co*-GMA) po homogenizácii v sterilnej vode

DNA bola izolovaná z papriky sladkej, mletej, papriky štipľavej, mletej a žitavskej papriky sladkej, mletej kde sa predpokladá určitý stupeň rozrušenia buniek vplyvom spracovania (sušenie, mletie) a nemusela by byť potreba použitia lyzačného činidla. Koncentrácia DNA

bola stanovená spektrofotometricky meraním absorbčného spektra v rozmedzí vlnových dĺžok 220–340 nm. Výsledky spektrofotometrického stanovenia koncentrácie a absorbancie pri rôznych vlnových dĺžkach sú uvedené v Tabuľke 11. Absorpčné spektrum ukazuje Obrázok 13. Bola namiešaná separačná zmes s výslednou koncentráciou 8 a 16 % PEG 6 000, aby sa otestoval vplyv množstva polyetylén glykolu v separačnej zmesi na množstvo izolovanej DNA. DNA izolovaná separačnou zmesou 8% PEG 6 000 vykazovala málo vyššie výťažky (8,2 $ng \cdot \mu l^{-1}$ – 16,6 $ng \cdot \mu l^{-1}$) oproti 16% PEG 6 000 (8,0 $ng \cdot \mu l^{-1}$-13,9 $ng \cdot \mu l^{-1}$), avšak porovnaním s metódou izolácie DNA s prídavkom lyzačného roztoku CTAB sú koncentrácie izolovanej DNA po homogenizácii v sterilnej vode nižšie. Navyše tieto koncentrácie mohli byť nadhodnotené bakteriálnou DNA, pretože neboli detegované špecifické produkty PCR. Z čoho sa dá vyvodiť záver, že pre izoláciu DNA z korenia je nutné použiť lyzačný roztok s CTAB. Z publikovaných výsledkov vyplýva, že pre izoláciu vysokomolekulárnej DNA je potreba použiť reagenty, ktoré aspoň z časti zabránia pôsobeniu inhibítorov na DNA a jej amplifikáciu. Pre izoláciu DNA z rastlinných tkanív sa často používa CTAB a NaCl. CTAB sa používa ako detergent, ktorý oddeľuje polysacharidy rovnako ako NaCl s koncentráciou vyššou ako 1,5 M odstraňuje polysacharidy. Avšak aj v prípade využitia CTAB pri izolácii, DNA nemusí byť v dostatočnej kvalite pre amplifikáciu v PCR. Preto sa často CTAB protokoly modifikujú podľa konkrétneho rastlinného pletiva použitého pre izoláciu. Pri extrakcii DNA zo sušenej práškovej kurkumy použitím originálneho CTAB protokolu (Doyle&Doyle [23]) nebola DNA získaná v kvalite pre PCR, ale modifikáciou protokulu bola extrahovaná dostatočne čistá vysokomolekulárna DNA [44].

Snímka absorpčného spektra ukazuje, že absorbancia pri 230 nm je menšia oproti absorbancii pri 260 nm pre papriku sladkú mletú a papriku štipľavú mletú. To ukazuje na menšie znečistenie nukleovej kyseliny fenolickými látkami v porovnaní s DNA izolovanou s použitím lyzačného roztoku CTAB. Paprika žitavská sladká obsahovala väčšie množstvo polyfenolov, pretože bola absorbancia pri 230 nm vyššia ako pri 260 nm. Použitím sterilnej vody ako roztoku pre extrakciu DNA bolo izolované menšie množstvo DNA a tým aj menšie množstvo polyfenolov, ktoré sa za použitia sterilnej vody neextrahovali do roztoku v takej veľkej miere ako za použitia roztoku CTAB. Z pomeru A_{260nm}/A_{280nm} sú hodnoty menšie ako 1,8 čo značí znečistenie bielkovinami.

7.3.1 Overenie kvality DNA s primérami F_18S a R_5,8S

Metódou PCR bola overená prítomnosť rastlinnej DNA s využitím špecifických primérov pre rastlinnú DNA*:* F_18S a R_5,8S. Veľkosť špecifického amplifikačného produktu PCR bola 700 bp. Vizualizácia produktov PCR je uvedená na Obrázku 14. DNA nebola izolovaná vo vhodnej kvalite pre amplifikáciu v PCR, neboli vizualizované amplikóny (700 bp) s výnimkou pozitívnej kontroly. Amplifikáciu DNA mohli inhibovať prítomné bielkoviny. DNA bola izolovaná len v nízkej koncentrácii a pravdepodobne bolo množstvo izolovanej DNA nadhodnotené bakteriálnou DNA. Do úvahy treba brať aj výrazný vplyv degradácie DNA. Homogenáty teda musia byť pripravené s lyzačným roztokom CTAB.

Overenie kvality DNA s primérami F_18S a R_5,8S izolovanej zo žitavskej papriky nie je ukázané, ale bolo otestované a výsledok bol rovnaký ako u ostatných korenín.

Keďže neboli vizualizované produkty PCR na géle (bendy v jednotlivých behoch) vynikli šmuhy. Tieto šmuhy boli vysvetlené kontaminovanými (zlej kvality, zle prečistenými) primérami buď už od výrobcu alebo ich dlhodobým skladovaním a opätovným zmrazovaním, rozmrazovaním a používaním. Následne pôsobením ďalších faktorov, ktoré vplývajú na citlivosť PCR (napr. už len čistota použitého plastového materiálu) sa na géle objavovali šmuhy s bendami, iba šmuhy, bendy v negatívnej kontrole alebo nešpecifické produkty rôznej veľkosti. Ukážka takéhoto gélu je uvedená v prílohe Obrázok 47. S použitím koncentrovaných primérov 100 pmol·μl^{-1} nebola DNA amplifikovaná zatiaľ čo s primérami o koncentrácii 10 pmol·μl^{-1} bola amplifikácia úspešná, nezávisle na použití 5 U·μl^{-1} alebo 1 U·μl^{-1} polymerázy. Pre vyvrátenie falošne pozitívnych výsledkov sa robí negatívna kontrola. Pokiaľ je výsledok pozitívny a na géle sa ukáže pás, dôvodom môže byť kontaminácia reakčných komponent [34]. Ďalším možným vysvetlením by mohol byť vplyv samotných magnetických častíc na izoláciu DNA. Napríklad sa mohla uvoľňovať polymérna matrica do DNA, pretože nie u všetkých produktov PCR sa vyskytovali šmuhy na géle (Obrázok 18), kde v pozitívnej a negatívnej kontrole sa šmuhy neobjavili. Fakt, že niektoré nanočastice môžu byť genotoxické alebo cytotoxické (majú vplyv na biologické systémy a tým na DNA) bol skúmaný viacerými autormi [29].

7.4 Testovanie magnetických nosičov

DNA bola izolovaná z troch potravinárskych produktov papriky: sušená paprika sladká, sušená paprika pikantná a žitavská paprika sladká. Celkom bolo testovaných päť rôzne modifikovaných nosičov: HPS B-M-NH_2, P(HEMA-*co*-GMA)NH_2, MPG, PGMA ox a PLL. Koncentrácia a čistota vzorky izolovanej DNA bola vyhodnotená spektrofotometricky meraním hodnôt absorbancií v rozmedzí vlnových dĺžok 220-340 nm. Výsledky spektrofotometrického stanovenia koncentrácie a absorbancie pri rôznych vlnových dĺžkach uvádza Tabuľka 12. Absorpčné spektrum ukazuje Obrázok 15Obrázok 15.

7.4.1 Paprika sladká, mletá

DNA bola izolovaná v rôznej koncentrácií od 30,8 ng·μl^{-1} – 131,5 ng·μl^{-1}. Zo získaných výsledkov je vidieť, že množstvo izolovanej DNA závisí od použitých magnetických častíc. Porovnaním výsledného množstva izolovanej DNA jednotlivých opakovaní bol zrejmý rozdiel izolovaného množstva DNA. Rozdiel mohol byť následkom nerovnomernej homogenizácie matrice kopistom ako aj približnou navážkou 0,1 g rastlinného materiálu. Najvhodnejší nosič, ktorým bolo izolované najväčšie množstvo DNA boli polylyzinové nanočastice PLL. Pre tieto magnetické častice bola koncentrácia izolovanej DNA 93,8 ng·μl^{-1} a 131,5 ng·μl^{-1}. Polylizinové nanočastice majú oproti ostatným mikročasticiam väčší špecifický povrch a tým množstvo izolovanej DNA môže byť väčšie. Čím menšia je veľkosť častíc, tým je väčšia miera hybridizácie medzi cieľovou molekulou

a časticou [27]. Ďalším faktorom, ktorý ovplyvnil (nadhodnotil) koncentráciu izolovanej DNA mohlo byť mierne červené sfarbenie vzorky DNA rozpustenej v TE pufre. Najmenšie množstvo bolo izolované použitím magnetického nosiča P(HEMA-*co*-GMA)NH_2, kde bola koncentrácia 30,8 ng·µl^{-1} a 37,5 ng·µl^{-1}. Príčinou mohla byť nedostatočná desorpcia nukleových kyselín, čím mohlo dôjsť k následným stratám DNA. U polymérných častíc je problém s ireverzibilnou adsorpciou molekúl DNA. Veľmi malá desorpcia bola zaznamenaná u aminosilánových magnetických nanočastíc [22].

Z hľadiska kvality izolovanej DNA bola táto DNA izolovaná približne rovnakej kvality nezávisle na použitom magnetickom nosiči. Absorpčné krivky prejavovali rovnaký charakter. Hodnota absorbancie pri vlnovej dĺžke 230 nm bola vyššia ako pri 260 nm, čo značí znečistenie izolovanej DNA polyfenolickými látkami. Taktiež z nameraných hodnôt pomeru A_{260nm}/A_{230nm} boli hodnoty približne zhodné okolo 0,6-0,9. Pomer absorbancií A_{260nm}/A_{280nm} sa pohyboval pod hodnotu 1,8, z čoho vyplýva, že izolovaná DNA bola znečistená proteínami. Hodnoty pomeru boli v rozmedzí 1,2-1,6. Táto hodnota je u magnetického nosiča PLL 1,6, čím sa najviac približuje k optimu 1,8, kedy sa DNA považuje bez prítomnosti bielkovín. Teda DNA izolovaná týmito magnetickými časticami bola najmenej znečistená bielkovinnými látkami. Z predchádzajúcich výsledkov je zrejmé, že kvalita izolovanej DNA je veľmi závislá na použitej extrakčnej metóde. Avšak kvalita ako aj kvantita je ovplyvnená následným izolačným postupom a purifikáciou. Je známe, že fyzikálno-chemické vlastnosti magnetických častíc, hlavne ich povrchová funkcionalizácia a náboj hrá významnú rolu v interakcii medzi časticami a cieľovými molekulami alebo zlúčeninami vzoriek [27].

7.4.1.1 Overenie kvality DNA s primérami F_18S a R_5,8S

Prítomnosť DNA bola dokázaná agarózovou gélovou elektroforézou, využitím primérov F_18S a R_5,8S, veľkosť špecifického amplifikačného produktu PCR bola 700 bp. Snímku gélu uvádza Obrázok 16. Všetkými testovanými nosičmi bola izolovaná DNA v kvalite pre PCR. DNA bola izolováná približne rovnakej kvality ale rozdielnej kvantity v závislosti od použitého nosiča a z výsledku gélovej elektroforézy je možné vidieť, že aj produkty PCR boli podobnej intenzity. Potvrdil sa väčší vplyv kvality ako kvantity izolovanej DNA na amplifikáciu v PCR. U vzoriek ktoré boli izolované magnetickým nosičom MPG, bolo potvrdené, že desiatkovým riedením sa riedia prítomné inhibítory.

Overenie kvality DNA bolo po 19-nástich dňoch skladovania pri teplote 5 °C opakované. Výsledok zobrazuje Obrázok 40. Bola použitá pôvodne izolovaná DNA rôzne modifikovanými magnetickými časticami. Neboli detegované špecifické amplikóny, okrem pozitívnej kontroly. Vysvetlením môže byť, že DNA bola časom ešte viac degradovaná na menšie fragmenty napríklad DNA endonukleázami, ktoré boli izolované spolu s DNA a nemohla byť preukázaná. Odporúča sa skladovať extrahovanú DNA ako aj rastlinné materiály na -18 °C až -80 °C, čím sa predíde nukleázovej aktivite [21].

