



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 PŘI IZOLACI DNA Z
VYBRANÝCH TEPELNĚ ZPRACOVANÝCH VÝROBKŮ
ROSTLINNÉHO PŮVODU**

THE APPLICATION OF MAGNETIC PARTICLES FOR DNA ISOLATION FROM THERMALLY PROCESSED
FOOD PRODUCTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Aneta Hronová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Aleš Kovařík, CSc.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1036/2016
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Aneta Hronová**
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 při izolaci DNA z vybraných tepelně zpracovaných výrobků rostlinného původu

Zadání diplomové práce:

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

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

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

Bc. Aneta Hronová
student(ka)

RNDr. Aleš Kovařík, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Diplomová práce byla zaměřena na testování mikroizolace DNA za pomoci magnetických částic z tepelně zpracovaných potravinových výrobků v kvalitě vhodné pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Pro analýzu byly vybrány rybízové džemy. Ty byly homogenizovány s použitím plastového kopistu a stomacheru v lyzačním roztoku s cetyltrimethylammonium bromidem (CTAB). Při přípravě homogenátů byl testován vliv chloroform-oktanolu a isopropanolu. Homogenáty byly použity pro izolaci DNA magnetickými částicemi. Po odstředění komplexů CTAB s proteiny, polyfenoly a polysacharidy byla hrubá frakce DNA purifikována vazbou na magnetické částice. Byly testovány dva druhy magnetických částic: mikročástice poly(hydroxyethylmethakrylát-*co*-glycidylmethakrylát) – P(HEMA-*co*-GMA) a nanočástice oxidů železa pokryté poly(L-lysinem) – PLL. Izolovaná DNA byla podrobena spektrofotometrické analýze, kde byla zjišťována její koncentrace a kontaminace polyfenoly a proteiny. Poté byla testována amplifikovatelnost DNA v PCR. Pro amplifikaci byly použity primery specifické pro rostlinnou ribosomální DNA. Produkty PCR s očekávanou délkou 700 bp byly detegovány agarózovou gelovou elektroforézou. Bylo zjištěno, že z džemů lze pomocí testovaných magnetických nosičů izolovat DNA v kvalitě vhodné pro PCR.

ABSTRACT

The thesis has been focused on testing of micromethod of DNA isolation using magnetic particles from thermic-managed food products in a quality suitable for polymerase chain reaction (PCR). Currant jams were selected for the analysis. These were homogenized using plastic copist and stomacher in lysis buffer with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). The effect of chloroform-octanol and isopropanol in the preparation of homogenates was tested. Homogenates were used for DNA isolation by magnetic particles. Rough fraction of DNA was purified by binding on the magnetic particles after centrifugation of the CTAB complexes with proteins, polyphenols and polysaccharides. Two types of magnetic particles were tested: microparticles of poly(hydroxyethylmethacrylate-*co*-glycidylmethacrylate) – P(HEMA-*co*-GMA) and nanoparticles of iron oxides covered by poly(L-lysine) – PLL. Isolated DNA was analyzed spectrophotometrically – it was assessed its concentration and contamination by polyphenols and proteins. After that, amplification of the DNA was tested in PCR. Primers specific for plant ribosomal DNA were used. PCR products of expected length 700 bp were detected by agarose gel electrophoresis. It was shown that DNA isolated from currant jams using magnetic particles was in PCR-ready quality.

KLÍČOVÁ SLOVA

izolace DNA, magnetické mikročástice, magnetické nanočástice, polymerázová řetězová reakce (PCR)

KEYWORDS

isolation of DNA, magnetic microparticles, magnetic nanoparticles, polymerase chain reaction (PCR)

HRONOVÁ, A. *Využití magnetických částic při izolaci DNA z vybraných tepelně zpracovaných výrobků rostlinného původu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 85 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Aleš Kovařík, CSc..

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala panu RNDr. Aleši Kovaříkovi, CSc. a paní doc. RNDr. Aleně Španové, CSc. za odborné vedení, ochotu, laskavost, cenné rady a čas, který mi věnovali při zpracování této práce. Zvláštní poděkování patří mé rodině za jejich podporu.

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1	Falšování potravin.....	10
2.1.1	Metody detekce falšování potravin	10
2.2	Rybíz.....	11
2.2.1	Charakterizace rostliny.....	11
2.2.2	Chemické složení rybízu	11
2.2.3	Význam rybízu pro zdraví člověka	13
2.2.4	Využití rybízu pro potravinářské účely	13
2.2.4.1	Džem	13
2.3	Extrakce DNA z rostlinných materiálů.....	14
2.4	Magnetické částice.....	15
2.4.1	Vlastnosti magnetických částic	16
2.4.1.1	Magnetické jádro.....	16
2.4.1.2	Ochranný obal	17
2.4.2	Izolace DNA magnetickými částicemi.....	17
2.4.3	Princip magnetické separace	18
2.5	Polymerázová řetězová reakce.....	18
2.5.1	Princip polymerázové řetězové reakce.....	18
2.5.2	Reakční směs pro PCR.....	20
2.5.3	Výhody a nevýhody PCR.....	21
2.5.3.1	Inhibitory PCR v rostlinných materiálech.....	21
2.5.4	Detekce produktů PCR pomocí agarózové gelové elektroforézy	21
3	CÍL PRÁCE.....	23
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	24
4.1	Materiál.....	24
4.1.1	Potravinové výrobky (džemy) a DNA	24
4.1.1.1	Příprava džemů.....	24
4.1.2	Chemikálie	24
4.1.3	Magnetické nosiče.....	25

4.1.4	Přístroje a pomůcky.....	25
4.1.5	Roztoky pro izolaci DNA.....	26
4.1.6	Komponenty pro PCR	27
4.1.7	Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu	27
4.2	Metody.....	28
4.2.1	Homogenizace džemů, plodů a listů plastovým kopistem a příprava lyzátů buněk pro izolaci DNA	28
4.2.2	Homogenizace džemů za pomoci stomacheru a příprava homogenátů pro izolaci DNA	28
4.2.3	Izolace DNA pomocí magnetických částic	29
4.2.3.1	Magnetické částice P(HEMA-co-GMA).....	29
4.2.3.2	Magnetické nanočástice PLL	30
4.2.4	Zakoncentrování DNA izolované magnetickými částicemi P(HEMA-co-GMA) ...	30
4.2.5	Stanovení koncentrace izolované DNA	30
4.2.6	Příprava směsí pro PCR a provedení PCR	31
4.2.7	Detekce produktů PCR agarózovou gelovou elektroforézou	32
5	VÝSLEDKY	33
5.1	Testování separace DNA částicemi P(HEMA-co-GMA) přímo z rybízových džemů (bez homogenizace)	33
5.1.1	Vizualizace DNA na gelu.....	35
5.2	Homogenizace džemů, plodů a listů červeného rybízu	36
5.2.1	Testování homogenizace v lyzačním roztoku s CTAB pomocí kopistu	36
5.2.2	Příprava homogenátů s přidavkem nebo bez přidavku chloroform-oktanolu	37
5.2.3	Testování homogenizace v TEN pufru za pomoci stomacheru.....	38
5.3	Testování izolace DNA částicemi P(HEMA-co-GMA) z homogenátů rybízového džemu (2011) s přidavkem a bez přidavku chloroform-oktanolu	38
5.3.1	Amplifikace DNA	40
5.4	Izolace DNA z různých džemů, plodů červeného rybízu a listů částicemi P(HEMA-co-GMA)	42
5.4.1	Amplifikace DNA	43
5.4.2	Amplifikace DNA v přítomnosti enhanceru PCR.....	44
5.5	Vícenásobné opakování izolace DNA částicemi P(HEMA-co-GMA), její zakoncentrování přesrážením a gelová elektroforéza.....	45

5.5.1	Zakoncentrování DNA přesrážením ethanolem	47
5.6	Izolace DNA částicemi PLL z rybízových džemů.....	49
5.6.1	Příprava homogenátů džemů a jejich zpracování.....	49
5.6.1.1	Porovnání zabarvení separačních směsí různě zpracovaných homogenátů z rybízového džemu (2016; a).....	51
5.6.2	Izolace DNA z různě zpracovaných homogenátů z džemu (2016; a).....	52
5.6.2.1	Amplifikace DNA	53
5.6.3	Izolace DNA modifikovaným lyzačním roztokem s CTAB s přídavkem PVP z různě zpracovaného homogenátu džemu (2016; a).....	55
5.6.3.1	Amplifikace DNA	57
5.6.4	Izolace DNA modifikovaným lyzačním roztokem s CTAB z různě zpracovaných homogenátů z více druhů džemů, plodů a listů červeného rybízu	59
5.6.4.1	Amplifikace DNA	62
5.6.4.2	PCR produkty po amplifikaci většího množství DNA.....	64
5.7	Porovnání magnetických částic použitých při izolaci DNA z rybízových džemů	67
6	DISKUZE.....	68
6.1	Testování separace DNA částicemi P(HEMA-co-GMA) přímo z rybízových džemů (bez homogenizace)	68
6.1.1	Vizualizace DNA na gelu.....	68
6.2	Homogenizace džemů, plodů a listů červeného rybízu	68
6.2.1	Testování homogenizace pomocí kopistu	68
6.2.2	Příprava homogenátů v lyzačním roztoku s CTAB s přídavkem nebo bez přídavku chloroform-oktanolu.....	69
6.2.3	Testování homogenizace za pomoci stomacheru	69
6.3	Testování izolace DNA částicemi P(HEMA-co-GMA) z homogenátů rybízového džemu (2011) s přídavkem a bez přídavku chloroform-oktanolu	70
6.4	Izolace DNA z různých džemů, plodů červeného rybízu a listů částicemi P(HEMA-co-GMA)	70
6.4.1	Amplifikace DNA	71
6.4.2	Amplifikace DNA v přítomnosti enhanceru PCR.....	71
6.5	Vícenásobné opakování izolace DNA částicemi P(HEMA-co-GMA), její zakoncentrování přesrážením a gelová elektroforéza.....	71
6.5.1	Zakoncentrování DNA po přesrážení ethanolem	72
6.6	Izolace DNA částicemi PLL z rybízových džemů.....	72

6.6.1	Příprava homogenátů džemů a jejich zpracování	72
6.6.2	Izolace DNA z různě zpracovaných homogenátů z džemu (2016; a)	73
6.6.2.1	Amplifikace DNA	73
6.6.3	Izolace DNA modifikovaným lyzačním roztokem s CTAB s přídavkem PVP z různě zpracovaného homogenátu džemu (2016; a)	73
6.6.3.1	Amplifikace DNA	74
6.6.4	Izolace DNA modifikovaným lyzačním roztokem s CTAB z různě zpracovaných homogenátů z více druhů džemů, plodů a listů červeného rybízu	74
6.6.4.1	Amplifikace DNA	75
6.6.4.2	PCR produkty po amplifikaci většího množství DNA	75
6.7	Porovnání magnetických částic použitých při izolaci DNA z rybízových džemů	75
7	ZÁVĚR.....	76
8	LITERATURA	78
9	POUŽITÉ ZKRATKY	84
10	PŘÍLOHA	85

1 ÚVOD

Falšování potravin je problém, kterým se lidé zabývají již od nepaměti. První zmínky o falšování potravin jsou od roku 1525, kdy bylo na pražském trhu nalezeno máslo nahrazené lojem či do pepře byla přidávána nastrouhaná chlebová kůrka. K falšování potravin dochází především kvůli ekonomickému zisku, kdy je nejčastěji nahrazena dražší složka potravin levnější. Nepravost potravin klame nejen spotřebitele, ale může mít také nevhodné účinky na jeho zdraví. Z toho důvodu je zapotřebí vyvíjet rychlé a spolehlivé metody, které udrží kvalitu potravin a především budou dohlížet na spokojenost a zdraví spotřebitelů. Při identifikaci falšovaných potravin se v poslední době začínají uplatňovat metody založené na genetické analýze [1, 2].

U metod, které jsou založené na genetické analýze, je velmi důležitá izolace DNA bez inhibitorů a v dostatečném množství a kvalitě pro další zpracování. Bylo navrženo velké množství metod pro extrakci DNA z rostlinných tkání; většina z nich je založena na izolaci DNA pomocí komplexního roztoku obsahující cetyltrimethylammonium bromid (CTAB). Žádnou z nich však nelze použít pro všechny rostliny, proto je nutné metody izolace modifikovat pro každý rostlinný druh zvlášť. Izolace DNA z tepelně zpracovaných potravinových výrobků (džemů) vyrobených z bobulovin je velmi komplikovaný proces. Hlavním problémem při izolaci DNA je skutečnost, že bobuloviny obsahují velké množství sekundárních metabolitů, jako jsou polyfenoly, třísloviny, proteiny a polysacharidy. Tyto látky nepříznivě ovlivňují kvalitu a amplifikovatelnost DNA. Z tohoto důvodu je velmi nutné tyto látky ze vzorku odstranit nebo alespoň snížit jejich množství. Další překážkou při izolaci DNA z tepelně zpracovaných potravinových výrobků je její degradace, která je způsobena vysokou teplotou při zpracování [3, 4].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Falšování potravin

S případy falšování potravin se můžeme setkat od doby, kdy se začaly vyrábět za účelem prodeje. Falšování je fenomén, který postihuje od nepaměti prakticky všechny obory lidské činnosti. Frederick Accum byl německý chemik, který jako první začal řešit problematiku falšování potravin (1793). V té době se objevilo velmi mnoho falšovaných potravin, u kterých nešlo jen o šizení, ale také o ohrožení zdraví konzumenta (např. lístky čaje byly vařeny v síranu železnatém a výluhu z ovčího hnoje) [1, 5, 6].

Autentická (nefalšovaná) potravina je taková potravina, která je v souladu s popisem poskytnutým výrobcem či producentem. V souladu musí být geografický původ jednotlivých složek, z kterých je potravina složená, použitá technologie, totožnost použitých druhů (odrůd) rostlin a přesné složení potraviny, apod. V posledních letech se autenticita potravin stala předmětem velkého zájmu. Nejčastěji dochází k falšování luxusních potravin (lihoviny, víno, koření) nebo naopak potravin, které jsou prodávány ve velkém množství (masné a mléčné výrobky, tuky a oleje, ovocné šťávy). U těchto potravin dochází především k částečné nebo úplné náhradě jednotlivých složek, z kterých je potravina složená. Často může být některá složka potraviny zaměněna za jinou, levnější, v potravině se mohou nacházet nedeklarované složky, může dojít k nedodržení deklarovaného technologického postupu, potraviny mohou být dále falšovány pro zlepšení jejich vlastností, na etiketách může být uváděn vyšší obsah složky, než v potravině skutečně je, atd. Falšování potravin je nezákonné, klame spotřebitele a může ovlivnit zdraví konzumenta. Z těchto důvodů bylo přijato přísné legislativní opatření s cílem kontrolovat veškeré kroky v potravinovém řetězci (počínaje od dodavatelů potravinových složek, výrobců až po prodejce potravin) [1, 3, 5, 7, 8].