Overenie kvality DNA v PCR izolovanej z papriky sladkej nanočasticami PLL nie je uvedená v tejto práci, ale bola testovaná a amplikóny 700 bp boli vizualizované.

7.4.2 Paprika štipľavá, mletá

DNA bola izolovaná v rôznej koncentrácií od 10,8 ng·μl^{-1} – 84,3 ng·μl^{-1}. Z výsledkov je vidieť, že množstvo izolovanej DNA bolo rôzne v závislosti od použitých magnetických častíc. Porovnaním výsledného množstva izolovanej DNA jednotlivých opakovaní je vidieť rozdiel. Rozdiel mohol byť zapríčinený nerovnomernou homogenizáciou matrice kopistom ako aj približnou navážkou 0,1 g rastlinného materiálu. Najvhodnejší nosič, ktorým bolo izolované najväčšie množstvo DNA boli komerčné mikročastice MPG. Pre tieto magnetické častice bola koncentrácia izolovanej DNA 68,7 ng·μl^{-1} a 84,3 ng·μl^{-1}. Mikročastice magnetického porézneho skla sú porézne častice s pórami, do ktorých sa naviaže DNA a tým množstvo izolovanej DNA môže byť väčšie oproti neporéznym časticiam. Najmenšie množstvo bolo izolované použitím magnetického nosiča P(HEMA-*co*-GMA)NH_2, kde bola koncentrácia 10,8 ng·μl^{-1} a 15,9 ng·μl^{-1}. Väzba negatívne nabitej molekuly DNA na pozitívne nabitú magnetickú časticu (P(HEMA-*co*-GMA)NH_2) mohla byť príliš pevná, v dôsledku čoho nedochádzalo k dostatočnej desorpcií [22].

Z hľadiska kvality izolovanej DNA bola táto DNA izolovaná približne rovnakej kvality nezávisle na použitom magnetickom nosiči. Absorpčné krivky prejavovali rovnaký charakter. Hodnota absorbancie pri vlnovej dĺžke 230 nm bola vyššia ako pri 260 nm, čo značí znečistenie izolovanej DNA polyfenolickými látkami. Taktiež z nameraných hodnôt pomeru A_{260nm}/A_{230nm} boli hodnoty približne zhodné okolo 0,6-0,9. Pomer absorbancií A_{260nm}/A_{280nm} sa pohyboval pod hodnotu 1,8, z čoho vyplýva, že izolovaná DNA bola znečistená proteínami. Hodnoty pomeru boli v rozmedzí 1,3-1,5. Iným pracovníkom sa podarilo izolovať DNA zo 16 liečivých aromatických rastlín vysokej kvality. V priemere A_{260nm}/A_{280nm} bola 1,8 a A_{260nm}/A_{230nm} bola približne 2,0. Napriek tomu, že niektoré hodnoty pomeru absorbancie sa odkláňali, tak potenciálne inhibítory detegované týmto pomerom neovplyvnili použitie extrahovanej DNA v restrikčnej analýze [45].

7.4.2.1 Overenie kvality DNA s primérami F_18S a R_5,8S

Prítomnosť DNA bola dokázaná agarózovou gélovou elektroforézou, využitím primérov F_18S a R_5,8S, veľkosť špecifického amplikónu bola 700 bp. Snímku gélu uvádza Obrázok 18. Všetkými testovanými nosičmi bola izolovaná DNA v kvalite pre PCR. Podobné výsledky boli dosiahnuté aj inými autormi a to v tom, že izolovaná DNA nebola úplne čistá, čo však nemalo vplyv na následnú amplifikáciu alebo restrikčnú analýzu [45]. Produkty PCR boli rôznej intenzity (menej intenzívne produkty boli vizualizované väčšinou pre zriedené matrice DNA). DNA bola izolováná približne rovnakej kvality ale rozdielnej kvantity v závislosti od použitého nosiča a z výsledku gélovej elektroforézy je možné vidieť, že aj produkty PCR (0x riedené) boli podobnej intenzity. Intenzita produktov PCR bola zrovnateľná pre DNA izolovanú nosičom P(HEMA-*co*-GMA)NH_2 (množstvo izolovanej

DNA bolo najnižšie) a nosičom MPG (množstvo izolovanej DNA bolo najväčšie). Potvrdil sa väčší vplyv kvality ako kvantity izolovanej DNA na amplifikáciu v PCR.

7.4.2.2 Overenie kvality DNA s primérami F_26S a R_26S

Prítomnosť DNA bola dokázaná agarózovou gélovou elektroforézou, využitím primérov F_26S a R_26S, veľkosť špecifického amplikónu bola 220 bp. Snímku gélu uvádza Obrázok 19. Všetkými testovanými nosičmi bola izolovaná DNA v kvalite pre PCR vždy aspoň z neriedenej alebo 10x riedenej matrice DNA. Detegované produkty PCR boli rôznej intenzity. Dalo by sa predpokladať, keďže bola izolovaná DNA degradovaná, že vzorky DNA budú obsahovať viac kratších fragmentov DNA (viac úsekov o veľkosti 220 bp) a amplifikácia DNA bude úspešná a výnosnejšia, keďže pre technologicky spracované matrice je odporúčaná veľkosť amplikónov 200bp [32], čo však nebolo potvrdené. Dôvodom pravdepodobne mohla byť kontaminácia primérov, pretože aj amplikón pozitívnej kontroly bol veľmi slabej intenzity.

7.4.3 Žitavská paprika sladká, mletá

Zloženie žitavskej papriky je paprika sladká mletá. Tento výrobok je slovenským výrobkom oceneným značkou kvality EÚ "Chránené označenie pôvodu". Má viac ako 100-ročnú tradíciu pestovania a spracovania koreninovej papriky v Podunajskej nížine. Jedinečnosť spočíva v tradičnom pestovaní, spracovaní a v typickej ničím nenapodobiteľnej oranžovo-červenej farby, ktorú paprika získava v poslednej fáze mletia na tzv. vyfarbovacom kameni.

Kvantita a kvalita izolovanej DNA bola veľmi podobná DNA z papriky štipľavej, mletej. DNA bola izolovaná v rôznej koncentrácií od 9,1 $ng \cdot \mu l^{-1}$ – 63,3 $ng \cdot \mu l^{-1}$. Z výsledkov bolo opäť vidieť, že množstvo izolovanej DNA bolo rôzne v závislosti od použitých magnetických častíc. Porovnaním výsledného množstva izolovanej DNA jednotlivých opakovaní bolo vidieť rozdiel. Rozdiel mohol byť zapríčinený nerovnomernou homogenizáciou matrice kopistom ako aj približnou navážkou 0,1 g rastlinného materiálu. Najvhodnejší nosič, ktorým bolo izolované najväčšie množstvo DNA boli komerčné mikročastice MPG. Pre tieto magnetické častice bola koncentrácia izolovanej DNA 60,6 $ng \cdot \mu l^{-1}$ a 63,3 $ng \cdot \mu l^{-1}$. Mikročastice magnetického porézneho skla sú porézne častice s pórami, do ktorých sa naviaže DNA a tým množstvo izolovanej DNA môže byť väčšie oproti neporéznym časticiam. Najmenšie množstvo bolo izolované použitím magnetického nosiča P(HEMA-*co*-GMA)NH_2, kde bola koncentrácia 9,1 $ng \cdot \mu l^{-1}$ a 15,6 $ng \cdot \mu l^{-1}$. K ztratám DNA mohlo dochádzať následkom príliš pevnej väzby negatívne nabitej molekuly DNA na pozitívne nabitú magnetickú časticu (P(HEMA-*co*-GMA)NH_2), v dôsledku čoho nedochádzalo k dostatočnej desorpcií [22].

Z hľadiska kvality izolovanej DNA bola táto DNA izolovaná približne rovnakej kvality nezávisle na použitom magnetickom nosiči. Absorpčné krivky prejavovali rovnaký charakter. Hodnota absorbancie pri vlnovej dĺžke 230 nm bola vyššia ako pri 260 nm, čo značí

znečistenie izolovanej DNA polyfenolickými látkami. Taktiež z nameraných hodnôt pomeru A_{260nm}/A_{230nm} boli hodnoty približne zhodné okolo 0,6-0,9. Pomer absorbancií A_{260nm}/A_{280nm} sa pohyboval pod hodnotu 1,8, z čoho vyplýva, že izolovaná DNA bola znečistená proteínami. Hodnoty pomeru sú v rozmedzí 1,3-1,6. Extrakciou DNA zo sušenej, údenej papriky, ktorá má tiež značku "chránené označenie pôvodu" sa zaoberali aj iný pracovníci. Úspešne izolovali DNA upraveným CTAB protokolom z viacerých druhov sušenej papriky pre účely analýzy autenticity takéhoto výrobku [13].

7.4.3.1 Overenie kvality DNA s primérami F_18S a R_5,8S

Prítomnosť DNA bola dokázaná agarózovou gélovou elektroforézou, využitím primérov F_18S a R_5,8S, veľkosť špecifického amplikónu bola 700 bp. Snímku gélu uvádza Obrázok 21. Všetkými testovanými nosičmi bola izolovaná DNA v kvalite pre PCR a produkty PCR boli rôznej intenzity (menej intenzívne produkty boli vizualizované väčšinou pre zriedené matrice DNA). V tomto prípade sa amplifikovala DNA izolovaná vo väčšom množstve lepšie oproti DNA s nižšou koncentráciou DNA v PCR zmesi. Najintenzívnejšie produkty PCR boli detegované pre DNA izolovanú nosičom MPG behy 5,6 (množstvo DNA v PCR zmesi bolo najvyššie). Najmenej intenzívne produkty PCR boli detegované pre DNA izolovanú mikročasticami P(HEMA-*co*-GMA)NH_2 behy 3,4 (množstvo DNA v PCR zmesi bolo najnižšie). Napriek tomu, že kvalita izolovaných DNA týmito časticami bola podobná. Podobné výsledky boli dosiahnuté aj inými autormi. DNA izolovaná z *N. tabacum* magnetickými časticami bola po amplifikácii rôznej intenzity v závislosti na počiatočnej koncentrácii DNA [46].

7.4.3.2 Overenie kvality DNA s primérami F_26S a R_26S

Prítomnosť DNA bola dokázaná agarózovou gélovou elektroforézou, využitím primérov F_26S a R_26S, veľkosť špecifického amplikónu bola 220 bp. Snímku gélu Obrázok 22. Izolovaná DNA bola vhodná pre amplifikáciu PCR keď bola izolovaná nosičom PLL, MPG a PGMA ox na rozdiel od nosičov HPS B-M-NH_2 a P(HEMA-*co*-GMA)NH_2. Dalo by sa predpokladať, keďže je izolovaná DNA degradovaná, že vzorky DNA budú obsahovať viac kratších fragmentov DNA (viac úsekov o veľkosti 220 bp) a amplifikácia DNA bude úspešná a výnosnejšia, čo však nebolo potvrdené. Dôvodom bola pravdepodobne opäť kontaminácia primérov, pretože aj amplikón pozitívnej kontroly bol slabej intenzity. DNA izolovaná vo väčšom množstve sa amplifikovala lepšie oproti DNA s nižšou koncentráciou DNA v PCR zmesi. Najintenzívnejšie produkty PCR boli detegované pre DNA izolovanú nosičom MPG behy 5,6 (množstvo DNA v PCR zmesi bolo najvyššie). Produkty PCR neboli detegované pre DNA izolovanú mikročasticami P(HEMA-*co*-GMA)NH_2 behy 3,4 (množstvo DNA v PCR zmesi bolo najnižšie). Napriek tomu, že kvalita izolovaných DNA týmito časticami bola podobná. PCR produkty 220 bp rôznej intenzity boli detegované po amplifikácii DNA z rôznych rastlinných pletív aj v tejto práci [46].

7.5 Overenie intaktnosti DNA po prezrážaní etanolom

S cieľom získať DNA o vyššej koncentrácii boli vzorky prezrážané etanolom a zakoncentrované. Intaktnosť DNA bola overená gélovou elektroforézou na agaróze. Jednotlivé vzorky DNA izolované z tej istej matrice rôznymi magnetickými časticami boli spojené do jednej Eppendorfovej skúmavky a zakoncentrované.

7.5.1 Prezrážanie DNA

Koncentrácia DNA bola stanovená spektrofotometricky meraním absorbčného spektra v rozmedzí vlnových dĺžok 220–340 nm. Výsledky nameraných hodnôt uvádza Tabuľka 15. DNA bola zakoncentrovaná rôzne v závislosti od vzorky matrice v koncentrácii od 339 $ng \cdot \mu l^{-1}$ – 523 $ng \cdot \mu l^{-1}$. Najviac sa podarilo zakoncentrovať DNA izolovanú z papriky sladkej, mletej na koncentráciu 523 $ng \cdot \mu l^{-1}$.

Ako je ukázané na absorpčnom spektre (Obrázok 23), prezrážaná DNA bola znečistená polyfenolickými látkami a proteínami. Prezrážanie etanolom nemalo veľký vplyv na kvalitu a čistotu izolovanej DNA. Hodnota pomeru A_{260nm}/A_{280nm} (1,50 – 1,64) bola o málo vyššia ako u pôvodných vzoriek, čím bola prezrážaná DNA aspoň z časti zbavená proteínov. Bolo publikované, že zrážanie DNA vzoriek s polyetylén glykolom (PEG 8000) bola získaná vysoko prečistená homogénna DNA zbavená proteínov a polysacharidov. DNA bola izolovaná zo sušenej a pomletej kurkumy [44].

7.5.2 Gélová elektroforéza DNA

Zo snímky gélovej elektroforézy DNA izolovanej rôzne modifikovanými magnetickými časticami a prezrážanej etanolom (Obrázok 24) bola detegovaná DNA v degradovanej forme (šmuha) pre všetky druhy korenín. Podľa DNA veľkostného štandardu najmenšie fragmenty boli o veľkosti približne 200 bp. Degradácia bola hlavne spôsobená spracovaním rastlinného materiálu (sušenie a mletie), homogenizácoiu a izolovaním DNA ako aj inhibítormi PCR ako sú DNA endonukleázy. V práci [44] bolo opäť potvrdené, že použitá extrakčná metóda má vplyv na integritu DNA. DNA izolovaná Doyle&Doyle [23] CTAB metódou dávala na géle šmuhy, zatiaľ čo DNA izolovaná modifikovanou metódou, dávala nápadné bendy vysokomolekulárnej DNA okolo 22 000 bp.

7.6 Porovnanie magnetických nosičov

Magnetické častice HPS B-M-NH_2, P(HEMA-*co*-GMA)NH_2, MPG, PGMA ox, PLL boli vyhodnotené z hľadiska množstva, kvality a amplifikovateľnosti izolovanej DNA pre každý druh korenia (mletej papriky).

7.6.1 Množstvo izolovanej DNA

Najväčšie množstvo DNA bolo izolované z papriky sladkej, mletej polylyzinovými nanočasticami PLL. Ako je uvedené v kopitole 7.4.1 polylyzinové nanočastice majú váčší špecifický povrch oproti ostatným mikročasticiam a koncentrácia izolovanej DNA mohla byť vyššia. Značná pozornosť je venovaná aj neporéznym nanočasticiam vďaka ich extrémne malej veľkosti s veľkým špecifivkým povrchom k ich objemu a veľkej kapacite viazať viacej molekúl na ich povrch [30].Pre ostatné druhy korenín (paprika štipľavá a žitavská paprika) najvyššia koncentrácia DNA bola zistená pre komerčné mikročastice MPG. Tieto častice majú poréznu štruktúru, preto sa na častice mohlo naviazať viac DNA oproti neporéznym nosičom. Najmenšia koncentrácia izolovanej DNA bola zistená pre mikročastice P(HEMA-*co*-GMA)NH_2 zo všetkých druhov použitých koreninových výrobkov. Príčinou môže byť desorpcia nukleových kyselín. U polymérných častíc je problém s ireverzibilnou adsorpciou molekúl DNA. Veľmi malá desorpcia bola zaznamenaná u aminosilánových magnetických nanočastíc [22]. Avšak inými autormi, ktorí testovali modifikované amino magnetické nanočastice pokryté oxidom kremičitým, bolo zistené, že so zvyšujúcou sa koncentráciou fosfátového pufru z 0 na 1 M, desorpčný pomer narástol z 32,6 % na 96,1 % [31]. Porovnaním s magnetickými časticami HPS B-M-NH_2, ktoré sú tiež pokryté NH_2 skupinami vykazovali menšie výťažky. Štruktúra HPS B-M-NH_2 častíc je porézna a výťažky izolovanej DNA mohli byť väčšie. Z toho vyplýva, že štruktúra a chemické zloženie častíc P(HEMA-*co*-GMA)NH_2 nebolo vhodné pre izoláciu DNA z korenia.

7.6.2 Kvalita DNA

Z pomeru hodnoty absorbancie A_{260nm}/A_{280nm} a A_{260nm}/A_{230nm} bola stanovená čistota izolovanej DNA. Ak je pomer A_{260nm}/A_{280nm} menší ako 1,8 - 2,0 je DNA znečistená proteínami. Ak je pomer A_{260nm}/A_{230nm} menší ako 2,0 spolu s DNA boli izolované polyfenolické látky [34].

7.6.2.1 Znečistenie proteínami

DNA izolovaná polylyzinovými nanočasticami PLL bola najmenej znečistená proteínami, pretože hodnota pomeru A_{260nm}/A_{280nm} pre DNA izolovanú týmito časticami sa najviac blížila k hodnote 1,8. Pravdepodobne následkom veľkosti a chemického zloženia týchto nosičov, najmenej interagovali s prítomnými bielkovinami v homogenáte, tým boli najvhodnejšie pre izoláciu DNA z korenín (papriky mletej) z hľadiska obsahu proteínov. Pre mikročastice PGMA ox bola hodnota pomeru najnižšia pre všetky druhy výrobkov. Izolovaná DNA bola najviac znečistená bielkovinami. Pokrytie týchto nosičov –COOH skupinami a veľkosť častíc bolo najmenej vhodné pre izoláciu DNA z výrobkov z hľadiska prítomnosti bielkovín. Bolo publikované, že malé množstvo proteínov sa môže adsorbovať na povrch hydrofóbnych polymérnych častíc napríklad na častice z polystyrénu počas purifikácie nukleových kyselín. Avšak k redukcii adsorpcie proteínov sa práve používajú hydrofilné častice P(HEMA) a PGMA [22].

7.6.2.2 Znečistenie polyfenolickými látkami

A_{260nm}/A_{230nm} sa značne líšila od optimálnej hodnoty 2,0, čo značí veľké znečistenie polyfenolickými látkami. Pre mikročastice PGMA ox u papriky štipľavej a žitavskej papriky bola hodnota pomeru najvyššia. DNA izolovaná týmto nosičom bola najmenej znečistená polyfenolami. V tomto prípade veľkosť a chemické zloženie týchto magnetických častíc bola najviac vyhovujúca pre izoláciu DNA z hľadiska prítomnosti polyfenolov. Pre papriku sladkú bolo najmenej fenolických látok izolovaných za použitia častíc PLL. Pre mikročastice P(HEMA-*co*-GMA)NH_2 bola hodnota pomeru najnižšia pre všetky druhy korenín. Izolovaná DNA bola najviac znečistená polyfenolami. Veľkosť a chemické zloženie (pokrytie $–NH_2$ skupinami) bolo najmenej vhodné pre izoláciu DNA z výrobkov z hľadiska prítomnosti polyfenolických látok. Uvádza sa, že povrchová funkcionalizácia a náboj majú veľký vplyv v interakcii medzi časticami a cieľovými molekulami alebo zlúčeninami vzoriek [27].

7.6.3 Amplifikácia DNA v PCR

Kvalita izolovanej DNA bola overená aj v PCR s následnou detekciou amplikónov gélovou elektroforézou na agaróze. Magnetické častice boli vyhodnotené z hľadiska vizualizácie produktov PCR 700 bp a 220 bp agarózovou gélovou elektroforézou.

7.6.3.1 Produkty PCR 700 bp

DNA izolovaná zo všetkých druhov mletých paprík s použitím každého magnetického nosiča bola v kvalite pre PCR. Pre každú vzorku DNA bol vizualizovaný amplikón na géle buď z neriedenej alebo aspoň 10x riedenej matrice DNA. Štruktúry s veľkosťou nanometrov sú veľmi dôležité v modernej (bio)technológii, pretože z molekulárneho hľadiska ukázali rozšírené chemické, fyzikálne a biologické vlastnosti. Napríklad hydrofilné silanizovené nanočastice funkcionalizované etyléndiamínom majú veľkú výhodu, že môžu reagovať s biologickými časticami ako sú proteíny, enzýmy, jednotlivé aminokyseliny alebo DNA [47]. Produkty PCR boli rôznej intenzity, čo značí prítomnosť potenciálnych inhibítorov PCR (proteíny a polyfenoly), ktoré boli izolované spolu s DNA a zhodnotené v predchádzajúcich kapitolách, že mali vplyv na amplifikáciu DNA v PCR.

Overenie kvality DNA v PCR izolovanej z papriky sladkej časticami PLL nie je uvedené ale bolo overené a amplikóny 700 bp boli vizualizované a zahrnuté do hodnotenia.

7.6.3.2 Produkty PCR 220 bp

DNA izolovaná z papriky štipľavej, mletej s použitím každého magnetického nosiča bola v kvalite pre PCR. DNA izolovaná zo žitavskej papriky časticami P(HEMA-*co*-GMA)NH_2 a HPS B-M-NH_2 nedávala po amplifikácii produkty PCR detegované na géle ani po zriedení matrice DNA. V tomto prípade mohla mať vplyv na amplifikáciu kvalita izolovanej DNA. Časticami P(HEMA-*co*-GMA)NH_2 bola izolovaná DNA najviac znečistená polyfenolickými látkami zo všetkých korenín. Taktiež množstvo izolovanej DNA týmito časticami bolo

najmenšie porovnaním s ostatnými magnetickými časticami. Ďalším faktorom neúspešnej amplifikácie mohla byť samotná degradácia DNA, poprípade možná kontaminácia primérov. Podobné faktory ovplyvnili amplifikáciu DNA izolovanú časticami HPS B-M-NH_2. Pre imobilizáciu komplexných biomolekúl ako je dvojvláknová DNA a proteíny sú veľmi užitočné absorpčné techniky. Nekovalentné interakcie môžu byť tiež celkom silné, ale často majú za následok nešpecifické interakcie a nešpecifické signály. Tiež sa uvádza, že vysoká hustota reaktívnych skupín môže uprednostňovať vedľajšie reakcie, ktoré vedú k nešpecifickým väzbám [27].

Overenie kvality DNA v PCR izolovanej z papriky sladkej, mletej rôzne modifikovanými magnetickými časticami, kde veľkosť špecifického produktu PCR bola 220 bp nebola overená v tejto práci a nebola zahrnutá do hodnotenia.

7.7 Izolácia rastlinnej DNA z komplexných potravinových výrobkov

Pre izoláciu DNA z komplexných výrobkov boli vybrané magnetické mikročastice MPG, HPS B-M-NH_2 a nanočastice PLL. Ako matrice DNA boli použité potravinové výrobky gulášová polievka, harrisa, budapešťský krém a tvarôžková pomazánka pikant.

Zo spektrofotometrického stanovenia koncentrácie DNA bola koncentrácia izolovanej DNA rôzna v závislosti od výrobku a použitých magnetických častíc. Koncentrácia izolovanej DNA pre gulášovú polievku bola v rozmedzí 38,5 – 128 $ng \cdot \mu l^{-1}$, pre harissu 19,8 – 24,2 $ng \cdot \mu l^{-1}$, pre budapešťský krém 7,2 – 168 $ng \cdot \mu l^{-1}$ a pre tvarôžkovu pomazánku pikant 13,3 – 30,6 $ng \cdot \mu l^{-1}$ v závislosti na použitých časticiach. Každý použitý potravinový produkt bol inak spracovaný (rôzny stupeň degradácie DNA) a mal iné zloženie (Tabuľka 3), čo malo vplyv na množstvo izolovanej DNA. Pokiaľ boli súčasťou výrobku aj iné rastlinné zložky (nielen paprika) množstvo izolovanej DNA bolo nadhodnotené izolovanou DNA aj z týchto zložiek. V prípade tvarôžkovej pomazánky pikant, mohlo byť množstvo DNA nadhodnotené bakteriálnou DNA. Vplyv na množstvo izolovanej DNA (aj kvalitu) mohlo mať aj zafarbenie roztoku DNA v TE pufre (gulášová polievka-bielo zakalený, harissa-oranžovo zakalený, budapešťský krém-bielo zakalený, tvarôžkova pomazánka-bez zákalu). Viacerým autorom sa podarilo izolovať DNA z technologicky spracovaných potravín alebo z komplexných výrobkov. Napríklad použitím modifikovaného CTAB protokolu sa podarilo izolovať DNA z medu v dobrej kvalite pre molekulárnu identifikáciu [48]. Avšak, nie vždy sa dá izolovať DNA v kvalite pre PCR. Napríklad CTAB protokolom a extrakčným kitom (The Nucleon Phytopure plant DNA extraction kit) sa nepodarilo izolovať DNA zo spracovaných kávových zŕn, ktorá by bola vhodná pre amplifikáciu. Zatiaľ čo iný kit (ClonTech NucleoSpin Plant Kit) bol vhodný pre izoláciu DNA v kvalite pre PCR [49].