2.1.1 Metody detekce falšování potravin

S rostoucím trendem v oblasti falšování potravin jsou zapotřebí spolehlivé a rychlé metody pro ověřování a zajištění kvality výrobků. Ke zjišťování a průkazu falšování potravin slouží široká škála metod. Využívají se např. metody založené na analýze stabilních izotopů, proteomické metody, spektroskopické metody, chromatografické metody či metody založené na analýze DNA. Chromatografické a spektroskopické metody jsou relativně rychlé, ale při analýze vzorku dochází k jeho zničení, což je nežádoucí a jsou drahé. Navíc tyto analytické metody mají při určování druhů rostlin velkou nevýhodu a to takovou, že jejich výsledky jsou ovlivněny podmínkami životního prostředí, změnou klimatu či zemědělskými postupy, které jsou při pěstování rostlin aplikovány [1, 2, 3, 5].

Na druhé straně, metody založené na analýze DNA jsou považovány za spolehlivé z důvodu stability DNA. Tyto metody využívají jedinečnosti ve struktuře DNA a také toho, že je DNA přítomna ve všech buňkách organismu, čímž se usnadňuje odběr vzorků. Kromě toho analýza DNA umožňuje také kvantitativní stanovení jednotlivých složek potravin. DNA je extrahovaná z cílové potraviny a vybraný fragment DNA je amplifikován pomocí metody PCR. Amplikony, které jsou amplifikovány, jsou následně analyzovány (např. agarózová gelová elektroforéza, sekvencování, HRM analýza). Metody založené na izolaci DNA a PCR

se ukázaly být účinné např. při detekci druhů brambor, při identifikaci použitého masa, při rozlišování jednotlivých druhů ryb, při identifikaci Basmati rýže ve směsích rýže, při detekci pšenice seté v těstovinách či při identifikaci použitých druhů ovoce [1, 3, 7, 9].

2.2 Rybíz

2.2.1 Charakterizace rostliny

Rybíz (*Ribes spp.*), nazývaný také revíz či meruzalka, je vytrvalá rostlina, která je původem z Asie a severní Evropy. Dnes je rozšířená v mírných i chladných pásmech Evropy, Asie, Severní Ameriky, severní Afriky a Jižní Ameriky v Andách až po Patagonii. Botanicky se řadí do řádu lomikamenotvaré (*Saxifragales*), čeledi srstkovité (*Grossulariaceae*), rodu rybíz (*Ribes L.*). Do tohoto rodu patří kolem 120–130 druhů (např. rybíz červený (*Ribes rubrum L.*) a rybíz černý (*Ribes nigrum L.*) [10–13], Obrázek 1.

Rybíz vytváří keře rozložitého až vzpřímeného vzrůstu. Jeho listy jsou opadavé a letorosty holé a beztrnné. Pupeny černého rybízu jsou vegetativně generativní, tedy smíšené. Z pupenů se vyvine hrozen květů a jeden až dva letorosty. Červený rybíz plodí především na kyticovitých větvičkách, jehož pupeny jsou rozmístěny na bocích větviček a jsou také vegetativně generativní. Květy jsou nevýrazné, světle žlutozelené až slabě načervenalé a u černého rybízu až nafialověle zabarvené. Bobule dozrávají podle ranosti odrůd a jsou kulovité. Mohou být červeně, černě, růžově nebo bíle zabarveny [11, 14].



Obrázek 1: Plody a listy rybízu; a) rybíz červený (*Ribes rubrum L.*); b) rybíz černý (*Ribes nigrum L.*) [15]

2.2.2 Chemické složení rybízu

Rybíz je považován za přirozený zdroj mnoha cenných živin. Obsahuje různé chemické látky, které zvyšují jeho sladkost, ovocnou vůni a podporují vlastnosti, které přispívají ke zdraví člověka. Jsou bohatým zdrojem fenolových kyselin (anthokyanů, flavonolů, flavan-3-olů a fenolických kyselin), minerálů či kyseliny askorbové (vitamin C). Jeho plody nemají vysokou kalorickou hodnotu, protože obsah glykosidů, tuků a dusíkatých látek je poměrně nízký. Rybíz se od většiny druhů ovoce odlišuje i tím, že obsahuje málo disacharidů

(sacharózy). Pro rybíz a ostatní bobulovité rostliny je charakteristický vysoký obsah vody. Chemické složení červeného a černého rybízu je uvedeno v Tabulce 1. Chemické složení může být vysoce variabilní v závislosti na kultivaru, místě, kde rostlina roste, stupni zralosti, sklizni a skladovacích podmínkách [10, 14, 16, 17].

Tabulka 1: Chemické složení červeného a černého rybízu [14]

Obsah látek	Rybíz	
	červený	černý
Sušina %	17,6	15,9 – 23,4
Nerozpustné látky %	6,3	6,4
Celkové cukry %	2,5 – 4,5	5,3 – 9,8
z toho glukóza %	1,0 – 1,5	3,3
fruktóza %	1,5 – 3	3,9
sacharóza %	–	1,15 – 1,3
Extraktivní látky %	9,9	14,4
Vláknina %	4,3	5,4
Pektin %	0,2 – 1,5	0,1 – 1,6
Tuky %	1,7	0,5 – 0,9
Bílkoviny %	1,0 – 1,97	0,9 – 1,49
Vitamín C v mg % (kyselina askorbová)	15 – 60	50 – 300
Vitamín P v mg %	220 – 450	1000 – 2138
Vitamín A v mg %	0,012 – 0,150	0,072 – 0,900
Vitamín B ₁ v mg %	0 – 0,1	0,06 – 0,22
Vitamín B ₂ v mg %	0 – 0,02	0,02 – 0,07
Kyseliny v porovnání na kyselinu jablečnou %	1,2 – 3,8	2,9
Třísloviny %	0,083 – 0,119	0,332 – 0,420
Minerální látky v mg %:		
K ₂ O	47,7	44,3
Na ₂ O	3,7	5,4
CaO	6,3	9,1
MgO	3,1	4,2
F ₂ O ₃	1,4	0,7
P ₂ O ₅	15,9	18,6
SO ₃	7,2	4,1
Popeloviny %	0,7	0,6

Pozn.: mg % = mg ve 100 g čerstvého ovoce

2.2.3 Význam rybízu pro zdraví člověka

Rybíz je zdrojem mnoha cenných živin, které mají kladný vliv na zdraví člověka. Listy rybízu byly využívány jako bylinný lék již od starověku k léčbě chronických revmatických a zánětlivých onemocnění. Je velmi bohatý na fenolové sloučeniny, jejichž vyšší příjem je spojen se sníženým rizikem rakoviny, srdečních chorob či mrtvice. Rybíz má dále silné imunomodulační, antimikrobiální, antioxidační a protizánětlivé účinky. Uvádí se, že pravidelným používáním jak plodů rybízu, tak i výrobků z něj, se zvyšuje pružnost cév a propustnost buněčných stěn a zeslabují se krevní výrony do mozku. Pro vysoký obsah vitamínu C je rybíz doporučován především lidem, kteří onemocněli např. kurdějem či paradentózou. Vysoký obsah draslíku a sodíku v čerstvé šťávě rybízu má příznivý vliv na činnost jater a ledvin a to z toho důvodu, že podporují rozpouštění močových kamínků, chrání organismus před kornatěním tepen, snižuje krevní tlak a odvádějí z těla přebytečnou vodu. Lze říci, že rybíz obecně zvyšuje odolnost organismu proti chorobám [12, 14, 16, 17].

2.2.4 Využití rybízu pro potravinářské účely

Plody rybízu lze konzumovat čerstvé, anebo je lze využít jako přísadu do zpracovaných produktů. Rybíz je využíván při výrobě ovocných šťáv, džemů a zavařenin, moštů, vín, rosolů, koláčových náplní, dezertních plev, jogurtů, zmrzlin, minerálních vod, čajů, bonbónů či sušeného ovoce. Černý rybíz je také využíván jako surovina pro výrobu tradičního francouzského alkoholického nápoje - Liqueur de cassis nebo Crème de cassis [11, 12, 18].

2.2.4.1 Džem

Džem je přesně definován vyhláškou (Vyhláška č. 157/2003 Sb.), kterou se stanoví požadavky na čerstvé ovoce a čerstvou zeleninu, zpracované ovoce a zpracovanou zeleninu, suché skořápkové plody, houby, brambory a výrobky z nich, jakož i další způsoby jejich označení. Džem je potravina, která je vyrobena ze směsi přírodních sladidel, vody, pulpy a dřeně, nebo ze směsi přírodních sladidel, vody a dřeně. Tato směs je přivedena do vhodné rosolovité konzistence. Džem je vyroben z jednoho nebo více druhů ovoce, jehož minimální obsah je všeobecně 350 g/kg džemu. Pro určité ovoce (např. rybíz, jeřabiny, rakytník, atd.) je obsah zpracovaného ovoce snížen – 250 g ovoce/kg výrobku. Dále jsou vyráběny džemy výběrové, které by měly obsahovat minimálně 450 g zpracovaného ovoce/kg džemu. U rybízových džemů je obsah rybízu minimálně 350 g/kg džemu [19]. Rozlišujeme:

- džem výběrový (Extra) – jedná se o potravinu, která je vyrobena ze směsi přírodních sladidel, vody a nezahuštěné pulpy jednoho nebo více druhů ovoce, přivedené do vhodné rosolovité konzistence [19].
- džem výběrový (Extra) speciální – potravina, která splňuje požadavky pro džem výběrový (Extra) s tím, že tyto výrobky jsou se sníženým obsahem energie/cukru a splňují podmínky pro relevantní výživové tvrzení [19].
- džem výběrový (Extra) méně sladký – potravina, jenž splňuje podmínky pro džem výběrový (Extra) s tím, že tyto výrobky obsahují méně cukru [19].

Při výrobě džemu dojde nejprve k oprání rybízu. Bobule jsou následně otrhány a polovina z nich je umleta na mlýnku na ovoce. Rybízová šťáva a zbylé bobule rybízu jsou vařeny v nízké vrstvě v širokém hrnci do té doby, dokud bobule nezměkknou a džem se nezahustí. Poté je po částech přidáván cukr tak, aby nedošlo k přerušení varu. Horký džem (o teplotě minimálně 85 °C) je naplněn do skleniček, které byly nahřáté a vysušené. Naplněné skleničky jsou uzavřeny a obráceny dnem vzhůru dokud nedojde k jejich vychladnutí. Skleničky s džemem jsou uchovávány na tmavém a suchém místě [11].

2.3 Extrakce DNA z rostlinných materiálů

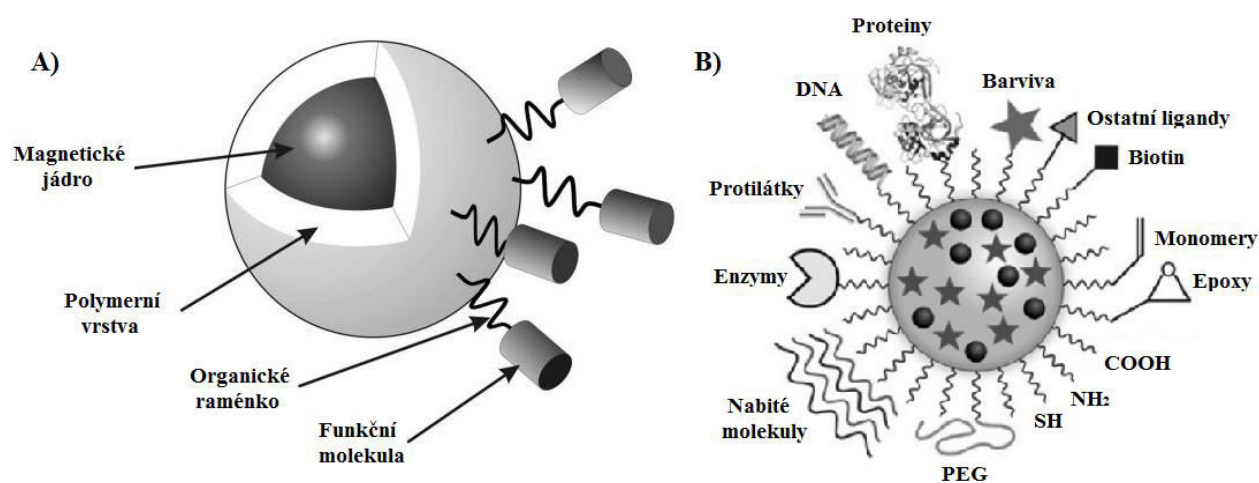
Izolace čisté, neporušené a vysoce kvalitní DNA je pro všechny molekulární studie velmi důležitá. Získání vysoce kvalitní DNA s vysokou molekulovou hmotností z rostlinných tkání je velmi náročný proces. Existuje celá řada problémů spojených s izolací nukleových kyselin z rostlinných materiálů – zejména přítomnost polyfenolových sloučenin, polysacharidů a proteinů [20, 21, 22, 23]. I když bylo vyvinuto několik úspěšných postupů pro izolaci DNA z rostlin, nelze žádný z nich univerzálně použít pro všechny rostliny a to především kvůli jejich biochemické a morfologické rozmanitosti. Metody izolace DNA je třeba upravit pro každý rostlinný druh a dokonce i pro každou rostlinnou tkáň. Izolace DNA by měla být především rychlá, bezpečná, spolehlivá a efektivní, poskytující dostatečnou koncentraci DNA vhodnou pro molekulární analýzu. Izolovaná DNA je využívána pro štěpení restrikčními endonukleázami, southern-blot a DNA/DNA hybridizaci, při PCR a při konstrukci genomových knihoven [20, 23, 24].

Izolaci DNA z rostlinného materiálu ovlivňuje, jak bylo uvedeno výše, přítomnost nežádoucích látek. Obtíže vznikají vzhledem k přítomnosti buněčné stěny, chloroplastů, sacharidů, polyfenolů, alkaloidů, flavonoidů či tříslovin. Tyto látky se pevně váží na nukleové kyseliny a jsou s nimi koextrahovány. Přítomnost polysacharidů může inhibovat enzymatickou aktivitu – konkrétně aktivitu DNA polymerázy a aktivitu restrikčních enzymů. Polysacharidy také ovlivňují viskozitu roztoku. Oxidovaná forma polyfenolů, která vzniká oxidací buněčnými oxidázami, se kovalentně naváže na DNA a způsobí její zhnědnutí. V důsledku toho je kvalita DNA pro použití v molekulární analýze snížena. Proto je velmi nezbytné minimalizovat přítomnost těchto látek. K odstranění polysacharidů se využívá vyšší koncentrace cetyltrimethylammonium bromidu (CTAB) s vyšší koncentrací solí (NaCl). K odstranění polyfenolů je využíván polyvinylpyrrolidin (PVP) a β -merkptoethanol. Aby se předešlo degradaci DNA, je do extračního pufru přidávána disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA). Přebytké proteiny jsou odstraněny přidavkem fenolu a chloroformu [20–22, 24–28].