Z hľadiska kvality izolovanej DNA bola táto DNA izolovaná rôznej kvality v závislosti na použitom magnetickom nosiči a komplexnom výrobku. Absorpčné krivky prejavovali rozdielny charakter. Hodnota absorbancie pri vlnovej dĺžke 230 nm bola vyššia ako pri 260 nm, čo značí znečistenie izolovanej DNA polyfenolickými látkami. Taktiež z nameraných

hodnôt pomeru A_{260nm}/A_{230nm} boli hodnoty odlišné v rozmedzí 0,2-0,8. Pomer absorbancií A_{260nm}/A_{280nm} sa pohyboval pod hodnotu 1,8, z čoho vyplýva, že izolovaná DNA bola znečistená proteínami. Hodnoty pomeru sú v rozmedzí 0,8-1,6. DNA izolovaná v najlepšej kvalite bola z gulášovej polievky. Hodnota A_{260nm}/A_{280nm} bola 1,56 – 1,64 a A_{260nm}/A_{230nm} bola 0,66 – 0,76. DNA izolovaná v najhoršej kvalite bola z výrobku budapešťský krém. Hodnota A_{260nm}/A_{280nm} bola 0,88 – 1,13 a A_{260nm}/A_{230nm} bola 0,15 – 0,25. Kvalita izolovanej DNA z konkrétneho výrobku vo veľkej miere závisela na zložení výrobku.

7.7.1 Overenie kvality DNA s primérami F_18S a R_5,8S

Prítomnosť DNA bola dokázaná agarózovou gélovou elektroforézou, využitím primérov F_18S a R_5,8S, veľkosť špecifického amplifikačného produktu PCR bola 700 bp. Snímku gélu uvádza Obrázok 31. DNA izolovaná z výrobku gulášova polievka všetkými testovanými nosičmi sa amplifikovala v PCR. Izolovaná DNA z ostatných výrobkov nebola v kvalite vhodnej pre amplifikáciu v PCR s primérami F_18S a R_5,8S. Faktorov, ktoré ovplyvnili amplifikáciu DNA v PCR mohlo byť viacero. Spracovanie produktov (degradácia DNA), zloženie výrobku, DNA izolovaná v nízkej kvalite, sfarbenie roztoku DNA v TE pufre, koncentrácia nadhodnotená bakteriálnou DNA. Podobné výsledky boli získané aj inými autormi. Izolovať DNA v kvalite vhodnej pre PCR sa nepodarilo zo spracovaných výrobkov ako 85% čokoláda alebo sterilizovaná červená repa [46].

Z produktu gulášová polievka spracovaný sušením (dehydratáciou) a mletím bola izolovaná DNA v lepšej kvalite oproti ostatným výrobkom a degradácia DNA nemala veľký vplyv na amplifikáciu. Z produktu harissa, ktorý bol spracovaný tepelne a chemicky konzervovaný, nebola DNA v kvalite pre PCR. Hlavným faktorom môže byť práve tepelné spracovanie produktu. U výrobku budapešťského krému mohol byť hlavný faktor neúspešnej amplifikácie zloženie produktu, ktoré zapríčinilo aj nízku kvalitu izolovanej DNA. Hlavne to mohla byť zložka ako majonéza (olejová matrica), z prostredia ktorej je obtiažne izolovať DNA vhodnej kvality. U výrobku tvarôžková pomazánka pikant mohlo mať vplyv na amplifikáciu zloženie, ktoré ovplyvnilo kvalitu a množstvo izolovanej DNA, mohlo byť nadhodnotené bakteriálnou DNA. Hlavná zložka pomazánky bol tvaroh (bielkovinová matrica).

7.8 Testovanie prítomnosti bakteriálnej DNA v korení

Pre izoláciu bakteriálnej DNA z korenín boli vybrané magnetické mikročastice MPG. Ako matrice DNA boli použité paprika sladká, mletá; paprika štipľavá, mletá a žitavská paprika, sladká.

Koncentrácia a čistota vzorky DNA bola stanovená spektrofotometricky, vyhodnotením jednotlivých nameraných hodnôt absorbancií v rozmedzí vlnových dĺžok 220–320 nm. Bakteriálna DNA bola izolovaná zo všetkých hrubých lyzátov bakteriálnych buniek v korení mletých paprík v rôznej koncentrácii. Koncentrácia bakteriálnej DNA pre papriku sladkú mletú bola 63,4 $ng \cdot \mu l^{-1}$, pre papriku pikantnú mletú 4,5 $ng \cdot \mu l^{-1}$ a pre žitavskú papriku

sladkú, mletú 11,4 $ng \cdot \mu l^{-1}$, čo sa dá považovať za dostatočné množstvo pre následnú PCR. Bakteriálna kontaminácia korenia bola dokázaná aj inými autormi [50]. Koncentrácia DNA papriky sladkej mohla byť nadhodnotená mierne červeným zafarbením roztoku DNA v TE pufre. DNA bola degradovaná spracovaním korenia, čím sa redukuje citlivosť PCR.

Z hľadiska kvality izolovanej DNA bola táto DNA izolovaná rôznej čistoty. Absorpčné spektrum papriky sladkej malo rozdielny charakter v porovnaní s ostatnými mletými paprikami. Hodnota absorbancie pri vlnovej dĺžke 230 nm bola vyššia ako pri 260 nm, čo značí znečistenie izolovanej DNA polyfenolickými látkami (farbivami). Taktiež z nameraných hodnôt pomeru A_{260nm}/A_{230nm} boli hodnoty odlišné 0,5-1,2. DNA izolovaná z papriky sladkej obsahovala výrazne viac polyfenolických látok (hodnota pomeru bola 0,47), čo bolo zapríčinené zafarbením roztoku DNA v TE pufre, keďže farbivá patria medzi fenolické látky. Pomer absorbancií A_{260nm}/A_{280nm} sa pohyboval pod hodnotu 1,8, z čoho vyplýva, že izolovaná DNA bola znečistená proteínami. Hodnoty pomeru sú v rozmedzí 1,2-1,4.

7.8.1 Overenie kvality DNA s primérami F_eub a R_eub

Prítomnosť bakteriálnej DNA bola dokázaná agarózovou gélovou elektroforézou, využitím špecifických primérov pre doménu *Bacteria* F_eub a R_eub, veľkosť produktu PCR bola 466 bp. Snímku gélu uvádza Obrázok 33. Bola preukázaná prítomnosť bakteriálnej DNA vo všetkých druhoch paprikových korení. Bolo publikované, že paprika môže byť zdrojom mikrobiálnej kontaminácie v dôsledku zlých hygienických podmienok pri pestovaní, zbere, spracovaní a skladovaní [13]. PCR produkty boli rôznej intenzity v závislosti na čistote izolovanej DNA. Najmenej intenzívne produkty boli pre DNA izolovanú z papriky sladkej, ktorá obsahovala najviac polyfenolov, ktoré ovplyvnili citlivosť PCR, pretože množstvo izolovanej DNA z tejto papriky bolo najväčšie. Degradácia DNA mohla byť ďalším faktorom, ktorý ovplyvnil citlivosť PCR.

8 ZÁVER

Bolo dokázané, že použitou mikrometódou je možné izolovať DNA z vybraných korenín (mletých paprík) odpovedajúcej čistoty, ktorá je vhodná pre genetickú analýzu pomocou PCR. Protokol zahŕňa nasledovné kroky. Približne 0,1 g analyzovaného materiálu sa naváži do 1,5 ml Eppendorfových skúmaviek a za stáleho chladenia vo vymrazenom kovovom stojane sa pridá 500 µl lyzačného pufru s CTAB a 1 µl β-merkaptoetanolu. Následne sa urobí homogenizácia za chladu pomocou kopistu a dobre zhomogenizované vzorky sa inkubujú pri 60 °C, 30 minút v termostate. Po inkubácii sa vzorky zcentrifugujú pri 14 500 ot·min^{-1} po dobu 10 minút a 100 µl získaného supernatantu sa použije k izolácii DNA magnetickými časticami s výslednou koncentráciou 16 % PEG 6 000 v separačnej zmesi.

Boli zistené rozdiely medzi magnetickými nosičmi, ktoré boli testované pre izoláciu DNA z korenia. Na základe zhodnotenia magnetických častíc z hľadiska množstva kvality a amplifikovateľnosti izolovanej DNA z mletých paprík boli vybrané najvhodnejšie častice pre izoláciu DNA z komplexných výrobkov obsahujúcich mletú papriku. Magnetické častice MPG a PLL boli zvolené, pretože bolo nimi izolované najväčšie množstvo DNA a v kvalite vhodnej pre PCR. Pre porovnanie ako tretie nosiče boli zvolené mikročastice HPS B-M-NH_2 z dôvodu, že ich štruktúra je porézna ako u nosičov MPG.

Vplyv inhibítorov, ktoré boli izolované spolu s nukleovou kyselinou z korenia a degradácia DNA mali vplyv na jej amplifikáciu v PCR (produkty PCR boli rôznej intenzity a taktiež bol potvrdený efekt zriedenia).

Izolovaná DNA z komplexných výrobkov nebola v kvalite vhodnej pre PCR s výnimkou DNA izolovanej z výrobku Gulášová polievka. Kombinácia priamej homogenizácie s magnetickými časticami poskytla rýchlu a jednoduchú izoláciu DNA ale v nízkej kvalite nevhodnej pre analýzu PCR.

9 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

[1] CASAZZA, A., et al. Certifying the feed to guarantee the quality of traditional food: An easy way to trace plant species in complex mixtures. *Food Chemistry* [online]. 2011, 124(2), 685-691 [cit. 2017-04-09]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.06.073. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610007843

[2] BHAU, B., et al. Development of an effective and efficient DNA isolation method for Cinnamomum species. *Food Chemistry* [online]. 2015, 188, 264-270 [cit. 2017-04-09]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.05.004. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615007177

[3] DE MEDICI, D., 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. 2017-04-06]. DOI: 10.1007/s12161-014-9915-6. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s12161-014-9915-6

[4] HERNÁNDEZ-HIERRO, J.M., et al. Potential of near infrared spectroscopy for the analysis of mycotoxins applied to naturally contaminated red paprika found in the Spanish market. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2008, 622(1-2), 189-194 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1016/j.aca.2008.05.049. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000326700800994X

[5] COSTA, J., et al. Tracing tree nut allergens in chocolate: A comparison of DNA extraction protocols. *Food Chemistry* [online]. 2015, 187, 469-476 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.04.073. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615006196

[6] MADESIS, P., et al. Advances of DNA-based methods for tracing the botanical origin of food products. *Food Research International* [online]. Elsevier Ltd, 1406, 60, 163-172 [cit. 2017-04-03]. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.10.042.