2.4 Magnetické částice

Magnetické částice byly poprvé použity v lékařském oboru pro dodání léčiva k cílové buňce kolem roku 1970. Až v posledních letech byl zaznamenán rozvoj magnetických separačních technik. Magnetické částice našly uplatnění v mnoha biologických oblastech (diagnostika, molekulární biologie, izolace nukleových kyselin a jejich čištění, imunologické testy, biotechnologie, environmentální technologie, medicína i analytické aplikace). Ve srovnání s běžnými metodami má využití magnetických částic řadu výhod – jsou vysoce účinné, zkracují dobu analýzy a je zapotřebí menší množství vzorku a činidel [29–32].

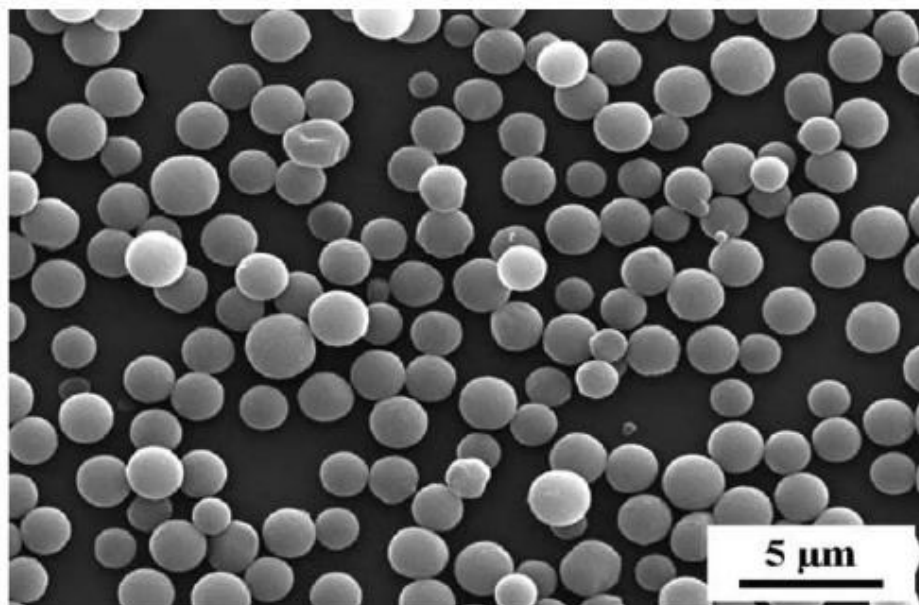
Magnetické částice se skládají z magnetického jádra, ochranného obalu a funkčního povrchu (viz Obrázek 2, A). Magnetické jádro je většinou vyrobeno z oxidů železa (magnetit, maghemit či ferit) a je zodpovědné za interakci s vnějším magnetickým polem. Aby došlo k ochraně analytu před stykem s kovem, je jádro obaleno tenkou ochrannou vrstvou, kterou nejčastěji tvoří polymery (polystyren, polyakrylové deriváty), organické kyseliny, přírodní sacharidy či různé anorganické matrice. Tato složka je diamagnetická a její výhodou je, že může být funkcionalizována (viz Obrázek 2, B). Částice mohou být funkcionalizovány různými skupinami (aminové, karboxylové, thiolové, hydroxylové) či látkami (biotin, protilátky, enzymy, aj) v závislosti na cílové molekule, která má být izolovaná [29, 31, 33, 34].



Obrázek 2: A) Stavba magnetické částice [29], B) možnosti funkcionalizace magnetické částice [34]

2.4.1 Vlastnosti magnetických částic

Materiály, z nichž jsou magnetické částice připraveny, ovlivňují celkové vlastnosti magnetických částic (např. koloidní stabilitu, morfologii, velikost či disperzitu). Výhodné jsou materiály s velkým povrchem pro navázání nukleových kyselin. Průměr částic je obvykle v rozmezí 0,5–10 μm a nejvýhodnější tvar magnetických částic je koule (kulička), poněvadž má největší vazebnou kapacitu (viz Obrázek 3) [30, 35].



Obrázek 3: Kulovitý tvar magnetických částic (magnetické částice P(HEMA-*co*-GMA) s obsahem kyseliny olejové potažené magnetitem a poly(glycidyl methakrylátem) (PGMA)) [30]

2.4.1.1 Magnetické jádro

Jádro částic je tvořeno magnetickým materiálem, který je zodpovědný za interakci s vnějším magnetickým polem. Jelikož všechny magnetické a fyzikálně-chemické vlastnosti závisí na velikosti a tvaru magnetických jader, je velmi důležité, aby všechna magnetická jádra v částici měla jednotný tvar. Jádro může být připraveno z různých druhů magnetických materiálů. Nicméně, mnoho z těchto materiálů, jako je např. kobalt či chrom, je vysoce toxických a nestabilních. Nejčastěji používaným a relativně bezpečným materiálem jsou oxidy železa – magnetit, maghemit či různé typy feritů ve formě prášků nebo kapalin [29, 31, 33, 36].

- *magnetit* Fe_3O_4

Magnetit je minerál, který vykazuje feromagnetické vlastnosti. Sktruktura magnetitu se řadí do skupiny spinelů (AB_2O_4). Silná magnetizace je zapříčiněna přítomností iontů Fe^{2+} i Fe^{3+} [29].

- *maghemit* $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

Maghemit vzniká oxidací magnetitu a má stejnou mřížkovou strukturu až na výjimku, že všechny atomy železa jsou v oxidačním stavu Fe^{3+} . Jedná se o nejvhodnější materiál,

a to především z toho důvodu, že nepředstavuje žádné zdravotní nebezpečí. V důsledku toho je maghemit velmi populární pro výrobu magnetických částic (zejména pro biomedicínské aplikace) [29].

- *ferity* $MO \cdot Fe_2O_3$

Ferity jsou sloučeniny přechodných kovů (Co, Ni, Mn, Zn) a železa, které vykazují silné magnetické vlastnosti. Tyto materiály mají podobnou spinelovou strukturu jako magnetit, s výjimkou toho, že ionty železa jsou zcela nebo částečně nahrazeny jinými přechodnými kovy. Použití feritů je omezeno toxicitou přechodných kovů. Využívají se nepropustné obaly, které zabraňují vyplavování těchto kovů. Mohou být také využívány smíšené ferity, čímž jsou využívány různé vlastnosti jednotlivých iontů [29, 33, 36].

2.4.1.2 Ochranný obal

Ochranný obal má klíčovou roli v mnoha oblastech. Především zabraňuje styku analytu s magnetickým jádrem, zabraňuje aglomeraci částic a znemožňuje únik toxických iontů z magnetického jádra do prostředí. Ochranný obal slouží také jako základ pro další ukotvení funkčních skupin (funkcionalizaci). Magnetické jádro bývá nejčastěji potahováno přírodními či syntetickými polymery, oxidem křemičitým či zlatem. Volba materiálu závisí na další aplikaci magnetických částic [29, 33, 36].

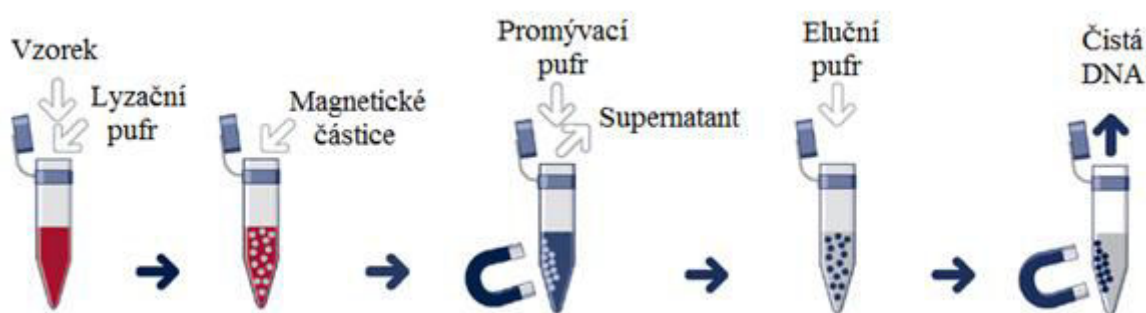
2.4.2 Izolace DNA magnetickými částicemi

K izolaci DNA se využívají magnetické nosiče s imobilizovanými ligandy na polymeru, které vykazují afinitu k cílové nukleové kyselině. Zvláště vhodné jsou částice, které jsou vyrobeny ze superparamagnetického materiálu (kombinace paramagnetického a feromagnetického). Tyto částice neinteragují mezi sebou v nepřítomnosti magnetického pole a jsou dobře dispergovány v médiu bez přítomnosti magnetického pole, aniž by docházelo k jejich shlukování. Mnoho magnetických částic je komerčně dostupných. Silikagel (oxid křemičitý) je jedním z nejpoužívanějších pevných nosičů využívaných při izolaci DNA. Dva hlavní materiály na bázi oxidu křemičitého používané pro izolaci DNA jsou čisté matrice ze silikagelu a aniontměniče. K vazbě DNA na povrch silikagelu dochází v prostředí s vysokou koncentrací chaotropních látek. K pokrytí magnetických částic polymerní vrstvou se nejčastěji používá polystyren. Polymerní vrstva má hydrofobní vlastnosti, což způsobuje neselektivní adsorpci proteinů. Tento problém lze odstranit použitím částic pokrytých hydrofilní vrstvou polymerů na bázi poly(HEMA). K izolaci nukleových kyselin se rovněž používají nosiče pokryté amino skupinami ($-NH_2$), které poskytují kladný náboj na povrchu částic. Pozitivně nabitě skupiny zvyšují elektrostatickou afinitu s fosfátovým koncem řetězce DNA nebo RNA, který má negativní náboj. K vazbě DNA na nosič s karboxylovými skupinami s negativním nábojem dochází v prostředí s vysokou koncentrací NaCl (či NaI) a polyethylenglykolu (PEG 6000). DNA se eluuje do pufru s nízkou iontovou silou [33, 35].

2.4.3 Princip magnetické separace

Proces separace za pomoci magnetických částic se skládá ze třech základních kroků (schéma procesu je zobrazeno na Obrázku 4):

- Nejprve dojde k namíchání separační směsi, která obsahuje suspenzi s cílovými nukleovými kyselinami a magnetické částice. Dochází k interakci a vzniká magnetický komplex, který je následně oddělen za použití vhodného magnetického separátoru (supernatant je odstraněn) [35, 37].
- Magnetický komplex je několikrát promyt, aby došlo k odstranění nežádoucích látek, které by mohly inhibovat PCR (např. polysacharidy, fenolické látky, huminové kyseliny) [35, 37].
- Magnetické částice jsou následně odseparovány za pomoci magnetického separátoru a čisté nukleové kyseliny jsou připraveny pro další aplikace [35, 37].



Obrázek 4: Schéma principu magnetické separace. Obrázek převzat z [35]

2.5 Polymerázová řetězová reakce

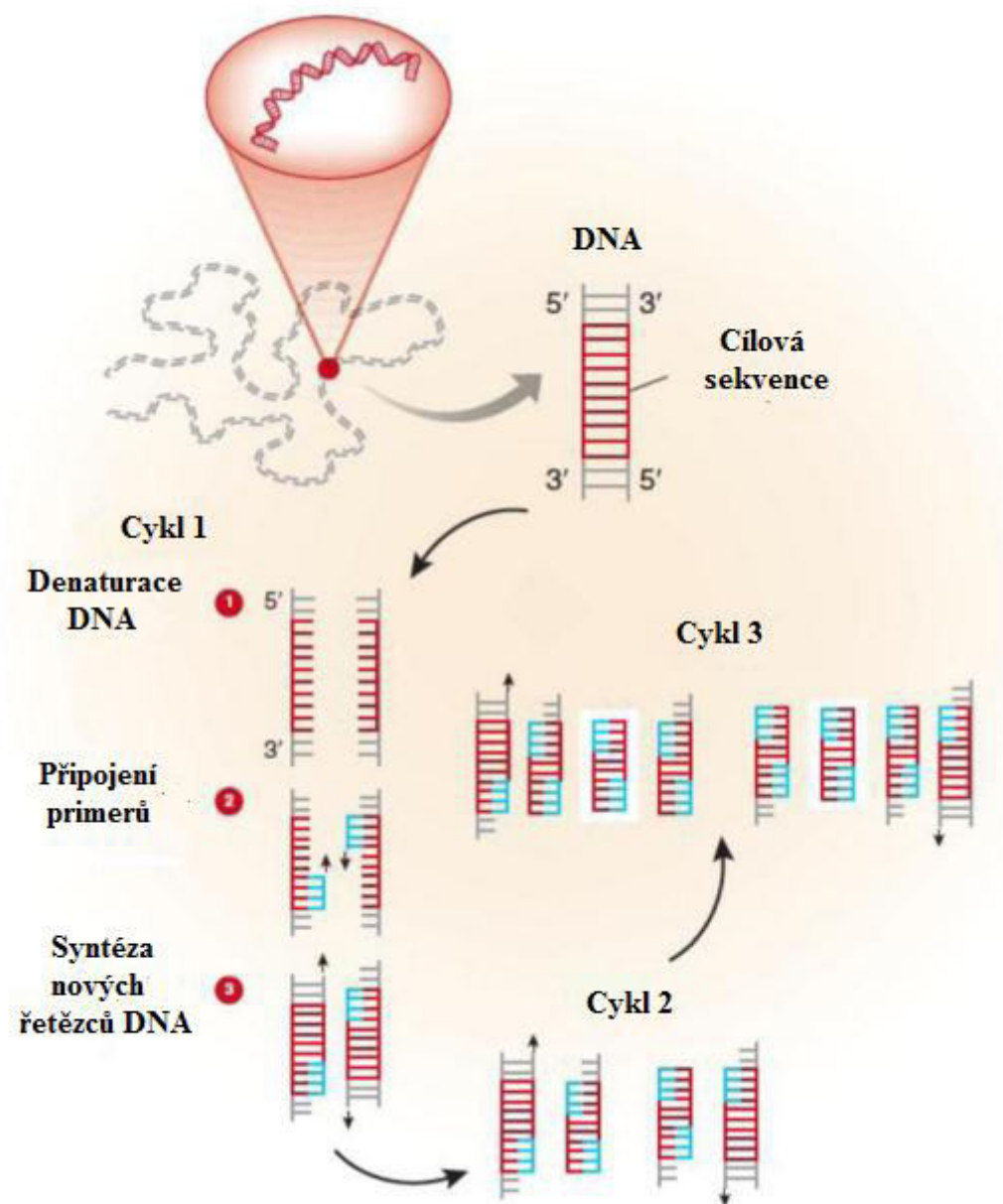
Polymerázová řetězová reakce (PCR) je molekulární diagnostická metoda, která byla objevena v polovině 80. let minulého století americkým biochemikem K. Mullisem. Za tento objev byl v roce 1993 odměněn Nobelovou cenou. PCR umožnila řadu experimentálních přístupů, které byly dříve neproveditelné. V dnešní době se PCR využívá při detekci cílových organismů v humánní a veterinární medicíně, v půdě a ve vodě, při kontrole výrobků a při charakterizaci genů. PCR má mnoho dalších využití [38–42].