[7] DEMEKE, T., JENKINS, G. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2010, 396(6), 1977-1990 [cit. 2017-02-14]. DOI: 10.1007/s00216-009-3150-9. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s00216-009-3150-9

[8] ROSA, S., et al. Development and applicability of a ready-to-use PCR system for GMO screening. *Food Chemistry* [online]. 2016, 201, 110-119 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.01.007. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616300073

[9] FUNDED BY THE EUROPEAN COMMISSION - AGRO INDUSTRIAL RESEARCH, a [COORD. : MICHèLE LEES]. Food authenticity: issues and methodologies. *Nantes: Eurofins Scientific, 1999.*

[10] COSTA, J., et al. DNA extraction from plant food supplements: Influence of different pharmaceutical excipients. *Molecular and Cellular Probes* [online]. 2015, 29(6), 473-478 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1016/j.mcp.2015.06.002.
Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0890850815300153

[11] BRÜNING, P., et al. Marzipan: Polymerase Chain Reaction-Driven Methods for Authenticity Control. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]**.** 2011, 59(22), 11910-11917 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1021/jf202484a. Dostupné z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf202484a

[12] BALASUBRAMANIAN, S., PANIGRAHI, S. Solid-Phase Microextraction (SPME) Techniques for Quality Characterization of Food Products: A Review. *Food and Bioprocess Technology* [online]. 2011, 4(1), 1-26 [*cit. 2017-04-06]*. DOI: 10.1007/s11947-009-0299-3. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s11947-009-0299-3

[13] HERNÁNDEZ, A., et al. Efficiency of DNA Typing Methods for Detection of Smoked Paprika "Pimenton de la Vera**"** Adulteration Used in the Elaboration of Dry-Cured Iberian Pork Sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2010, 58(22), 11688-11694 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1021/jf102414q. Dostupné z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf102414q

[14] LUYKX, D., et al. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chemistry* [online]. 2008, 107(2), 897-911 [cit. 2017-04-09]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.09.038.
Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607009533

[15] CORRADO, G. Advances in DNA typing in the agro-food supply chain. *Trends in Food Science & Technology* [online]. Elsevier Ltd, 1606, 52, 80-89 [cit**.** 2017-04-03]. DOI: 10.1016/j.tifs.2016.04.003.

[16] O'KENNEDY, R., et al. Speedy, Small, Sensitive, and Specific—Reality or Myth for Future Analytical Methods. *Analytical Letters* [online]. 2010, 43(10-11), 1630-1648 [cit. 2017-04-07]. DOI: 10.1080/00032711003653940.
Dostupné z: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00032711003653940

[17] KATO, M., et al. Miniaturization of an analytical system using immobilized biomolecules for high-throughput screening. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2006, 384(1), 50-52 [cit. 2017-04-07**]**. DOI: 10.1007/s00216-005-0200-9. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s00216-005-0200-9

[18] WU, J., et al. Extraction, amplification and detection of DNA in microfluidic chip-based assays. *Microchimica Acta* [online]. *2014, 181(13-14*), 1611-1631 [cit. 2017-04-07]. DOI: 10.1007/s00604-013-1140-2. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s00604-013-1140-2

[19] LÓPEZ-LORENTE, A., et al. Analytical potential of hybrid nanoparticles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2011, 399(1), 43-54 [cit. 2017-04-07]. DOI: 10.1007/s00216-010-4110-0. Z: http://link.springer.com/10.1007/s00216-010-4110-0

[20] TAMARI, F., et al. A Comparison of DNA Extraction Methods using Petunia hybrida Tissues. *Journal of Biomolecular Techniques : JBT* [online]. 2013, , 13-2403-001- [cit. 2017-04-09]. DOI: 10.7171/jbt.13-2403-001.
Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3647704/

[21] VARMA, A., et al. Plant genomic DNA isolation: An art or a science. *Biotechnology Journal* [online]. 2007, 2(3), 386-392 [cit. 2017-04-07]. DOI: 10.1002/biot.200600195. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/biot.200600195

[22] RITTICH, B., ŠPANOVÁ, A. SPE and purification of DNA using magnetic particles. *Journal of Separation Science* [online]. 2013, 36(15), 2472-2485 [cit. 2017-04-04]. DOI: *10*.1002/jssc.201300331. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201300331

[23] DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissues. b.r., , 11-15.

[24] HA, L., et al. Comparative Evaluation of Six Extraction Methods for DNA Quantification and PCR Detection in Cocoa and Cocoa-Derived Products. *Food Biotechnology* [online]. 2015, 29(1), 1-19 [cit. 2017-04-08]. DOI: 10.1080/08905436.2014.996761.
Dostupné z: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08905436.2014.996761

[25] SCHRADER, C., et al. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2012, 113(5), 1014-1026 [cit. 2015-03-09]. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x

[26] JAPELAGHI, R., et al. Rapid and Efficient Isolation of High Quality Nucleic Acids from Plant Tissues Rich in Polyphenols and Polysaccharides. *Molecular Biotechnology* [online]. 2011, 49(2), 129-137 [cit. 2017-04-09]. DOI: 10.1007/s12033-011-9384-8. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s12033-011-9384-8

[27] RÖDIGER, S., et al. Nucleic acid detection based on the use of microbeads: a review. *Microchimica Acta* [online]. *2014, 181*(11-12), 1151-1168 [cit. 2017-04-05]. DOI: 10.1007/s00604-014-1243-4. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s00604-014-1243-4

[28] BRUCE, I. J., et al. Synthesis, characterisation and application of silica-magnetite nanocomposites. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* [online]. Elsevier B.V, 2004, 284, 145-160 [cit. 2017-04-04]. DOI: 10.1016/j.jmmm.2004.06.032.

[29] HWANG, D. W., et al. Gene Expression Profiles for Genotoxic Effects of Silica-Free and Silica-Coated Cobalt Ferrite Nanoparticles. *Journal of Nuclear Medicine* [online]. 2012, 53(1), 106-112 [cit. 2017-04-04]. DOI: 10.2967/jnumed.111.088443. Dostupné z: http://jnm.snmjournals.org/cgi/doi/10.2967/jnumed.111.088443

[30] SAHOO, S., et al. Adsorption behaviors of DNA by modified magnetic nanoparticles: Effect of spacer and salt. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2015, 482, 184-194 [cit. 2017-04-05]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2015.05.010.
Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775715004203

[31] SHAN, Z., et al. Promoting DNA loading on magnetic nanoparticles using a DNA condensation strategy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. Elsevier B.V, 2015, 125, 247-254 [cit. 2017-04-05]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.10.036.

[32] HANČÍROVÁ, Z., et al. Effects of technological treatment on DNA degradation in selected food matrices of plant origin. *Journal of Food* [online]. 2008, Vol. 47, issue 1, s. 23-28 [cit. 2017-04-04]. ISSN 13368672. Dostupné z: AGRIS (Food and Agriculture Organization of the United Nations)

[33] ŠMARDA, J. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd., 2. dotisk. Brno: Masarykova univerzita, 2010, 188 s. : il., tab.

[34] ŠPANOVÁ, A., RITTICH, B. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010, 86 s.

[35] BROWN, T. A. *Klonování genů a analýza DNA: úvod*. 1. české vyd. V Olomouci: Univerzita Palackého, 2007.

[36] GRYSON, N. 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. 2014-11-08]. DOI: 10.1007/s00216-009-3343-2.
Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s00216-009-3343-2

[37] HAARMAN, M., KNOL, J. Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal Lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2006, 72(4), 2359-2365 [cit. 2015-01-07]. DOI: 10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006.
Dostupné z: http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006

[38] YOONG L., KOVARIK, A., et al. Gene conversion of ribosomal DNA in Nicotiana tabacum is associated with undermethylated, decondensed and probably active gene units. *Chromosoma* [online]. 2000, 109(3), 161-172 [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1007/s004120050424. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s004120050424

[39] KOVARIK, A., et al. Rapid Concerted Evolution of Nuclear Ribosomal DNA in Two Tragopogon Allopolyploids of Recent and Recurrent Origin. *Genetics* [online]**.** Bethesda: Genetics Society of America, 2005, 169(2), 931-44 [cit. 2017-04-23].

[40] SAHU, S., et al. 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. 2017-04-12]. DOI: 10.5402/2012/205049. Dostupné z: http://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/205049/

[41] SHEPHERD, L., et al. Two micro-scale protocols for the isolation of DNA from polysaccharide-rich plant tissue. *Journal of Plant Research* [online]. 2011, 124(2), 311-314 [cit. 2017-04-09]. DOI: 10.1007/s10265-010-0379-5.
Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s10265-010-0379-5

[42] DHANYA, K., et al. Isolation and Amplification of Genomic DNA from Recalcitrant Dried Berries of Black Pepper *(*Piper nigrum L.)—A Medicinal Spice. *Molecular Biotechnology* [online]. 2007, 37(2), 165-168 [cit. 2017-04-10]. DOI: 10.1007/s12033-007-0044-y. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s12033-007-0044-y

[43] FOCKE, F., et al. DNA-Based Identification of Spices: DNA Isolation, Whole Genome Amplification, and Polymerase Chain Reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2011, 59(2), 513-520 [cit. 2017-04-10]. DOI: 10.1021/jf103702s. Dostupné z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf103702s

[44] REMYA, R., et al. Isolation and amplification of DNA from turmeric powder. *British food journal* [online]. 2004, 106(8), 673-678 [cit. 2017-04-11].

[45] VEGA V., et al. Isolation of high-quality DNA in 16 aromatic and medicinal Colombian species using silica-based extraction columns. *Agronomía Colombiana* [online]. Bogota: Universidad Nacional de Colombia, 2011, 29(3), 349-357 [cit. 2017-04-11].

[46] TROJÁNEK, Z. *Izolace DNA z rostlinných tkání pro použití v polymerázové řetězové reakci*. Brno: Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2013, 84 s. Vedúci diplomové práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.

[47] MAURICIO, M., et al. Synthesis of highly hydrophilic magnetic nanoparticles of Fe_3O_4 for potential use in biologic systems. *Colloids and surfaces* [online]. Elsevier B.V, 2013, 417, 224-229 [cit. 2017-04-12].

[48] JAIN, S., et al. 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. 2017-04-12]. DOI: 10.1590/S0101-20612013000400022.
Dostupnéz:http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612013000400022&lng=en&nrm=iso&tlng=en

[49] MARTELLOSSI, Ch., et al. DNA Extraction and Analysis from Processed Coffee Beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2005, 53(22), 8432-8436 [cit. 2017-04-12]. DOI: 10.1021/jf050776p.
Dostupné z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf050776p

[50] MCKEE, L.H. Microbial contamination of spices and herbs: A review. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 1995, 28(1), 1-11 [cit. 2017-04-09]. DOI: 10.1016/S0023-6438(95)80004-2.
Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643895800042

10 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

bp	páry báz
CE	kapilárna elektroforéza
CTAB	cetiltrimetylamonium bromid
dATP	2´-deoxyadenozín-5´-trifosfát
dCTP	2´-deoxycitidín-5´-trifosfát
dGTP	2´-deoxyguanozín-5´-trifosfát
Dn	priemer magnetickej častice
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	dvojvláknová deoxyribonukleová kyselina
dNTP	2´-deoxynukleozid-5´-trifosfát
dTTP	2´-deoxytimidín-5´-trifosfát
Dw	priemerná váha magnetickej mikročastice
EDTA	kyselina etyléndiamíntetraoctová
EÚ	Európska únia
PLL	oxid železa pokrytý poly(L-lysinom)
G+C	guanino-cytozinový pár báz
HACCAP	analýza rizika a stanovenie kritických kontrolných bodov
HPS B-M-NH_2	hypersieťovaný poly(styren-co-divinyl benzén)
HRM	analýza kriviek topenia produktov PCR s vysokým rozlíšením
MPG	magnetické porézne sklo
napr.	napríklad
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PDI	index polydisperzity
PEG	polyetylénglykol
PGMA	poly(glycidyl methakrylát)
P(HEMA)	poly(hydroxyetylmetakrylát)
P(HEMA-*co*-GMA)	poly(hydroxyetylmetakrylát-*co*-glycidylmetakrylát)
PLL	poly(L-lyzin)
pod.	podobne
RFLP	polymorfizmus dĺžky restrikčných fragmentov
RNA	ribonukleová kyselina
SCAR	sekvenčne charakterizované amplifikované oblasti
SDS	dodecyl sulfát sodný
ssDNA	jednovláknová deoxyribonukleová kyselina
Taq DNA	termostabilný enzým izolovaný z baktérie Thermus aquaticus
TBE pufor	Tris-borát-EDTA pufor
TE pufor	Tris-EDTA pufor
UV	ultra fialový
Vs.	verzus
qPCR	kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase

11ZOZNAM PRÍLOH

Príloha 1: Absorpčné spektrá, ktoré boli izolované magnetickými časticami P(HEMA-*co*-GMA) z použitých korenín a luskov paprík

Príloha 2: Absorpčné spektrum DNA pozitívnej kontroly pre rastlinnú DNA

Príloha 3: Overenie kvality DNA pomocou PCR po dlhšej dobe skladovania

Príloha 4: Absorpčné spektrá DNA, ktoré boli izolované vybranými magnetickými časticami z komplexných výrobkov

Príloha 5: Absorpčné spektrum DNA pozitívnej kontroly pre bakteriálnu DNA

Príloha 6: Overenie kvality DNA pomocou PCR s využitím používaných a zásobných reakčných PCR komponent

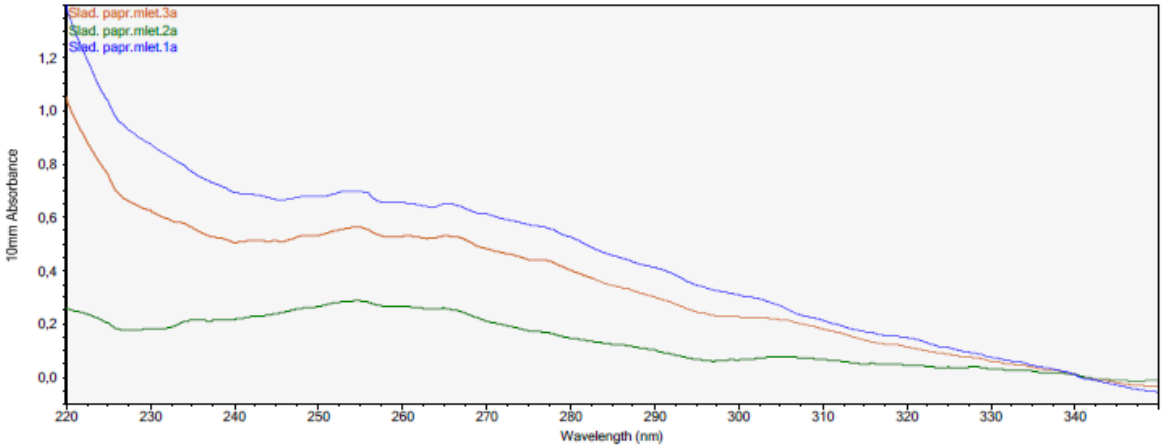
Príloha 7: Overenie kvality DNA pomocou PCR s využitím dvoch sád primérov

Príloha 8: Abstrakt na konferenciu Chemie je život

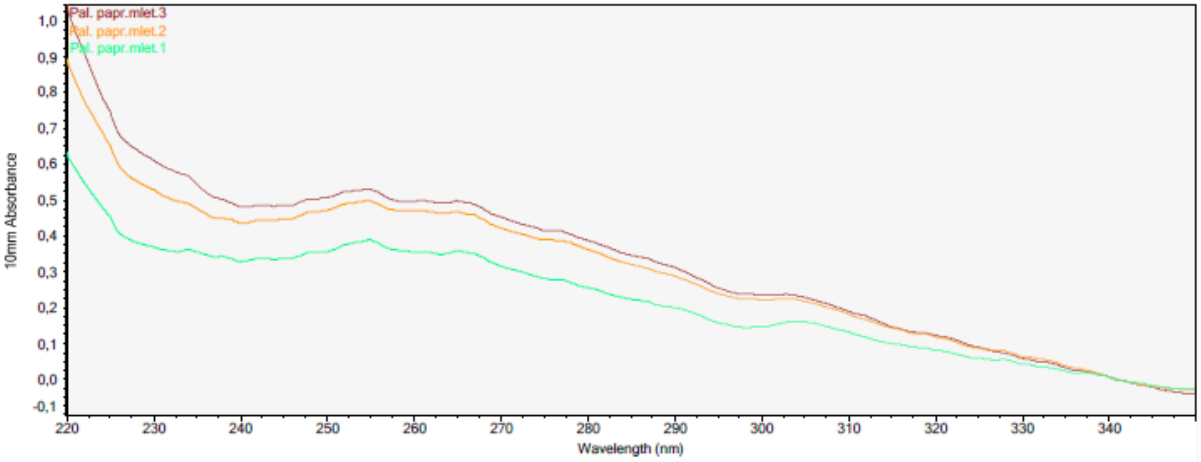
12PRÍLOHY

Príloha 1: Absorpčné spektrá, ktoré boli izolované magnetickými časticami P(HEMA-*co*-GMA) z použitých korenín a luskov paprík

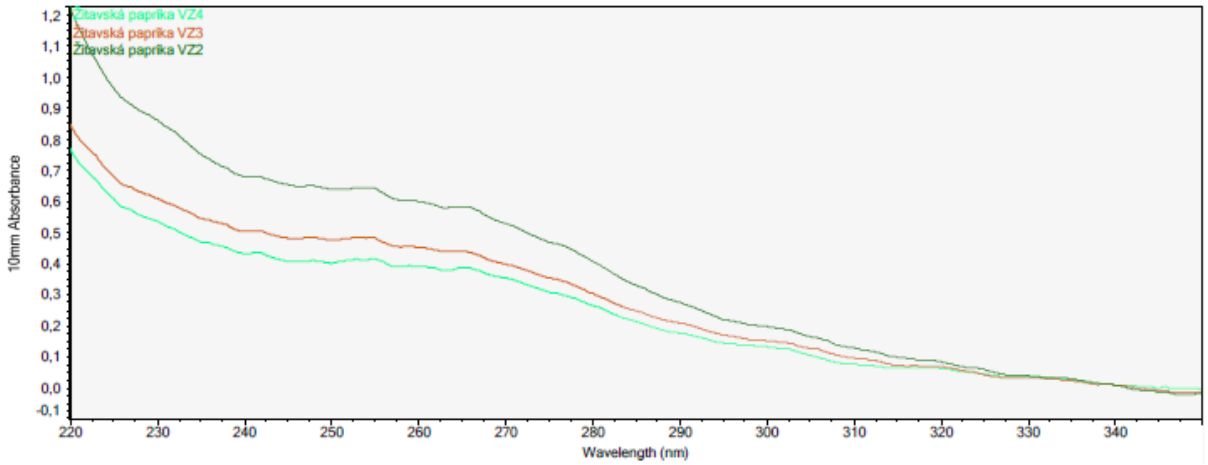
Obrázok 34: Absorpčné spektrum DNA, ktorá bola izolovaná magnetickými časticami P(HEMA-co-GMA) z papriky sladkej mletej v 2.-4. opakovaní.



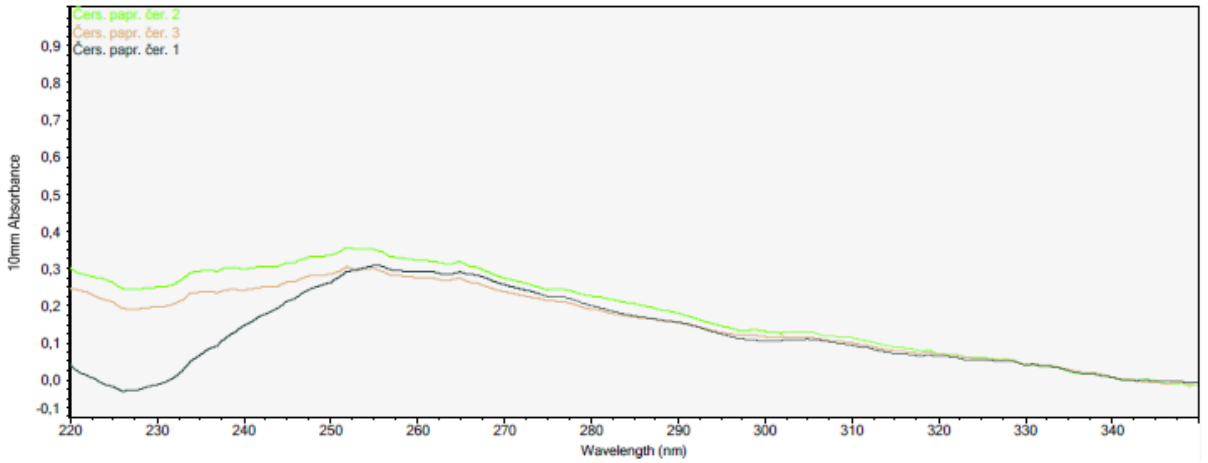
Obrázok 35: Absorpčné spektrum DNA, ktorá bola izolovaná magnetickými časticami P(HEMA-co-GMA) z papriky štipľavej mletej v 2.-4. opakovaní.



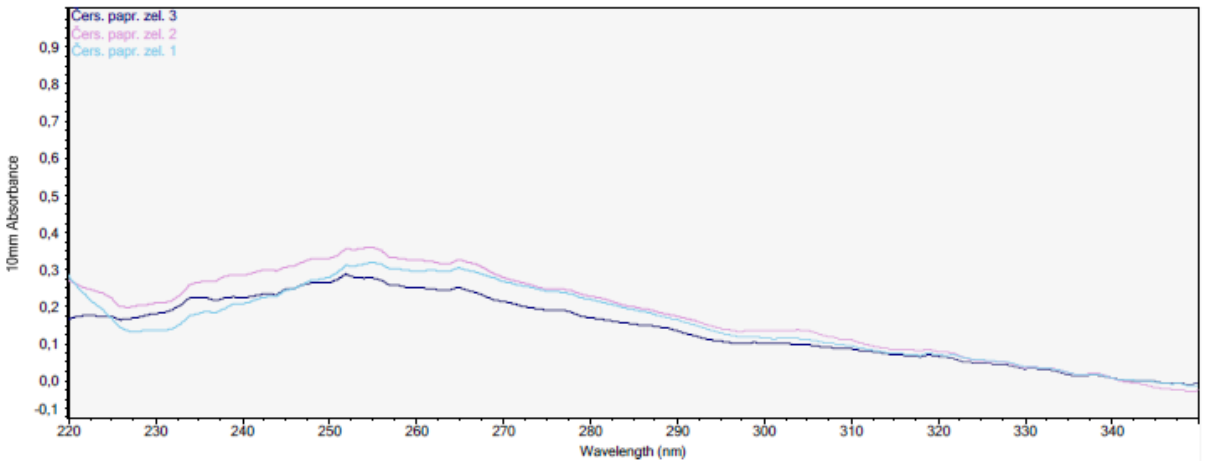
Obrázok 36: Absorpčné spektrum DNA, ktorá bola izolovaná magnetickými časticami P(HEMA-co-GMA) z papriky žitavskej sladkej, mletej v 2.-4. opakovaní.



Obrázok 37: Absorpčné spektrum DNA, ktorá bola izolovaná magnetickými časticami P(HEMA-co-GMA) z lusku papriky červenej čerstvej v 2.-4. opakovaní.

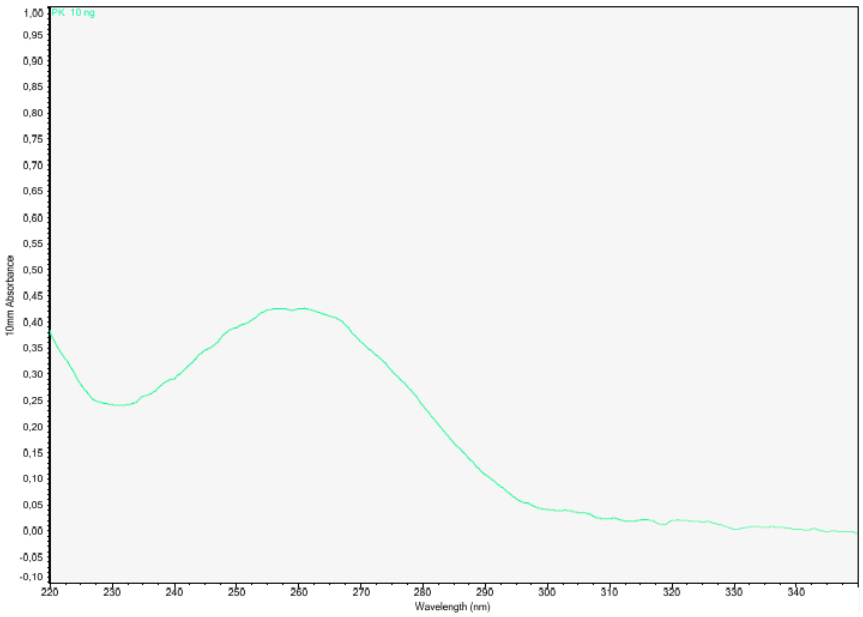


Obrázok 38: Absorpčné spektrum DNA, ktorá bola izolovaná magnetickými časticami P(HEMA-co-GMA) z lusku papriky zelenej čerstvej v 2.-4. opakovaní.