2.5.1 Princip polymerázové řetězové reakce

Podstatou PCR je mnohonásobná syntéza komplementárního řetězce DNA pomocí termostabilní DNA polymerázy. K vybraným úsekům komplementárních vláken denaturované DNA se připojují tzv. nukleotidy (krátké syntetické oligonukleotidy), které jsou odvozeny od dané sekvence. Obecně lze průběh PCR rozdělit do tří fází (Obrázek 5).

- V prvním kroku se DNA denaturuje při vysokých teplotách (90–97 °C). Dochází k rozvolnění dvoušroubovice a vznikají dvě jednořetězcové molekuly DNA, na které mohou v dalším kroku nasedat primery.

- Následně dochází k připojení primerů na templátovou DNA na jejich specifické cílové sekvence. Teplota hybridizace se pohybuje v rozmezí 50–60 °C. Teplota vhodná pro tuto reakci závisí na délce oligonukleotidu a na zastoupení A-T a G-C párů.
- V posledním kroku dochází k syntéze nových řetězců DNA podle původního vlákna (jako šablony). Tato reakce je katalyzována DNA polymerázou. Teplota syntézy nových řetězců DNA probíhá v rozmezí 65–75 °C. Vyšších teplot nelze využít, a to z toho důvodu, že DNA polymeráza není stabilní při vyšších teplotách. V současné době je využívána rekombinantní termostabilní DNA polymeráza. Podmínka teplotní stability enzymu je důležitá z toho důvodu, že jedním krokem je denaturace DNA za vysoké teploty [38, 40–43].



Obrázek 5: Princip PCR. Obrázek převzat z [43]

Opakováním těchto tří fází dochází k exponenciální amplifikaci původní DNA, kde počet cyklů (n) určuje kolik kopií (2^n) je syntetizováno. Při 30 cyklech může být syntetizováno až 10^9 kopií vybraného úseku DNA. Při využití 25–30 cyklů dochází k dostatečnému zmnožení původní DNA. K provedení PCR se využívá cykler, do kterého se vkládají zkumavky nebo destičky obsahující namíchanou směs pro PCR. Přístroj mění teplotu v přesných a předem naprogramovaných krocích [38–40, 43].

Výslednými produkty PCR jsou úseky DNA o přesně definované délce (tzv. amplikony). Jejich velikost bývá obvykle v rozmezí desítek až tisíc párů bází (bp). Přítomnost amplikonů se prokazuje nejčastěji agarózovou gelovou elektroforézou, kde dochází k separaci fragmentů DNA na základě velikosti a náboje (kvalitativní stanovení). Produkty PCR jsou vizualizovány po interakci s určitými chemickými látkami (např. interkalace při použití ethidium bromidu) v UV světle. Rozdělené fragmenty lze izolovat z agarózového gelu a použít pro další práci [38, 39, 43].

2.5.2 Reakční směs pro PCR

Každá reakční směs PCR vyžaduje přítomnost těchto komponent:

- **DNA templát** – slouží jako matrice pro syntézu nového řetězce DNA a obsahuje cílová místa pro primery. K amplifikaci dochází i u DNA templátu, který není vysoké čistoty.
- **oligonukleotidové primery** – obsahují obvykle 18–24 nukleotidů a jsou komplementární k sekvencím ohraničující úsek DNA templátu, který má být amplifikován. Jejich teplota tání by měla být podobná a pohybovat se v rozmezí 55–65 °C. Tato teplota dovoluje připojení primerů k DNA templátu. Optimální koncentrace jednoho primeru v reakci je zpravidla 0,1–0,6 μM . Oligonukleotidové primery bývají synteticky připravené.
- **2'-deoxynukleosid-5'-trifosfáty (dNTP)** – směs všech čtyř deoxyribonukleotidů (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Jedná se o stavební kameny pro syntézu nového řetězce DNA, jejichž optimální koncentrace je 200 μM .
- **DNA polymeráza** – enzym, který syntetizuje novou DNA ve směru $5' \rightarrow 3'$ podle sekvence nukleotidů v DNA templátu od $5'$ konce primeru. Tento enzym není schopný opravovat chyby vzniklé při replikaci (postrádá $3' \rightarrow 5'$ exonukleázovou aktivitu). Využívá se tzv. Taq DNA polymeráza, která je izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. Její teplotní optimum je při 75 °C a poločas inaktivace je přibližně 40 minut při 95 °C.
- **reakční pufr s ionty Mg^{2+}** – vytváří ideální prostředí pro DNA polymerázu (ionty Mg^{2+} jsou kofaktorem pro DNA polymerázu). Obsahuje 10 mM Tris-HCl (pH 8,3–8,8), 50 mM KCl a 1,5 mM MgCl_2 . Koncentrace Mg^{2+} iontů je často optimalizována pro každé primery zvlášť.
- **voda pro PCR** – tridestilovaná voda (odpor 18 $\text{M}\Omega$), využívá se k doplnění směsi na definovaný objem [38–40, 42].

2.5.3 Výhody a nevýhody PCR

PCR je definovaná jako jednoduchá, rychlá a nenákladná metoda, což je její velkou výhodou. Umožňuje prokázat přítomnost DNA a vzhledem k tomu, že se jedná o velmi citlivou metodu, je možné PCR použít pro zjištění přítomnosti malého množství DNA ve vzorku (teoreticky by měla stačit jedna molekula DNA) [39, 43].

U DNA, která je použita pro PCR, je možná přítomnost tzv. PCR inhibitorů, což jsou chemické látky, které mají negativní dopad na průběh PCR. Inhibitory mohou pocházet ze vzorku potravin (např. Ca^{2+} ionty z mléčných výrobků) nebo mohou být do PCR směsi přeneseny během zpracování vzorku či mohou být koextrahovány s DNA. Důsledkem přítomnosti PCR inhibitorů je částečná nebo úplná inhibice PCR. To vede ke snížení citlivosti PCR nebo ke vzniku falešně negativních výsledků. Většina známých inhibitorů jsou organické sloučeniny (například močovina, fenol, ethanol, polysacharidy, dodecylsulfát sodný či proteiny, atd.) [38, 44].

Reakce může být také kontaminována i jedinou molekulou téže DNA, což postačuje k získání falešně negativního výsledku. Pro minimalizaci vzniku falešně negativních výsledků a inhibice PCR byly určeny standardní postupy (používání sterilních roztoků, UV světla, jednorázových rukavic, přidávání DNA do PCR směsi jako poslední v odděleném prostoru, aj...) [38].

2.5.3.1 Inhibitory PCR v rostlinných materiálech

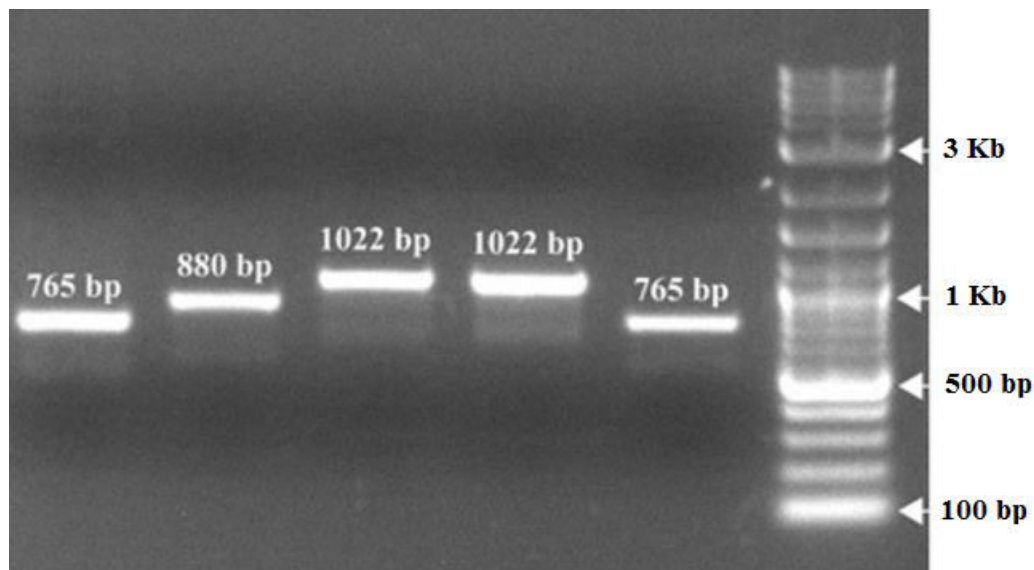
Rostlinné tkáně obsahují vysokou koncentraci polysacharidů, proteinů a sekundárních metabolitů – alkaloidy, flavonoidy, polyfenoly. Bobule jsou obvykle bohaté na fenoly (např. anthokyanin, flavonol či fenolové kyseliny) a polysacharidy (pektin). Tyto látky se extrahují společně s DNA a následně inhibují PCR. Polyfenoly způsobují degradaci DNA polymerázy či mění chemické vlastnosti nukleových kyselin. Polysacharidy mohou naopak ovlivnit syntézu nového řetězce DNA. Je velmi důležité tyto látky při izolaci DNA odstranit nebo alespoň snížit jejich koncentraci (viz kapitola 2.4) [44, 45].

2.5.4 Detekce produktů PCR pomocí agarózové gelové elektroforézy

Agarózová gelová elektroforéza je klasická metoda používaná při identifikaci, separaci a purifikaci fragmentů DNA různých velikostí (100 bp – 25 kb) získaných pomocí PCR. Jedná se o separační metodu, jejíž princip je založen na skutečnosti, že molekuly nukleových kyselin v roztoku se pohybují v elektrickém poli rychlostí závislou na poměru jejich náboje a hmotnosti. Rychlost pohybu (resp. dráha, kterou za určitý čas molekula biopolymeru urazí) je přímo úměrná intenzitě vloženého elektrického pole a celkovému náboji molekuly. Agarózový gel vytváří tzv. molekulové síto s kanálky, které umožňuje pohyb dělených molekul. Velikost pórů v gelu omezuje pohyblivost molekul. Obecně platí, že čím vyšší koncentrace agaróзовého gelu je, tím menší je velikost pórů pro průchod molekul [38, 39, 46, 47].

Nukleové kyseliny obsahují fosfátové skupiny, které nesou záporný náboj, tudíž se v elektrickém poli pohybují ke kladné elektrodě (anodě). Vzhledem k tomu, že nukleové kyseliny mají téměř stejný poměr náboje a hmotnosti, dělí se v agarózovém gelu především podle své velikosti. Dochází k tomu, že delší molekuly se pohybují pomaleji než molekuly

krátké. Za pomoci agarózové gelové elektroforézy lze rozlišit fragmenty DNA lišící se pouze o několik procent své délky a lze detegovat až 1 ng DNA. Pro stanovení velikosti jednotlivých fragmentů DNA se používají komerčně dostupné směsi fragmentů DNA definovaných velikostí tzv. DNA standard (Obrázek 6) [39, 46, 47].



Obrázek 6: Znárodnění různých velikostí fragmentů DNA a komerčně dostupné směsi fragmentů DNA o definované velikosti rozdělených pomocí agarózové gelové elektroforézy [47]

Rozdělené fragmenty DNA se pro zviditelnění obarvují vhodnými barvivými. Nejčastěji využívané barvivo je ethidium bromid. Jedná se o interkalační činidlo, které se váže mezi vlákna DNA a červeno-oranžově fluoreskuje po ozáření UV zářením ($\lambda = 305 \text{ nm}$). Vzniklý komplex je vizualizován na tzv. transiluminátoru. Pro obarvení fragmentů DNA lze využít i jiná barviva (SYBR Gold, SYBR Green). Tyto barviva jsou však podstatně dražší, ale méně toxická než ethidium bromid [39, 46, 47].

3 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce byla izolace DNA za pomoci dvou druhů magnetických částic z tepelně zpracovaných potravinových výrobků v kvalitě vhodné pro PCR. Pro analýzu byly vybrány rybízové džemy.

V práci byly řešeny jednotlivé dílčí úkoly následovně:

- homogenizace džemů za využití plastového kopistu či stomacheru a příprava lyzátů buněk pro izolaci DNA,
- izolace DNA za využití dvou druhů magnetických částic – P(HEMA-*co*-GMA) a PLL,
- spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA a zjištění kontaminace látkami inhibujícími PCR (polyfenoly a proteiny),
- ověření amplifikovatelnosti DNA pomocí PCR.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Potravinové výrobky (džemy) a DNA

Byly použity tepelně zpracované potravinové výrobky – domácí džemy. Přehled použitých džemů je zaznamenán v Tabulce 2.

Tabulka 2: Přehled použitých džemů

označení	druh výrobku	druh ovoce	rok výroby	želírovací přípravek
džem (2011)	džem	červený rybíz	2011	+
džem (2016; a)	džem	červený rybíz	2016	+
džem (2016; b)	džem	černý rybíz	2016	–

Pro porovnání vzorků, co se tepelného zpracování týče, byly pro diplomovou práci také použity čerstvé plody a listy červeného rybízu.

Jako kontrolní DNA byla použita DNA *Brassica oleracea* (10 ng/μl), která byla získána od RNDr. A. Kovaříka, CSc.

4.1.1.1 Příprava džemů

- džem z červeného rybízu s přídavkem želírovacího přípravku z roku 2011 a 2016

Želírovací přípravek (Quittin) byl za sucha smíchán s 350 g cukru v poměru 3:1. Byl odvážen 1 kg červeného rybízu. Navážka byla rozmixována a smíchána s cukrem a želírovacím přípravkem. Za stálého míchání byl džem přiveden k varu a byl povařen 5 minut (džem z roku 2011) nebo 10 minut (džem z roku 2016). Horký džem byl naplněn do dokonale čistých sklenic, které byly ihned uzavřeny.

- džem z černého rybízu bez želírovacího přípravku

1 kg černého rybízu byl rozmixován a smíchán s cukrem. Za stálého míchání byl džem přiveden k varu a byl povařen přibližně 30 minut, čímž došlo k zahuštění. Horký džem byl naplněn do čistých sklenic a ty byly ihned uzavřeny.

4.1.2 Chemikálie

- agaróza pro elektroforézu DNA (Serva, Heidelberg, SRN)
- cetyltrimethylammonium bromid – CTAB (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- ethanol (Merck, Darmstadt, SRN) pro UV spektrofotometrii
- ethidium bromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- ethylendiaminotetraoctová kyselina – EDTA (Serva, Heidelberg, SRN)
- fluorescenční barvivo GoldView (Ecoli, Bratislava, SR)
- hydroxid sodný (Lachema, Brno, ČR)
- isopropanol (PENTA, Praha, ČR)
- chlorid sodný (Lachema, Brno, ČR)

- chloroform (PENTA, Praha, ČR)
- kyselina boritá (PENTA, Praha, ČR)
- kyselina chlorovodíková (PENTA, Praha, ČR)
- oktanol (PENTA, Praha, ČR)
- β -merkapt ethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- polyethylenglykol 6000 – PEG 6000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- polyvinylpyrrolidin 1000 – PVP 1000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Tris-báze (Amresco, Solon, USA)

Všechny chemikálie byly v kvalitě p.a.