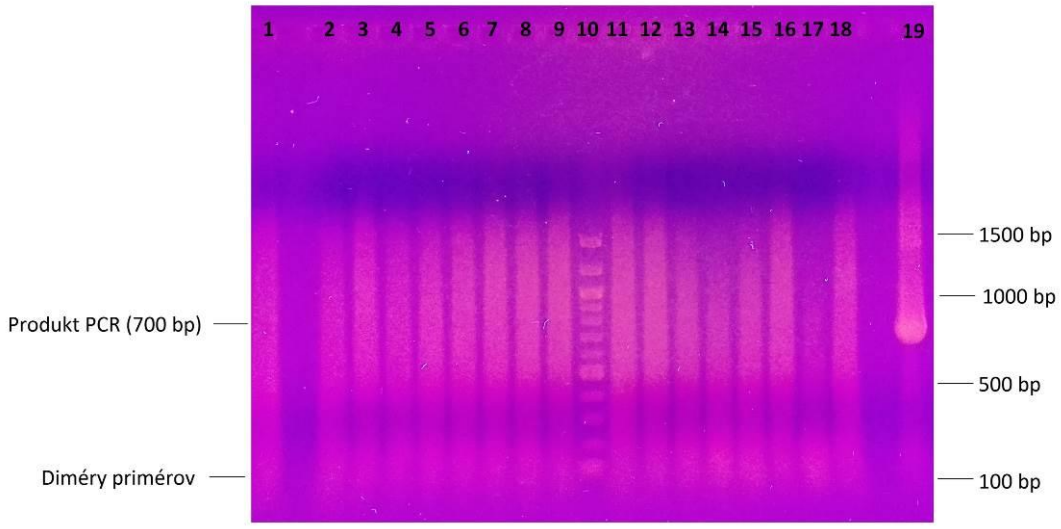
Príloha 2: Absorpčné spektrum DNA pozitívnej kontroly pre rastlinnú DNA

Obrázok 39: Absorpčné spektrum purifikovanej rastlinnej DNA Brassica oleracea *(10 ng·µl^{-1}), ktorá bola používaná ako pozitívna kontrola.*



Príloha 3: Overenie kvality DNA pomocou PCR po dlhšej dobe skladovania

Obrázok 40: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR (700 bp). Amplifikovaná bola DNA izolovaná rôznymi magnetickými časticami zo sušenej papriky sladkej, mletej pomocou primérov špecifických pre rastlinnú DNA po 19-nástich dňoch skladovania pri teplote 5 °C. Na gél bolo nanesené 15 µl amplifikovanej DNA.



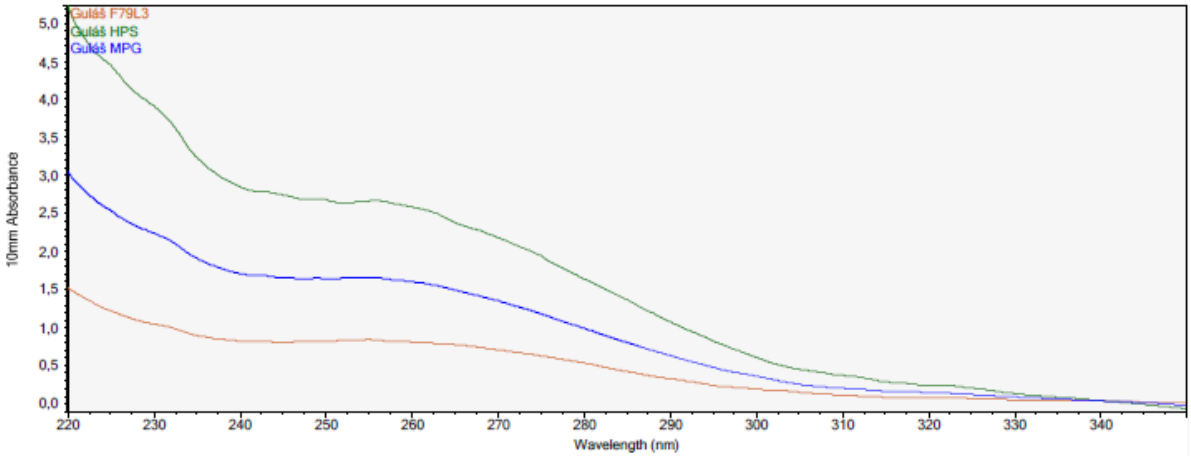
Beh	DNA	Magnetické častice	Riedenie DNA (x)	Množstvo DNA v PCR zmesi [ng]	Detekcia produktov PCR
1	NK	-	-	-	-
2	Paprika sladká, mletá	HPS B-M-NH_2	0	81,0	-
3			10	8,1	-
4			0	186	-
5			10	18,6	-
6		P(HEMA-*co*-GMA)NH_2	0	61,6	-
7			10	6,2	-
8			0	75,0	-
9			10	7,5	-
10	DNA veľkostný štandard				
11	Paprika sladká, mletá	MPG	0	166	-
12			10	16,6	-
13			0	182	-
14			10	18,2	-
15		PGMA ox	0	114	-
16			10	11,4	-
17			0	80,6	-
18			10	8,1	-
19	PK	-	-	20,0	+

Detekcia produktu PCR:
detegované produkty PCR: +
nedetegované produkty PCR: -
PK: pozitívna kontrola DNA *Brassica oleracea*
NK: negatívna kontrola

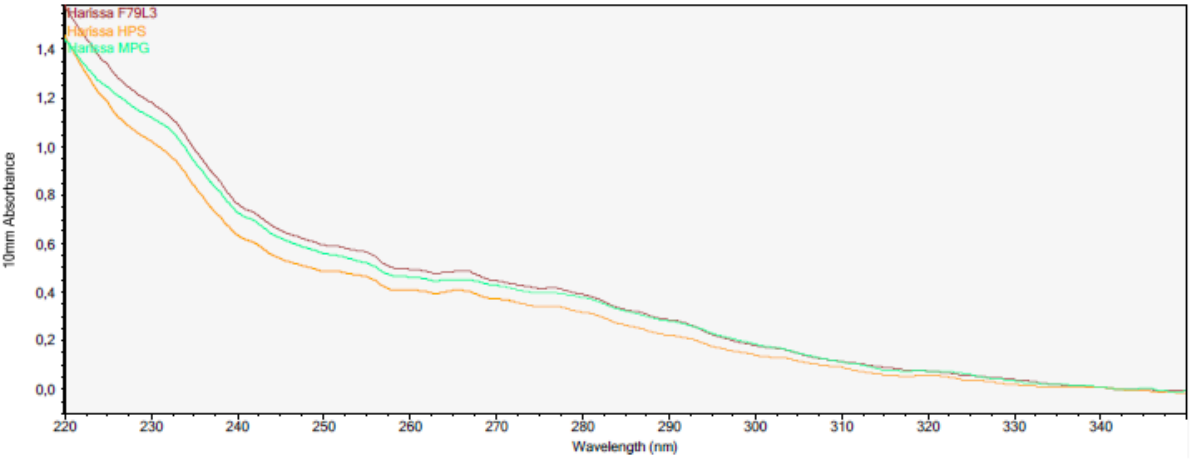
→ Izolovaná DNA nebola vhodná pre amplifikáciu PCR po 19-nástich dňoch skladovania pri teplote 5 °C. Ani jedným testovaným nosičom nebola izolovaná DNA v kvalite pre PCR. Po amplifikácii neboli detegované špecifické produkty PCR, okrem pozitívnej kontroly.

Príloha 4: Absorpčné spektrá DNA, ktoré boli izolované vybranými magnetickými časticami z komplexných výrobkov

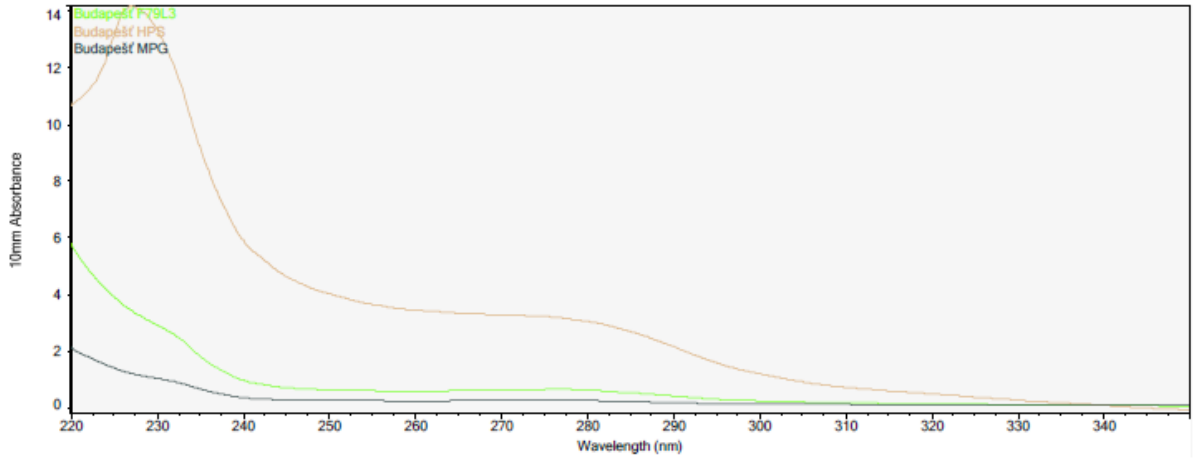
Obrázok 41: Absorpčné spektrum DNA, ktorá bola izolovaná vybranými magnetickými časticami z gulášovejpolievky.



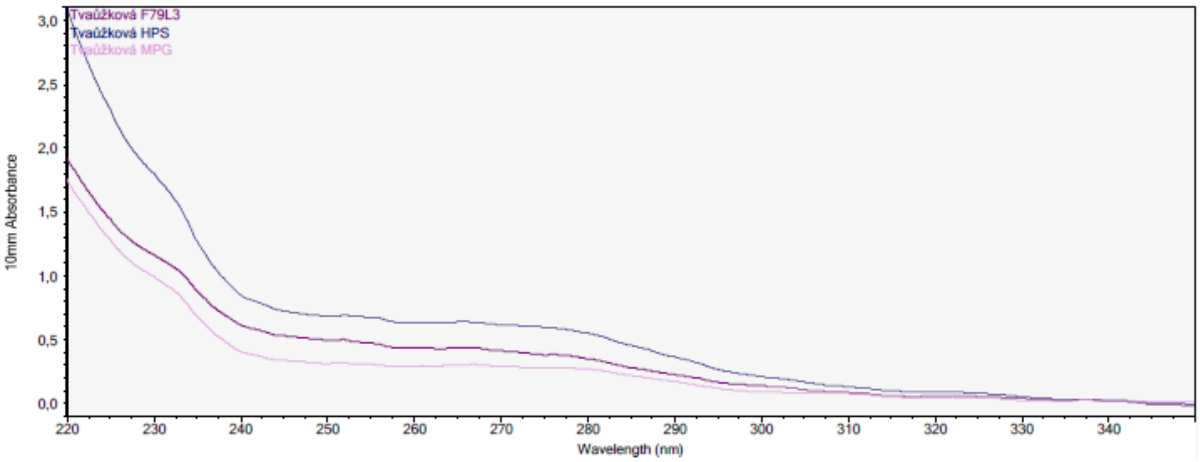
Obrázok 42: Absorpčné spektrum DNA, ktorá bola izolovaná vybranými magnetickými časticami z harissy.



Obrázok 43: Absorpčné spektrum DNA, ktorá bola izolovaná vybranými magnetickými časticami z budapešťského krému.