4.1.3 Magnetické nosiče

- magnetické mikročástice poly(2-hydroxyethylmethakrylát-*co*-glycidylmethakrylát) – P(HEMA-*co*-GMA)

Průměr částic byl 2,2 μm .

- magnetické nanočástice oxidů železa pokryté poly(L-lysinem) – PLL

Průměr částic byl 110 nm.

Částice byly připraveny na Molekulárním ústavu AV ČR v Praze Ing. Danielem Horákem, CSc.

4.1.4 Přístroje a pomůcky

- centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, SRN)
- centrifuga MINI (Labnet, New Jersey, USA)
- NanoDrop 2 000 (Termo Scientific, Wilmington, USA)
- mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Polsko)
- mini inkubátor (Labnet, New Jersey, USA)
- thermo cykler Bio-Rad PTC 200 (Bio-Rad Lab., USA)
- thermo shaker TS-100C (Biosan, Riga, LV)
- zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet, USA)
- běžné laboratorní sklo, materiál a pomůcky

4.1.5 Roztoky pro izolaci DNA

- EDTA (0,5 M; pH 8,0)

Navážka 186,1 g EDTA byla rozpuštěna v 800 ml destilované vody. pH bylo upraveno přidáním 20 g hydroxidu sodného na hodnotu 8,0. Roztok byl doplněn destilovanou vodou do 1 litru, rozdělen do alikvotů a poté byl sterilizován při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

- ethanol (70%)

Bylo smícháno 70 ml 96% ethanolu s 26 ml destilované vody.

- lyzační roztok s CTAB

1 g CTAB byl rozpuštěn v 10 ml 0,5 M Tris-HCl, 16 ml 5 M NaCl, 2 ml 0,5 M EDTA a 42 ml destilované vody.

- modifikovaný lyzační roztok s CTAB a PVP

1 g CTAB a 0,4 g PVP bylo rozpuštěno v 10 ml 0,5 M Tris-HCl, 16 ml 5 M NaCl, 2,25 ml 0,5 M EDTA a 42 ml destilované vody.

- roztok chloridu sodného (3 M)

Navážka 87,66 g NaCl byla rozpuštěna v 500 ml destilované vody.

- roztok chloridu sodného (5 M)

Navážka 87,66 g NaCl byla rozpuštěna v 300 ml destilované vody.

- roztok 40% polyethylenglykolu 6 000

Bylo naváženo 40 g PEG 6 000. Tato navážka byla rozpuštěna v 60 ml destilované vody a objem byl destilovanou vodou doplněn do 100 ml.

- směs chloroform-oktanol

Chloroform-oktanol byl smíchán v poměru 24:1.

- TE pufr

1 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0) byl smíchán s 0,2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0). Roztok byl doplněn do 100 ml destilovanou vodou. Výsledný roztok byl rozdělen do alikvotních podílů.

- TEN pufr

Byl smíchán 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,8), 2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 3,45 ml 3 M NaCl. Tento roztok byl doplněn destilovanou vodou do 100 ml.

- Tris-HCl (1M; pH 7,8)

Navážka 121,1 g Tris-báze byla rozpuštěna v 800 ml destilované vody. pH roztoku bylo upraveno koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu 7,8. Objem byl doplněn destilovanou vodou na 1 l a poté byl sterilizován při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

4.1.6 Komponenty pro PCR

- DNA polymeráza o koncentraci 1 U/μl a 5 U/μl (TopBio, Praha, ČR)
- dNTP směs 10 mM (Top Bio, Praha, ČR)
- primery 18S_for a 5,8S_rev (10 pmol/μl) (GENERI BIOTECH, Hradec Králové, ČR)

Sekvence primerů je uvedena v Tabulce 3 [48].

Tabulka 3: Sekvence primerů 18S_for a 5,8S_rev

primer	sekvence
18S_for	5'-GCG CTA CAC TGA TGT ATT CAA CGA G-3'
5,8S_rev	5'-CGC AAC TTG CGT TCA AAG ACT CGA-3'

- reakční pufr kompletní (10x koncentrovaný) (TopBio, Praha, ČR)

Složení: 750 mM Tris-HCl (pH 8,8 při 25 °C), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 1% Tween 20, 25 mM MgCl₂.

- voda pro PCR (voda pro injekce, Braun, Melsungen, Německo)
- PCR Enhancer (zesilovač) (TopBio, Praha, ČR)

Složení: 0,1 M TMA (tetramethylammonium oxalát) v PCR vodě.

4.1.7 Roztoky pro agarózovou gelovou elektroforézu

- agarózový gel 1,2%

0,6 g agarózy bylo rozpuštěno v 50 ml 0,5x TBE pufru.

- DNA standard 100 bp žebříček (Malamité, Moravské Prusy, ČR)

Obsahuje fragmenty DNA délky 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1 000, 1 200 a 1 400 bp.

- ethidium bromid 0,5 μg/ml

50 μl ethidium bromidu (10 ng/μl) bylo smícháno s 1 l destilované vody.

- TBE pufr (5x)

Navážka 54 g Tris-báze a 27,5 g kyseliny borité byla rozpuštěna v 20 ml EDTA (pH 8,0). Roztok byl následně doplněn do 1 l destilovanou vodou. Před použitím byl pufr zředěn destilovanou vodou 10x.

- PCR vkládací pufr Yellow load (TopBio, Praha, ČR)

4.2 Metody

4.2.1 Homogenizace džemů, plodů a listů plastovým kopistem a příprava lyzátů buněk pro izolaci DNA

Do 1,5 ml Eppendorfových zkumavek byl sterilně odvážen 0,1–1 g vzorku – džemů, rozmáčknutých plodů, na malé kousky nakrájených listů či zrníček nacházejících se v džemech. Následně bylo do Eppendorfovy zkumavky přidáno 500 μ l lyzačního roztoku s CTAB (případně modifikovaného lyzačního roztoku s CTAB a PVP) a 1 μ l merkptoethanolu. Pomocí plastového kopistu byla provedena homogenizace. Vzorek byl po celou dobu chlazen. Zhomogenizovaný vzorek byl následně inkubován při 60 °C po dobu 30 minut.

1) Po centrifugaci (10 minut; 14 500 otáček) byl odebrán supernatant, který byl použit pro izolaci DNA pomocí magnetických částic.

2) Ke vzorku džemu bylo přidáno 500 μ l směsi chloroform-oktanol a vzorek byl centrifugován 10 minut (14 500 otáček). Po centrifugaci se v Eppendorfově zkumavce vytvořily tři vrstvy. Do čisté Eppendorfovy zkumavky byla odpipetována vrchní fáze, která obsahovala DNA. Takto připravený vzorek byl použit pro izolaci DNA pomocí magnetických nosičů.

4.2.2 Homogenizace džemů za pomoci stomacheru a příprava homogenátů pro izolaci DNA

Do plastového sáčku pro stomacher bylo naváženo 20 g džemu. Při vážení bylo dbáno především na to, aby se navážka nacházela na dně sáčku a ne po stěnách. K navážce bylo přidáno 20 ml TEN pufru, sáček se směsí byl vložen do stomacheru a homogenizace probíhala 2 minuty. Po ukončení homogenizace byl oddělený supernatant slit ze sáčku do 15 ml zkumavek.

Vzniklý homogenát byl testován bez centrifugace a s centrifugací (14 500 g/5 minut). Centrifugace sloužila především k odstranění hrubých částic z homogenátu.

Do čtyř 2 ml Eppendorfových zkumavek bylo odpipetováno 750 μ l supernatantu vzniklého homogenizací za pomoci stomacheru. Jedna zkumavka byla ponechána pro separaci magnetickými částicemi (I).

K ostatním vzorkům bylo přidáno 750 μ l lyzačního roztoku s CTAB s přídavkem merkptoethanolu (3 μ l merkptoethanolu + 3 ml lyzačního roztoku s CTAB) nebo 750 μ l lyzačního roztoku s CTAB a PVP s přídavkem merkptoethanolu. Vzorky byly následně inkubovány za stálého protřepávání 1 hodinu při 65 °C. Jeden vzorek byl po inkubaci ponechán pro separaci magnetickými částicemi. Tento vzorek byl následně centrifugován 10 minut při 13 500 g. Po centrifugaci byl do čisté Eppendorfovy zkumavky odebrán supernatant (II).

Z ostatních zkumavek bylo do sterilních Eppendorfových zkumavek odpipetováno 650 μ l vzorku. K odpipetovanému podílu bylo přidáno 650 μ l chloroform-oktanolu. Vzorky byly míchány kývavým pohybem při laboratorní teplotě po dobu 4 minut. Následně byly vzorky centrifugovány 10 minut při 13 500 g. Po centrifugaci byla odebrána vodní fáze,

jenž obsahovala DNA. Jeden ze vzorků byl ponechán pro separaci pomocí magnetických částic (III).

K poslednímu vzorku bylo přidáno 0,6 objemu isopropanolu a vzorek byl inkubován 5 minut při laboratorní teplotě. Vzorek byl následně centrifugován 10 minut při 13 500 g. Po centrifugaci byl slit supernatant a sediment byl sušen při 60 °C 3 minuty. Usušený sediment byl rozpuštěn v 600 µl TE pufru (IV).

Stejným způsobem byl testován i centrifugovaný homogenát. Postup byl obdobný jako u necentrifugovaného homogenátu s výjimkou toho, že homogenát byl odpipetován do Eppendorfových zkumavek, které byly následně centrifugovány (3 minuty; 14 500 g). 500 µl vzniklého supernatantu bylo odpipetováno do čtyř 2 ml Eppendorfových zkumavek. Jedna zkumavka byla ponechána pro separaci magnetickými částicemi (I). K ostatním vzorkům bylo přidáno 500 µl lyzačního roztoku s CTAB s přídavkem merkptoethanolu (3 µl merkptoethanolu + 3 ml lyzačního roztoku s CTAB).

Vzorky byly následně využity při izolaci DNA za pomoci magnetických částic PLL (kapitola 4.3.2.) nebo byly uchovány v lednici (4 °C).

4.2.3 Izolace DNA pomocí magnetických částic

4.2.3.1 Magnetické částice P(HEMA-co-GMA)

K izolaci rostlinné DNA byly využity magnetické nosiče P(HEMA-co-GMA) o koncentraci 2 mg/ml. Nejprve byla připravena separační směs, jejíž složení a pořadí komponent je zaznamenáno v Tabulce 4. Výsledná koncentrace NaCl byla 2 M a PEG 6 000 16 a 8%.

Tabulka 4: Komponenty pro přípravu směsi k izolaci DNA pomocí magnetických nosičů P(HEMA-co-GMA)

pořadí	komponenta	PEG 6000 [µl]	
		16%	8%
1	NaCl (5 M)	400	400
2	lyzát buněk (DNA)	100	300
3	PEG 6 000 (40 %)	400	200
4	magnetické částice (2 mg/ml)	100	100
výsledný objem		1 000	1 000

Připravená směs byla následně inkubována při laboratorní teplotě po dobu 15 minut. Poté byly vzorky vloženy do magnetického separátoru a separace probíhala 5 minut. Supernatant byl odpipetován a magnetické nosiče s navázanou DNA byly promyty 500 µl 70% ethanolu. Separace probíhala dvě minuty, následně byl opět odpipetován supernatant a částice byly stejným postupem promyty 100 µl 70% ethanolu. Po promytí a usušení bylo přidáno 50–100 µl TE pufru, ve kterém byla DNA eluována po dobu 1 hodiny. Následně byly magnetické nosiče odseparovány od DNA a DNA byla přenesena do čisté Eppendorfovy zkumavky. U DNA připravené tímto způsobem byla za pomoci spektrofotometru proměřena její koncentrace (4.2.5) a byla použita jako DNA matrice v PCR (4.2.6).

4.2.3.2 Magnetické nanočástice PLL

DNA ze vzorků připravených dle kapitoly 4.2.2 byla následně separována za pomoci separačních směsí, které obsahovaly magnetické částice PLL. Jednotlivé komponenty a jejich objemy jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5: Komponenty pro izolaci DNA ze vzorků džemů za pomoci magnetických částic PLL

pořadí	komponenta	objem [μl]
1	NaCl (5 M)	800
2	lyzát buněk (DNA)	600
3	PEG 6 000 (40 %)	400
4	magnetické částice (0,5 mg/ml nebo 0,1 mg/ml)	200
výsledný objem		2 000

Inkubace a následná separace na magnetickém separátoru probíhala stejným způsobem, jako je uvedeno v kapitole 4.2.3.1. Eluce DNA probíhala přes noc v 50 μl TE pufru, čímž došlo i k zakoncentrování DNA. Po eluci byly získané roztoky DNA odpipetovány do čistých Eppendorfových zkumavek a u vzorků byly spektrofotometricky změřeny koncentrace (4.2.5). DNA byla použita jako DNA matrice do PCR (4.2.6).

4.2.4 Zakoncentrování DNA izolované magnetickými částicemi P(HEMA-co-GMA)

Po homogenizaci džemů bez přídavku chloroform-oktanolu (kapitola 4.2.1) a následné separaci DNA za pomoci magnetických nosičů P(HEMA-co-GMA) (kapitola 4.2.3.1) byly připraveny čtyři vzorky od každého džemu. Čtyři vzorky byly také připraveny z plodů a listů červeného rybízu. Vzorky patřící k sobě byly následně smíchány a 300 μl takto připraveného vzorku bylo smícháno se 17,5 μl 3M NaCl a 900 μl 96% ethanolu. Následně byly vzorky ponechány 15 minut v mrazáku (-20 °C). Po uplynulé době byly vzorky stočeny po dobu 15 minut při 14 500 g. Po centrifugaci byl supernatant slit a sediment byl sušen 10 minut v exikátoru. Sušení se provádělo velmi opatrně, aby nedošlo ke ztrátě a přesušení DNA. Sediment byl po usušení rozpuštěn v 30 μl TE pufru. U vzorků připravených tímto způsobem byla spektrofotometricky měřena koncentrace DNA (kapitola 4.2.5).

4.2.5 Stanovení koncentrace izolované DNA

Koncentrace rostlinné DNA, která byla izolovaná za pomoci magnetických nosičů z džemu (4.2.3), byla měřena spektrofotometricky. Koncentrace DNA byla měřena na přístroji a v programu NanoDrop 2000. Čočka na přístroji byla nejprve očištěna pomocí PCR vody a poté na ní byly nanесeny 2 μl TE pufru (blank), čímž byla na přístroji nastavena nulová hodnota. V programu bylo nastaveno měření pro nukleové kyseliny. Následně byla čočka osušena a byly na ní nanесeny 2 μl vzorku. Na spektrofotometru byla odečtena absorbance v rozmezí vlnových délek 220 – 350 nm a koncentrace DNA.

4.2.6 Příprava směsí pro PCR a provedení PCR

Rostlinná DNA, jejíž koncentrace byla zjištěna spektrofotometricky (4.2.5), byla naředěna 10x a 100x. Takto připravená DNA byla použita jako matrice pro PCR. Komponenty pro PCR směs byly důkladně promíchány a následně byly odpipetovány požadované objemy do mikrozkušavek. Jednotlivé komponenty byly přidávány v pořadí, které je uvedeno v Tabulce 6 pro DNA polymerázu o koncentraci 5 U/μl a v Tabulce 7 pro DNA polymerázu o koncentraci 1 U/μl.

Tabulka 6: Komponenty pro přípravu PCR směsi při použití DNA polymerázy o koncentraci 5 U/μl

pořadí	komponenta	objem [μl]
1	voda pro PCR	17,1
2	reakční pufr kompletní	2,5
3	primer 18S_for (10 pmol/μl)	1
4	primer 5,8S_rev (10 pmol/μl)	1
5	dNTP (10 mM)	1
6	Taq DNA polymeráza (5 U/μl)	0,4
7	DNA matrice	2
výsledný objem		25

Tabulka 7: Komponenty pro přípravu PCR směsi při použití DNA polymerázy 1.1 o koncentraci 1 U/μl

pořadí	komponenta	objem [μl]
1	voda pro PCR	16,5
2	reakční pufr kompletní	2,5
3	primer 18S_for (10 pmol/μl)	1
4	primer 5,8S_rev (10 pmol/μl)	1
5	dNTP (10 mM)	1
6	Taq DNA polymeráza 1.1 (1 U/μl)	1
7	DNA matrice	2
výsledný objem		25

Pro amplifikaci fragmentu dlouhého 700 bp bylo použito 35 cyklů. Na cykleru byl nastaven program ROST700, jehož nastavení je zaznamenáno v Tabulce 8.

Tabulka 8: Program PCR ROST700

teplota [°C]	čas [s]	počet opakování
95	300	1
95	40	35
57	40	
72	80	
72	600	1
10	∞	1

Produkty PCR byly použity pro agarózovou gelovou elektroforézu nebo byly uchovávány při -20 °C.

Ke zvýšení množství PCR produktu byl využit PCR enhancer, kterého se do směsi přidávalo 0,5 µl na úkor PCR vody (Tabulka 7).

4.2.7 Detekce produktů PCR agarózovou gelovou elektroforézou

Pro agarózovou gelovou elektroforézu byl připraven 1,2% agarózový gel. Na laboratorních vahách bylo do Erlenmeyerovy baňky naváženo 0,6 g agarózy a následně bylo přidáno 50 ml 0,5 M TBE pufru. Směs byla povařena v mikrovlnné troubě. Do směsi bylo přidáno 0,5 µl barviva Gold View a následně byla směs nalita do předem připravené elektroforetické vaničky s hřebínkem, kde byla ponechána ztuhnout.

Do takto připraveného a zatuhlého 1,2% agarózového gelu byly následně nanášeny produkty PCR, které byly smíchány s 5 µl PCR vkladacího pufru Yellow load. Na gel bylo nanášeno 15–20 µl směsi. Pro stanovení velikosti fragmentu byl použit DNA standard 100 bp žebříček. Pro kontrolu byly připraveny také pozitivní a negativní kontroly. Negativní kontrola obsahovala místo DNA PCR vodu a pozitivní kontrola obsahovala DNA z *B. oleracea* o koncentraci 10 ng/µl. Elektroforéza probíhala při 60 V po dobu cca 3 hodin. Dokumentace gelu byla provedena fotograficky.

Alternativně byla DNA po skončení gelové elektroforézy barvena v roztoku ethidium bromidu (0,5 µg/ml) po dobu 30 minut.

5 VÝSLEDKY

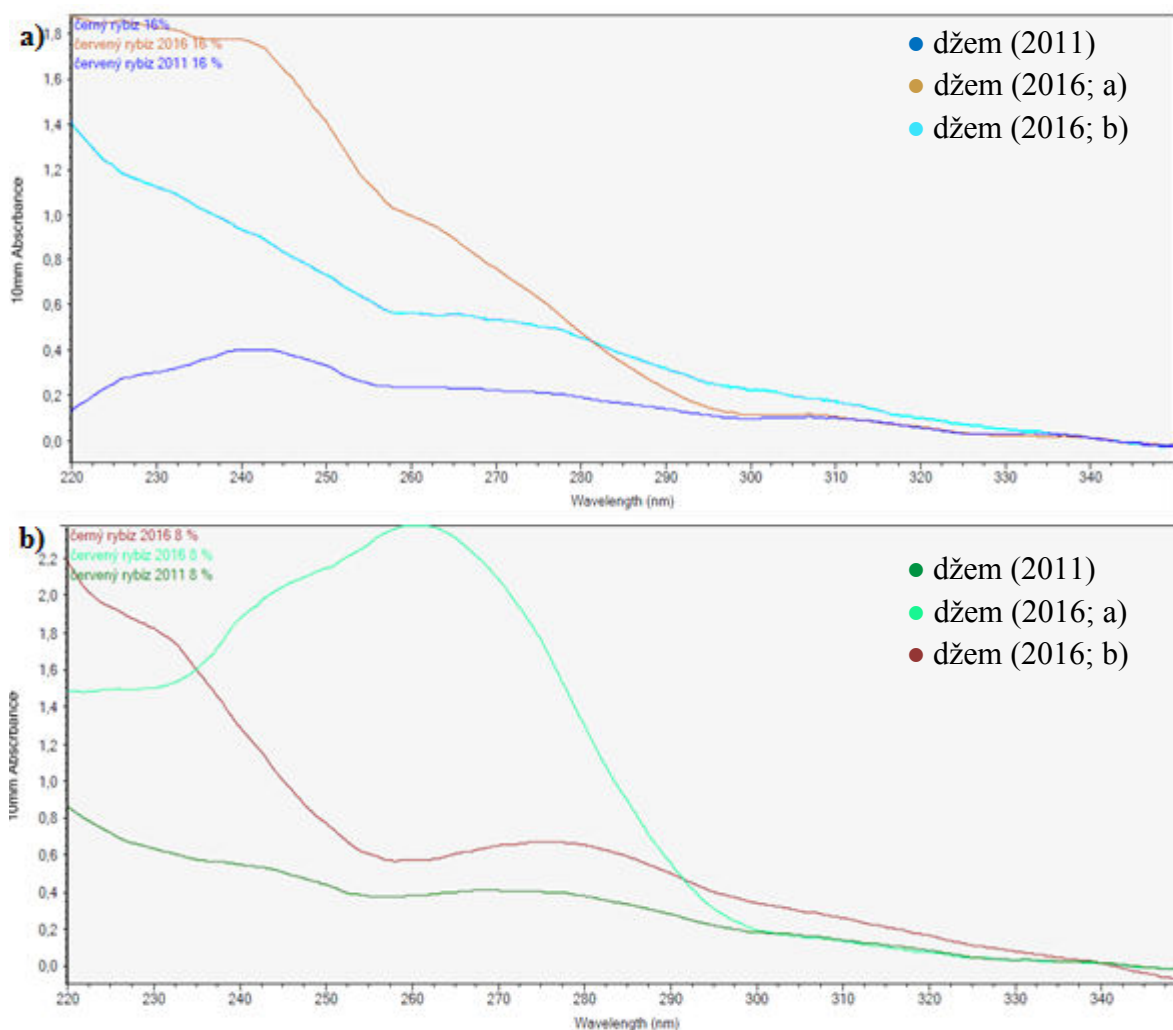
5.1 Testování separace DNA částicemi P(HEMA-co-GMA) přímo z rybízových džemů (bez homogenizace)

Tato metoda byla využita z toho důvodu, že již při přípravě džemů dochází k rozrušení buněk. Vzorky džemů byly naředěny v poměru 1:1 sterilní vodou (bez homogenizace v lyzačním roztoku s CTAB). Následně byly namíchány dvě separační směsi s magnetickými nosiči P(HEMA-co-GMA) o různých koncentracích PEG 6000 (16% a 8%). Složení směsí a jednotlivé komponenty jsou zaznamenány v Tabulce 4. Připravené směsi byly inkubovány a separovány stejným postupem, jako je uvedeno v kapitole 4.2.3.1. Vzorky DNA byly následně podrobeny spektrofotometrickému stanovení koncentrace (4.2.5) a DNA byla testována v PCR.

Naměřené koncentrace DNA jsou zaznamenány v Tabulce 9. Závislosti absorbance DNA na vlnové délce jsou zobrazeny na Obrázku 7.

Tabulka 9: Koncentrace DNA izolované za pomoci magnetických částic P(HEMA-co-GMA) z džemů (1 g) v prostředí 8 a 16% PEG 6000

DNA	PEG 6000 [%]	c DNA [ng/μl]	A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{260nm} /A _{280nm}	A _{260nm} /A _{230nm}	DNA [ng]
džem (2011)	16	11,20	0,29	0,22	0,18	1,24	0,78	1 120
džem (2016; a)		49,20	1,82	0,98	0,47	2,10	0,54	4 920
džem (2016; b)		27,60	1,10	0,55	0,45	1,24	0,50	2 760
džem (2011)	8	18,20	0,62	0,36	0,36	1,00	0,59	1 820
džem (2016; a)		118,20	1,49	2,37	1,30	1,82	1,59	11 820
džem (2016; b)		27,80	2,07	0,64	0,64	0,87	0,31	2 780



Obrázek 7: Křivky závislosti absorbance DNA na vlnové délce. DNA byla izolovaná ze vzorků džemů bez homogenizace v lyzačním roztoku s CTAB,

a) DNA izolovaná částicemi P(HEMA-*co*-GMA) v prostředí s 16% PEG 6000,

b) DNA izolovaná částicemi P(HEMA-*co*-GMA) v prostředí s 8% PEG 6000

» DNA byla izolovaná v různém množství v závislosti na džemu. Separační směs s 8% PEG 6000 vedla k izolaci většího množství DNA (18,20 – 118,20 ng/μl) než separační směs s 16% PEG 6000 (11,20 – 49,20 ng/μl).

5.1.1 Vizualizace DNA na gelu

Jelikož byly naměřeny vyšší koncentrace DNA (Tabulka 9), byla izolovaná DNA ihned nanesena na gel (25 μ l). Výsledný gel je zobrazen na Obrázku 8.



běh	DNA	PEG 6000 [%]	DNA [ng]	detekce DNA	degradace DNA
1	džem (2011)	16	280	–	+
2		8	455	–	+
3	džem (2016; a)	16	1 230	–	+
4		8	2 955	–	+
5	džem (2016; b)	16	690	–	+
6		8	695	–	+
7	lambda		250	+	–
8	lambda		500	++	–
9	lambda		1 000	+++	–

Pozn.: +, ++, +++ detekce DNA v různé intenzitě, – DNA nebylo nedetegováno

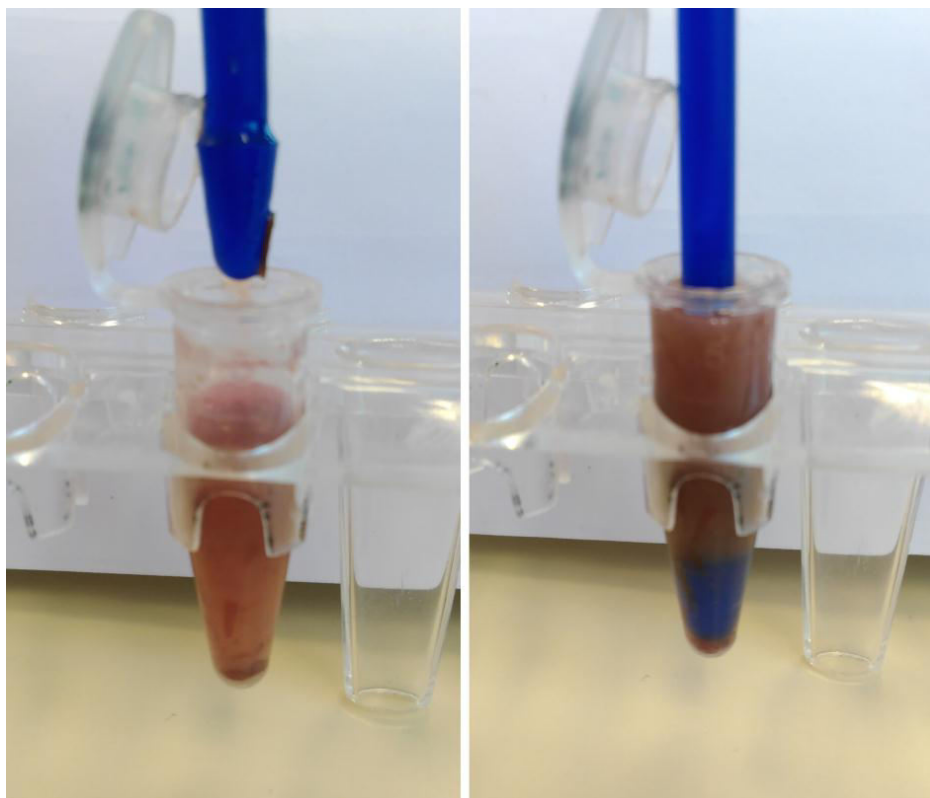
Obrázek 8: Agarózová gelová elektroforéza DNA izolované z džemů částicemi P(HEMA-*co*-GMA) bez homogenizace

» DNA nebyla na gelu vizualizovaná.

5.2 Homogenizace džemů, plodů a listů červeného rybízu

5.2.1 Testování homogenizace v lyzačním roztoku s CTAB pomocí kopistu

K homogenizaci džemů, plodů a listů rybízu a k rozrušení tkání byla testována homogenizace v lyzačním roztoku s CTAB za pomoci plastového kopistu, která probíhala za stálého chlazení dle postupu v kapitole 4.2.1. Tato homogenizace je zobrazena na Obrázku 9.