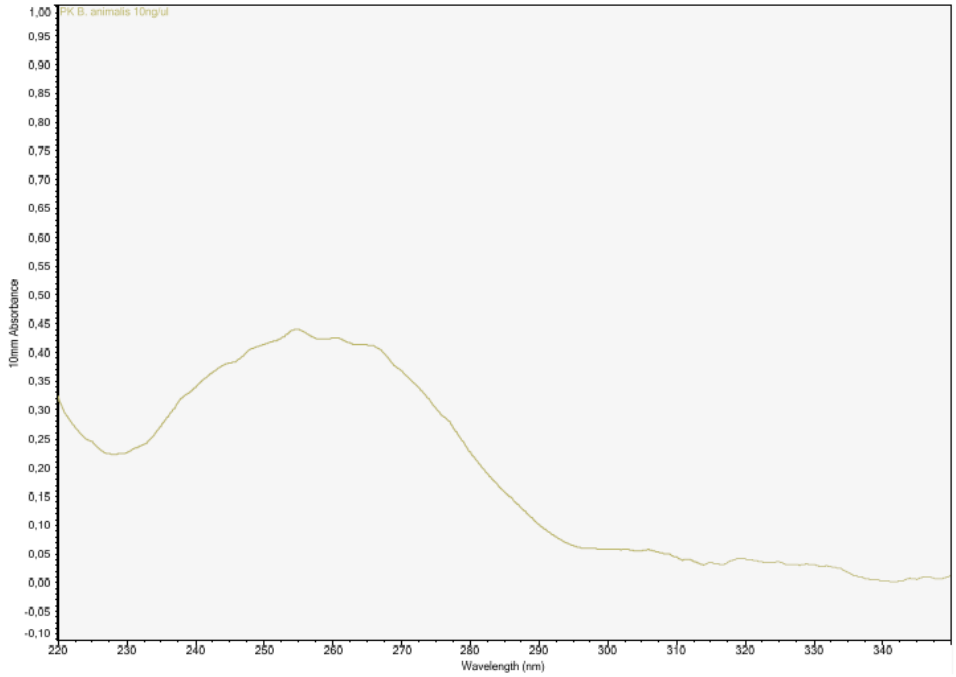


Obrázok 44: Absorpčné spektrum DNA, ktorá bola izolovaná vybranými magnetickými časticami z tvarôžkovej pomazánky pikant.



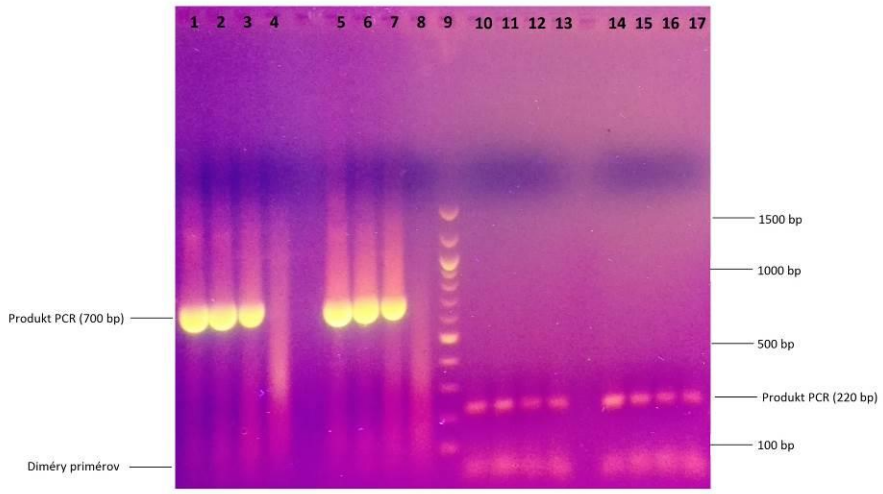
Príloha 5: Absorpčné spektrum DNA pozitívnej kontroly pre bakteriálnu DNA

Obrázok 45: Absorpčné spektrum purifikovanej rastlinnej DNA Bifidobacterium animalis CCM 4988T *(10 ng·µl^{-1}), ktorá bola používaná ako pozitívna kontrola.*



Príloha 6: Overenie kvality DNA pomocou PCR s využitím používaných a zásobných reakčných PCR komponent

Obrázok 46: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR (700 bp, 220 bp). Amplifikovaná bola DNA purifikovanej rastlinnej DNA Brassica oleracea (10 ng·µl^{-1}), ktorá bola používaná ako pozitívna kontrola s využitím používaných a zásobných (nepoužívaných) reakčných PCR komponent. Na gél bolo nanesené 25 µl amplifikovanej DNA. V zmesi pre PCR bola použitá 1 U·µl^{-1} Taq polymeráza.



Beh	DNA	Riedenie DNA (x)	Množstvo DNA v PCR zmesi [ng]	Detekcia produktov PCR
1	PK pk	0	20	+
2	PK pk	10	0,2	+
3	PK pk	100	0,02	+
4	NK pk	-	-	-
5	PK zk	0	20	+
6	PK zk	10	0,2	+
7	PK zk	100	0,02	+
8	NK zk	-	-	-
9	DNA veľkostný štandard			
10	PK pk	0	20	+
11	PK pk	10	0,2	+
12	PK pk	100	0,02	+
13	NK pk	-	-	+
14	PK zk	0	20	+
15	PK zk	10	0,2	+
16	PK zk	100	0,02	+
17	NK zk	-	-	+

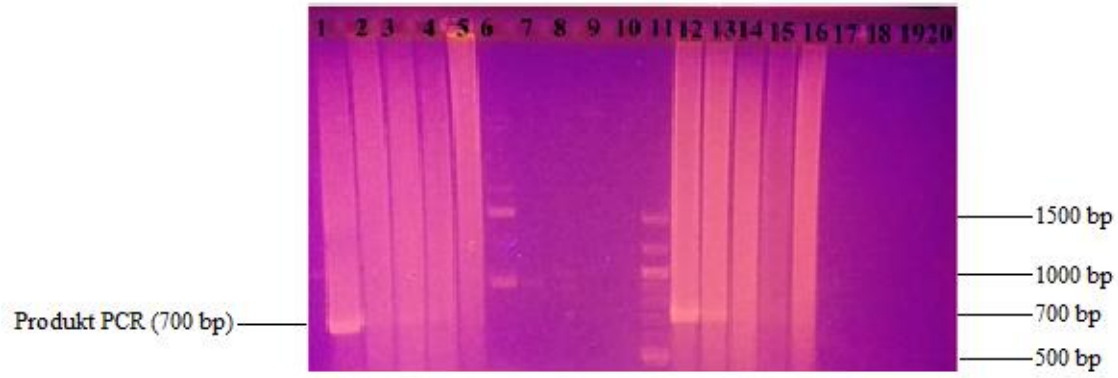
Detekcia produktu PCR:
detegované produkty PCR: ++
nedetegované produkty PCR: -
PK: pozitívna kontrola DNA *Brassica oleracea*

NK: negatívna kontrola
pk: priebežne používané reakčné komponenty PCR
zk: zásobné reakčné komponenty PCR

→ Testovaná kontrolná DNA *Brassica oleracea* bola vhodnej kvality pre PCR aj po zriedení na koncentráciu 100 pg·µl^{-1}. Používané alebo nepoužívané (zásobné) komponenty PCR nemali rozdielny vplyv na amplifikáciu kontrolnej DNA. Pre negatívnu kontrolu nebol detegovaný produkt PCR o veľkosti 700 bp ani pre jedny komponenty. Pre negatívnu kontrolu bol detegovaný produkt PCR o veľkosti 220 bp pre obe sady reakčných komponent.

Príloha 7: Overenie kvality DNA pomocou PCR s využitím dvoch sád primérov

Obrázok 47: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR (700 bp). Amplifikovaná bola DNA za použitia dvoch sád primérov F_18S a R_5,8S a dvoch druhov polymeráz 1 U·µl^{-1} 5U·µl^{-1}.



Beh	DNA	Riedenie DNA (x)	Množstvo DNA v PCR zmesi [ng]	Detekcia produktov PCR
1	PK	0	2,0	+
2	PK	100	0,02	+/-
3	Žitavská paprika	0	59,2	+/-
4	Žitavská paprika	0	44,4	+/-
5	NK			-
6	PK	0	2,0	-
7	PK	100	0,02	-
8	Žitavská paprika	0	59,20	-
9	Žitavská paprika	0	44,40	-
10	NK			-
11	DNA veľkostný štandard			
12	PK	0	2,00	+
13	PK	100	0,02	+

Beh	DNA	Riedenie DNA (x)	Množstvo DNA v PCR zmesi [ng]	Detekcia produktov PCR
14	Žitavská paprika	0	59,20	-
15	Žitavská paprika	0	44,40	-
16	NK			-
17	PK	0	2,00	-
18	PK	100	0,02	-
19	NK			-
20	Žitavská paprika	0	59,20	-

Detekcia produktu PCR:
detegované produkty PCR rôznej intenzity: +/-, +
nedetegované produkty PCR: -
PK: pozitívna kontrola DNA *Brassica oleracea*
NK: negatívna kontrola

→ V behoch 1-5 bola amplifikovaná DNA, ktorá bola namiešaná pre PCR zmes s primérami F_18S a R_5,8S o koncentrácii 10 pmol·μl^{-1} a polymerázou 5 U·μl^{-1}. V behoch 6-10 bola amplifikovaná DNA, ktorá bola namiešaná pre PCR zmes s primérami F_18S a R_5,8S o koncentrácii 100 pmol·μl^{-1} a polymerázou 5 U·μl^{-1}. V behoch 12-16 bola amplifikovaná DNA, ktorá bola namiešaná pre PCR zmes s primérami F_18S a R_5,8S o koncentrácii 10 pmol·μl^{-1} a polymerázou 1 U·μl^{-1}. V behoch 17-20 bola amplifikovaná DNA, ktorá bola namiešaná pre PCR zmes s primérami F_18S a R_5,8S o koncentrácii 100 pmol·μl^{-1} a polymerázou 1 U·μl^{-1}.

→ Izolovaná DNA bola amplifikovaná rôzne podľa použitých reakčných komponent PCR.

Príloha 8: Abstrakt na konferenciu Chemie je život

Konferencia Chemie je život, fakulty chemickej, VUT v Brne

Využitie magnetických častíc pre izoláciu DNA zo sušenej papriky

Bc. Martina Gaňová
RNDr. Aleš Kovařík, CSc., doc. RNDr. Alena Špánová, CSc., doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií
Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Česká Republika
xcganova@fch.vut.cz

Izolácia DNA z rastlinného pletiva je často veľmi komplikovaná, hlavne z dôvodu prítomnosti látok, ktoré môžu interferovať, napríklad pri amplifikácii DNA. Týmito látkami sú hlavne polyfenoly, polysacharidy, proteíny a rôzne farbivá. Chemická rôznorodosť takýchto látok je u príbuzných druhov rastlín rôzna, čo môže mať významný vplyv na výťažok a kvalitu DNA pri použití jedného izolačného postupu. Hlavným cieľom práce bolo vyhodnotiť použitie jedného izolačného protokolu u príbuzných rastlinných druhov.

Práca je zameraná na izoláciu DNA zo sušenej, mletej papriky s využitím magnetických častíc. Ďalej sa práca zaoberá zhodnotením izolovanej DNA z hľadiska kvality a kvantity ako aj hodnotením vplyvu inhibítorov izolovaných spolu s nukleovou kyselinou na jej amplifikáciu v polymerázovej reťazovej reakcii.

DNA bola izolovaná mikrometódou po homogenizácii buniek z troch druhov paprík (sušená paprika sladká, sušená paprika pikantná, žitavská paprika sladká) s použitím lyzačného roztoku s CTAB. Následne sa DNA izolovala pomocou reverzibilnej adsorbcie na šesť druhov magnetických častíc (P(HEMA-*co*-GMA), HPS B-M-NH_2, P(HEMA-*co*-GMA)NH_2, MPG, Fkol B100ox PGM, F 79 L3). Koncentrácia a čistota získanej DNA bola stanovená spektrofotometricky meraním absorbancie roztoku DNA v TE pufre. Kvalita rastlinnej DNA bola overená aj amplifikáciou v PCR. Boli použité priméry špecifické pre rastlinnú DNA F_18S a R_5,8S, kde veľkosť špecifických produktov PCR bola 700 bp. Prítomnosť produktov PCR bola dokázaná agarózovou gélovou elektroforézou.

Bolo dokázané, že použitou metódou je možné izolovať DNA, ktorá sa amplifikuje v PCR. Boli zistené rozdiely medzi magnetickými nosičmi, ktoré boli testované pre izoláciu DNA.

Kľúčové slová: rastlinná DNA, magnetické častice, izolácia DNA, PCR