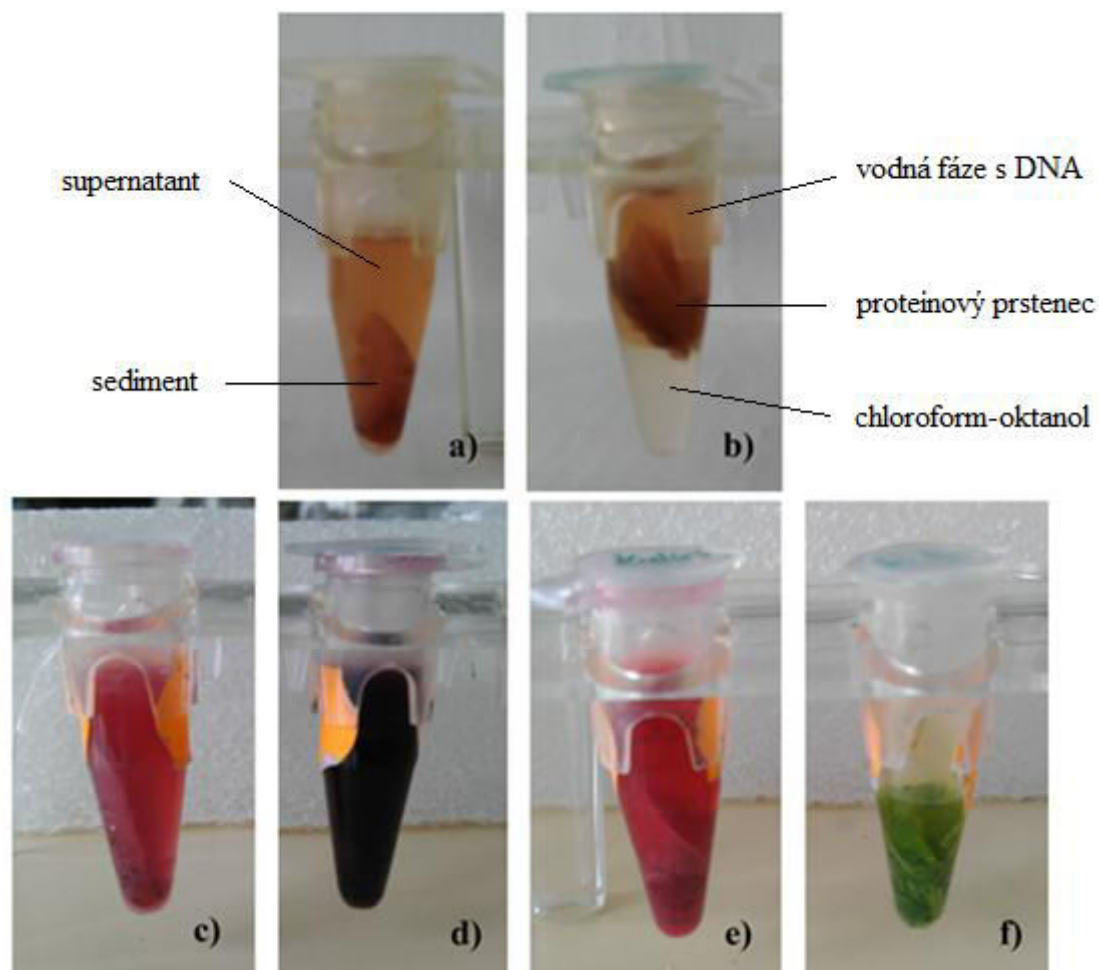


Obrázek 9: Homogenizace džemu – džem (2011) (0,1 g) v Eppendorfově zkumavce za pomoci kopistu

» Všechny typy vzorků se podařilo zhomogenizovat v lyzačním roztoku s CTAB plastovým kopistem.

5.2.2 Příprava homogenátů s přídavkem nebo bez přídavku chloroform-oktanolu

Vzorek džemu v lyzačním roztoku s CTAB a s přídavkem nebo bez přídavku chloroform-oktanolu byl následně inkubován a poté centrifugován (dle postupu 4.2.1). Po centrifugaci došlo k rozdělení do vrstev (viz Obrázek 10).



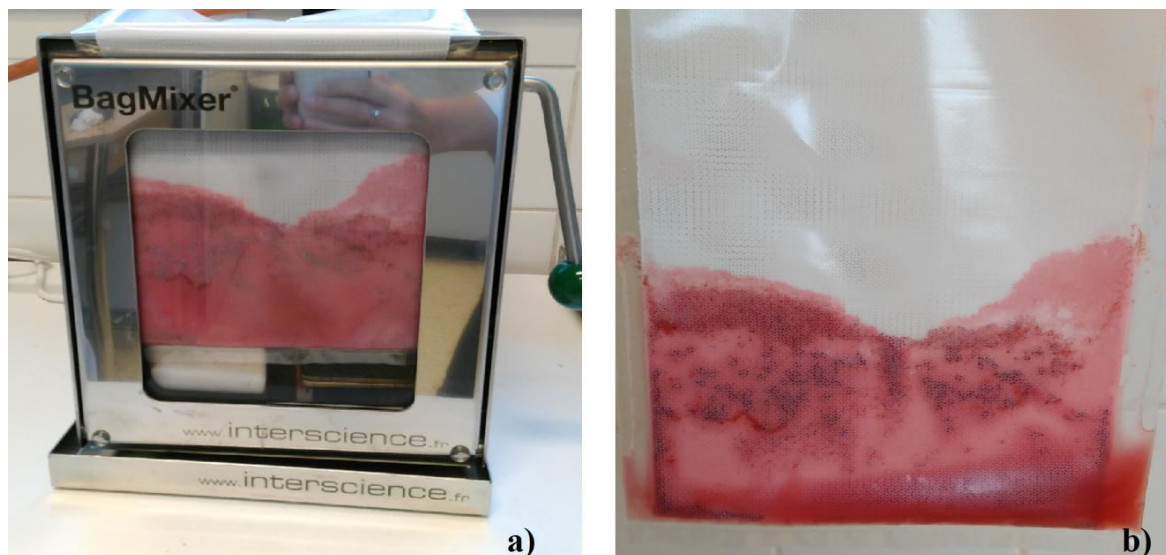
Obrázek 10: Vzorky po homogenizaci a centrifugaci;

- a) džem (2011) v lyzačním roztoku s CTAB,
- b) džem (2011) v lyzačním roztoku s CTAB s přídavkem chloroform-oktanolu,
- c) džem (2016; a) v lyzačním roztoku s CTAB,
- d) džem (2016; b) v lyzačním roztoku s CTAB,
- e) plody červeného rybízu v lyzačním roztoku s CTAB,
- f) listy červeného rybízu v lyzačním roztoku s CTAB.

» Po homogenizaci v lyzačním roztoku s CTAB a následné centrifugaci došlo k rozdělení složek homogenátů do vrstev. Vzorky nebyly čiré, což může ovlivňovat spektrofotometrické stanovení DNA.

5.2.3 Testování homogenizace v TEN pufru za pomoci stomacheru

Jako další způsob pro homogenizaci džemů byl využit stomacher dle postupu uvedeným v kapitole 4.2.2. Homogenizace se provádí kopistem v jednorázových plastových sáčcích s membránou, což na rozdíl od přímé homogenizace zabraňuje průniku větších kousků do vzorku. Sáček umístěný ve stomacheru a výsledek po homogenizaci je zobrazený na Obrázku 11.



Obrázek 11: Homogenizace vzorku džemu (2016; a) ve stomacheru (20 g džemu/ 20 ml TEN pufru), a) sáček umístěný ve stomacheru, b) homogenizovaný vzorek s uvolněným roztokem (homogenát)

» Stomacherem byly úspěšně homogenizovány všechny vzorky džemů.

5.3 Testování izolace DNA částicemi P(HEMA-co-GMA) z homogenátů rybízového džemu (2011) s přídavkem a bez přídavku chloroform-oktanolu

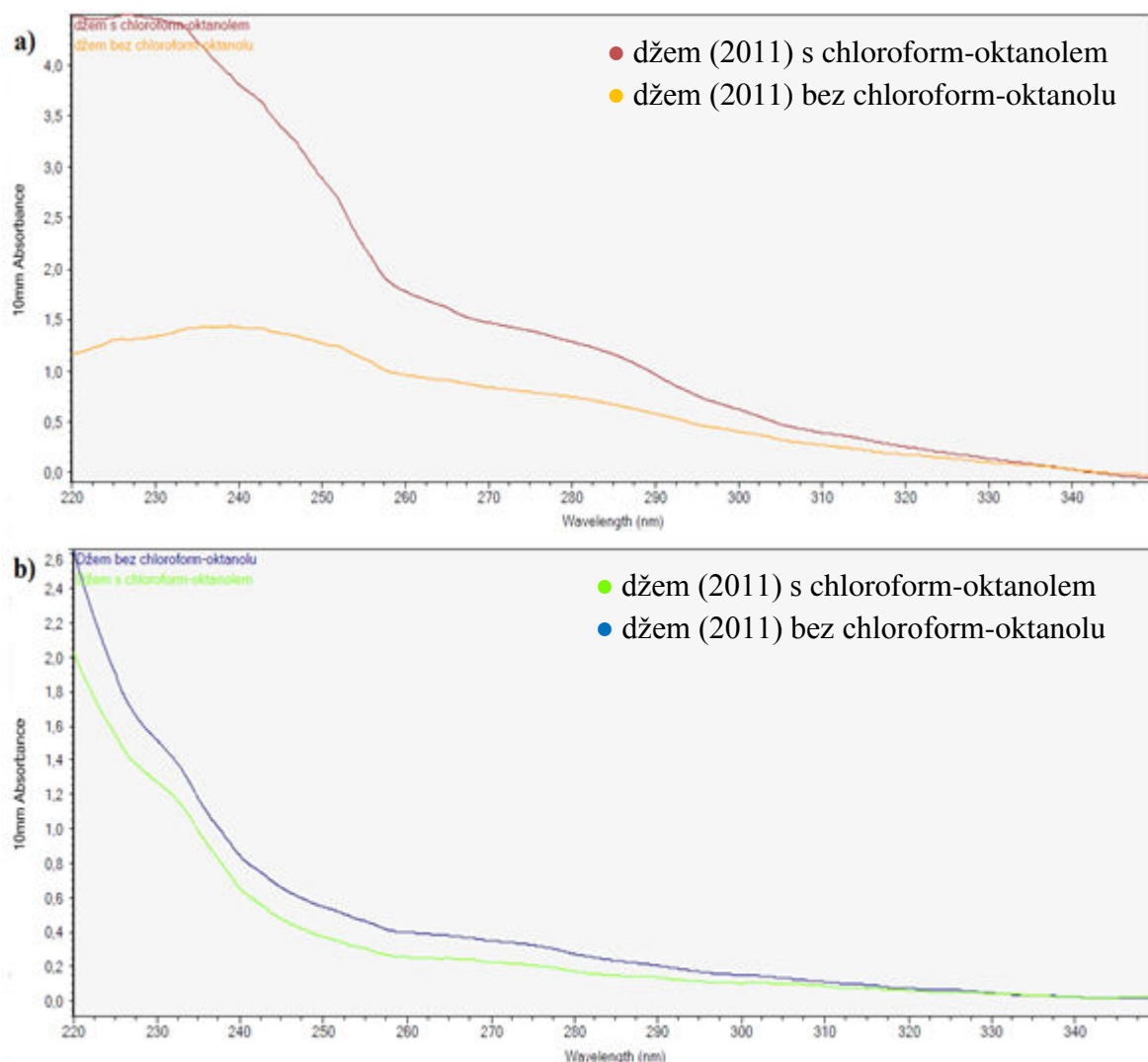
Tento džem byl vybrán pro testování metody v přítomnosti či nepřítomnosti přídavku chloroform-oktanolu. DNA byla izolovaná dle postupu 4.2.3.1 z homogenátů připravených plastovým kopistem (4.2.1). Kvalita izolované DNA byla ověřována spektrofotometricky a pomocí PCR. Bylo testováno použití homogenátu v lyzačním roztoku s CTAB bez přídavku chloroform-oktanolu a v lyzačním roztoku s CTAB s přídavkem chloroform-oktanolu. Koncentrace izolované DNA byla měřena spektrofotometricky (4.2.5). Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 10. Křivky závislosti absorpance na vlnové délce (220–350 nm) jsou znázorněny na Obrázku 12.

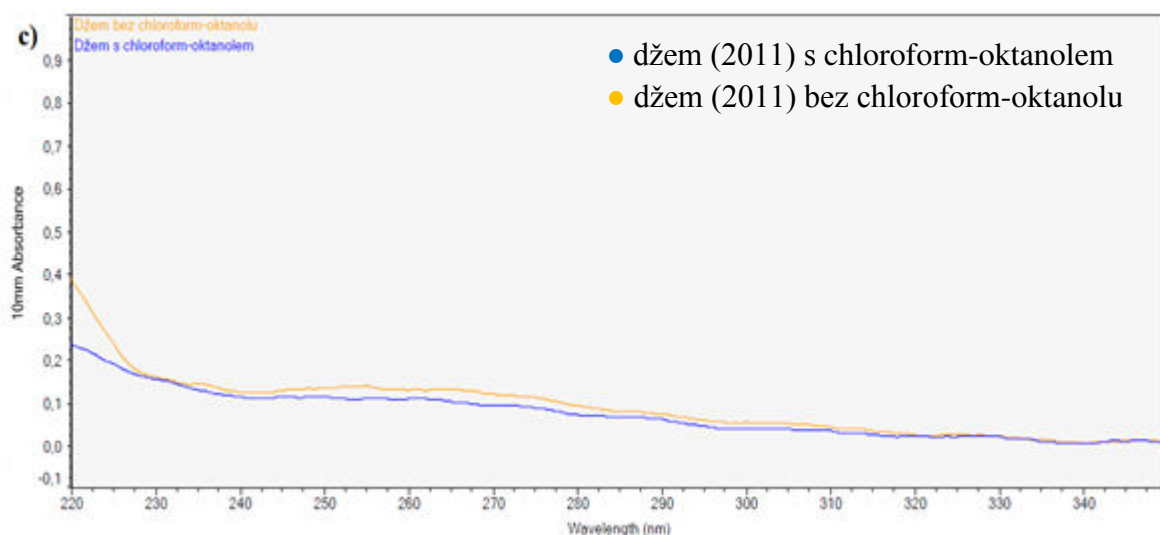
Tabulka 10: Koncentrace a množství DNA izolované z homogenátu v lyzačním roztoku s CTAB (500 μ l) po přidavku nebo bez přidavku chloroform-oktanolu. DNA byla izolována ve 3 opakováních z 1 g džemu (2011)

vzorek	lyzační roztok s CTAB	přídavek chloroform-oktanolu	c DNA [ng/ μ l]	A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{260nm} /A _{280nm}	A _{260nm} /A _{230nm}	DNA [ng]
1	+	+	87,50	4,49	1,75	1,26	1,39	0,39	4 375
		–	46,40	1,31	0,93	0,71	1,30	0,71	2 320
2	+	+	11,60	1,29	0,23	0,15	1,56	0,18	1 160
		–	18,80	1,51	0,38	0,25	1,50	0,25	1 880
3	+	+	5,10	0,15	0,10	0,07	1,57	0,69	510
		–	6,10	0,15	0,12	0,09	1,41	0,80	610

Pozn.: + homogenizace v lyzačním roztoku s CTAB

+ s přítomností chloroform-oktanolu, – bez přítomnosti chloroform-oktanolu



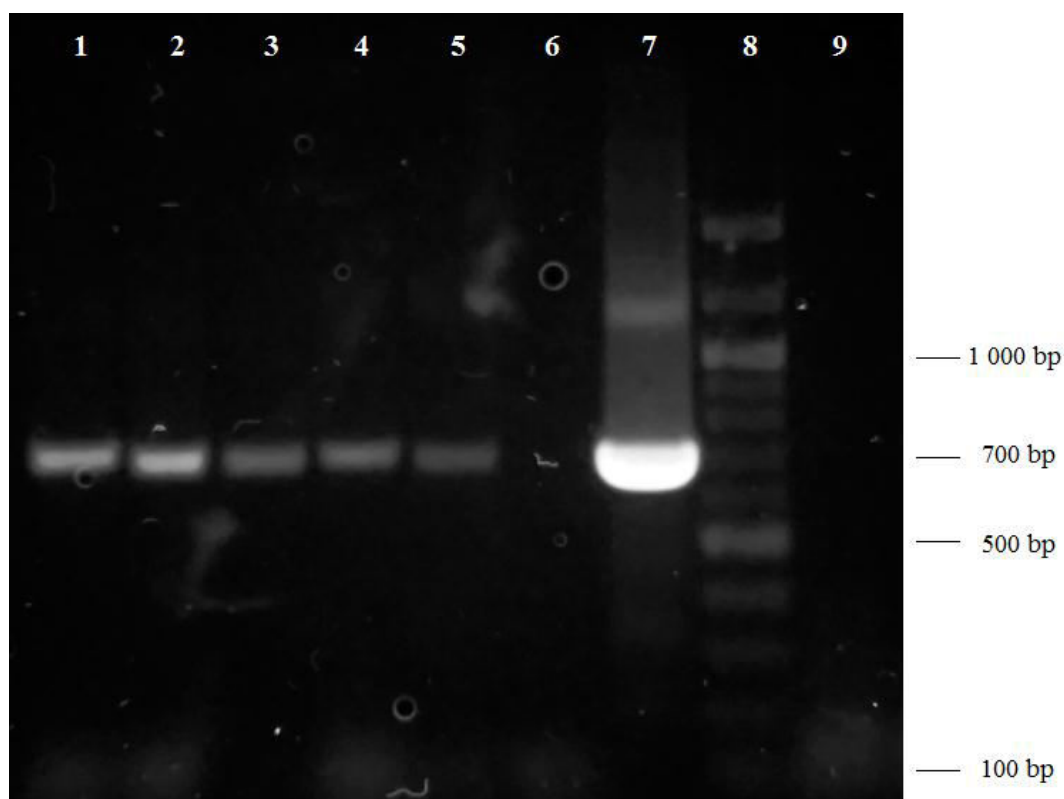


Obrázek 12: Závislosti absorbance DNA na vlnové délce; a) vzorek č. 1, b) vzorek č. 2, c) vzorek č. 3, DNA byla izolována z 0,1 g rybízového džemu ve 3 opakováních

» DNA byla izolovaná v různých koncentracích a byla znečištěna. Přídavek chloroform-oktanolu výrazně neovlivňoval hodnotu $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ (kromě vzorku č. 1). Množství izolované DNA se lišilo, což bylo zapříčiněno různým obsahem zrněk ve vzorku. Koncentrace DNA byla dostačující k provedení PCR.

5.3.1 Amplifikace DNA

DNA izolovaná z džemu (2011) byla amplifikována (podle postupu uvedeného v kapitole 4.2.6) za použití primeru 18S_for, primeru 5,8S_rev a Taq DNA polymerázy (5U/μl) (kapitola 4.2.6, Tabulka 6). Amplifikace probíhala podle programu, který je uveden v Tabulce 8. Jako pozitivní kontrola byla využita DNA *Brassica oleracea* (10 ng/μl). Výsledky detekce produktů PCR jsou zobrazeny na Obrázku 13.



běh	DNA	lyzační roztok s CTAB	přídavek chloroform-oktanolu	DNA/PCR směs [ng]	produkt PCR	inhibitory
1	džem (2011)	+	–	21,0	++	–
2		+	–	2,10	++	–
3		+	–	0,21	++	–
4		+	+	17,8	++	–
5		+	+	1,78	++	–
6		+	+	0,18	–	–
7	pozitivní kontrola	<i>B. oleracea</i>		20,00	+++	–
8	standard					
9	negativní kontrola				–	–

Pozn.: +, ++, +++ produkt PCR detegován v různé intenzitě, – produkt PCR nedetegován

Obrázek 13: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (700 bp). Amplifikovaná byla DNA izolovaná z džemu (2011) homogenizovaným v lyzačním roztoku s CTAB s nebo bez přídavku chloroform-oktanolu za použití primeru 18S_for a primeru 5,8S_rev.

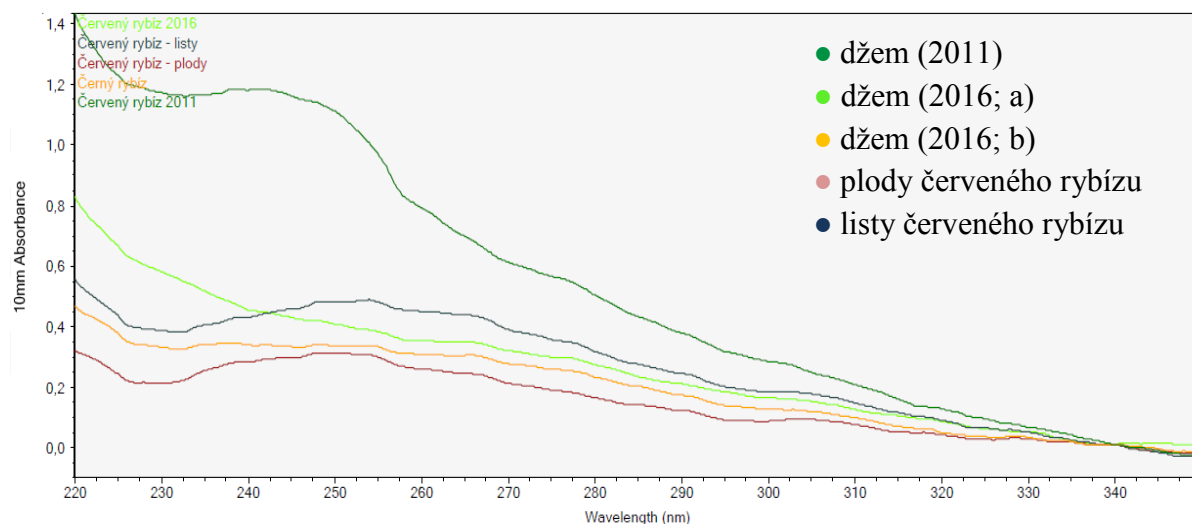
» DNA izolovaná pomocí magnetických částic P(HEMA-co-GMA) z džemu (2011) se amplifikovala v PCR. Pro další práci byl používán homogenát v lyzačním roztoku s CTAB bez přídavku chloroform-oktanolu.

5.4 Izolace DNA z různých džemů, plodů červeného rybízu a listů částicemi P(HEMA-co-GMA)

V kapitole 5.3 bylo určeno, že izolace DNA nosiči P(HEMA-co-GMA) bude prováděna z homogenátů v lyzačním roztoku s CTAB bez přídavku chloroform-oktanolu. Metoda byla použita pro izolaci DNA z homogenátů (4.2.1) všech analyzovaných vzorků nosiči P(HEMA-co-GMA) dle postupu 4.2.3.1. Naměřené hodnoty koncentrací DNA jsou uvedeny v Tabulce 11. Křivky závislosti absorbance DNA na vlnové délce získané pomocí NanoDropu 2000 jsou zobrazeny na Obrázku 14.

Tabulka 11: Koncentrace DNA izolované z různých džemů, plodů a listů červeného rybízu částicemi P(HEMA-co-GMA) (1 g vzorku v 500 μ l lyzačního pufru s CTAB)

DNA	c DNA [ng/ μ l]	A_{230nm}	A_{260nm}	A_{280nm}	A_{260nm}/A_{280nm}	A_{260nm}/A_{230nm}	DNA [ng]
džem (2011)	39,30	1,17	0,79	0,50	1,58	0,67	3 930
džem (2016; a)	17,20	0,57	0,34	0,26	1,30	0,60	1 720
džem (2016; b)	14,90	0,32	0,30	0,22	1,33	0,92	1 490
plody - červený rybíz	12,50	0,20	0,25	0,16	1,61	1,23	1 250
listy - červený rybíz	22,00	0,38	0,44	0,31	1,43	1,17	2 200

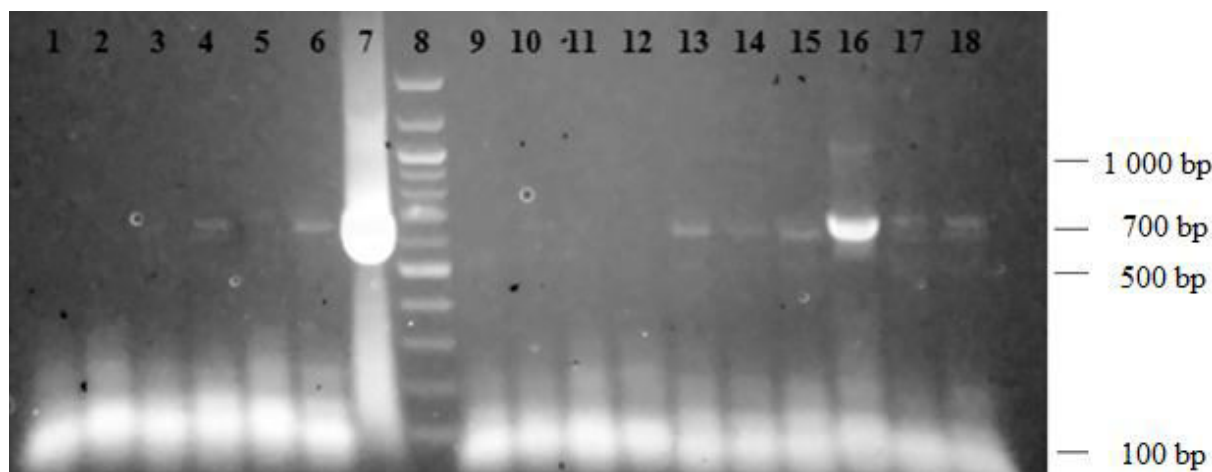


Obrázek 14: Závislost absorbance DNA na vlnové délce. DNA byla izolována částicemi P(HEMA-co-GMA) z homogenátů různých džemů, plodů a listů červeného rybízu v lyzačním roztoku s CTAB

» DNA byla izolovaná z džemů v koncentraci 14,90–39,30 ng/ μ l. Z listů a plodů červeného rybízu byla DNA izolovaná o koncentraci 12,50–22,00 ng/ μ l. DNA byla znečištěna proteiny (A_{260nm}/A_{280nm} 1,30–1,61), ale v dostačující koncentraci pro PCR.

5.4.1 Amplifikace DNA

DNA byla amplifikovaná s primery 18S_for a 5,8S_rev a Taq DNA polymerázou (1U/μl) (4.2.6, Tabulka 7). Amplifikace probíhala podle programu uvedeného v Tabulce 8. Jako pozitivní kontrola byla využita DNA *Brassica oleracea* o koncentraci 10 ng/μl. Výsledné produkty PCR jsou zobrazeny na Obrázku 15.



běh	DNA	lyzační roztok s CTAB	DNA/ PCR směs [ng]	produkt PCR	inhibitory
1	džem (2011)	+	78,60	–	+
2		+	7,86	–	+
3		+	0,79	–	+
4	džem (2016; a)	+	34,40	++	
5		+	3,44	–	+
6		+	0,34	++	
7	pozitivní kontrola	<i>B. oleracea</i>	20,00	++++	
8	standard			–	
9	negativní kontrola			–	
10	džem (2016; b)	+	29,80	+	
11		+	2,98	–	+
12		+	0,30	–	+
13	plody	+	25,00	++	
14		+	2,50	+	
15		+	0,25	++	
16	listy	+	44,00	+++	
17		+	4,40	+	
18		+	0,44	+	

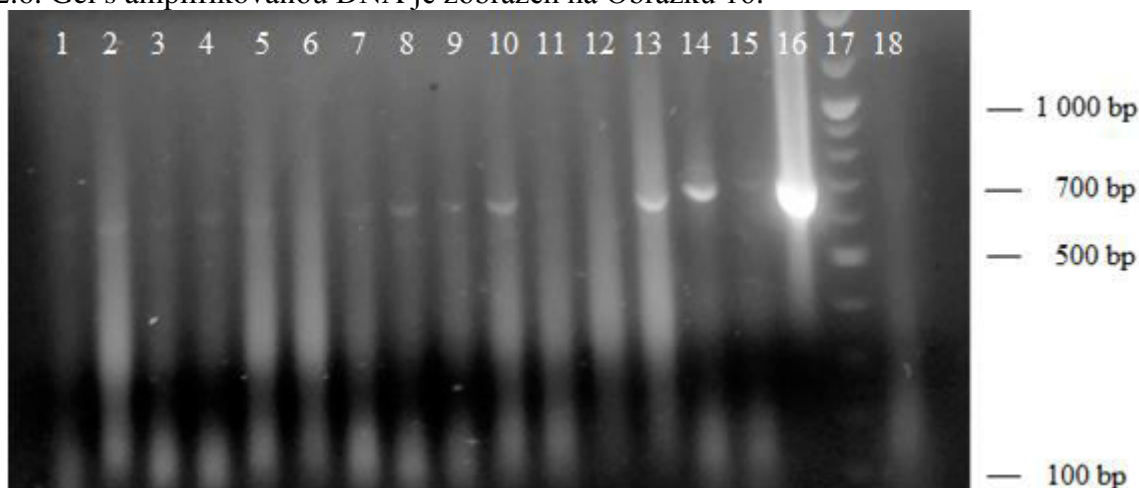
Pozn.: +, ++, +++ produkt PCR detegován v různé intenzitě, – produkt PCR nedetegován

Obrázek 15: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (700 bp). Amplifikovaná byla DNA izolovaná z džemů, plodů a listů červeného rybízu za použití primeru 18S_for a primeru 5,8S_rev.

» Byly detegovány produkty PCR různé intenzity, což mohlo být zapříčiněno znečištěním DNA, inhibitory PCR, případně mohla být DNA degradovaná.

5.4.2 Amplifikace DNA v přítomnosti enhanceru PCR

Pro srovnání byla připravena PCR směs, která obsahovala PCR enhancer. Směs pro PCR byla namíchaná dle Tabulky 7. PCR probíhala podle postupu, který je uveden v kapitole 4.2.6. Gel s amplifikovanou DNA je zobrazen na Obrázku 16.



běh	DNA	lyzační roztok s CTAB	DNA/ PCR směs [ng]	produkt PCR	inhibitory
1	džem (2011)	+	78,60	+	–
2		+	7,86	+	–
3		+	0,79	+	–
4	džem (2016; a)	+	34,40	+	–
5		+	3,44	–	+
6		+	0,34	–	+
7	džem (2016; b)	+	29,80	+	+
8		+	2,98	+	–
9		+	0,30	+	–
10	plody	+	25,00	++	–
11		+	2,50	+	–
12		+	0,25	–	–
13	listy	+	44,00	++	–
14		+	4,40	++	–
15		+	0,44	+	–
16	pozitivní kont.	<i>B. oleracea</i>	20,00	+++	
17	standard			–	
18	negativní kont.			–	

Pozn.: +, ++, +++ produkt PCR detegován v různé intenzitě, – produkt PCR nedetegován

Obrázek 16: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (700 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná z džemů, plodů a listů červeného rybízu za použití primeru 18S_for a primeru 5,8S_rev v přítomnosti PCR enhanceru.

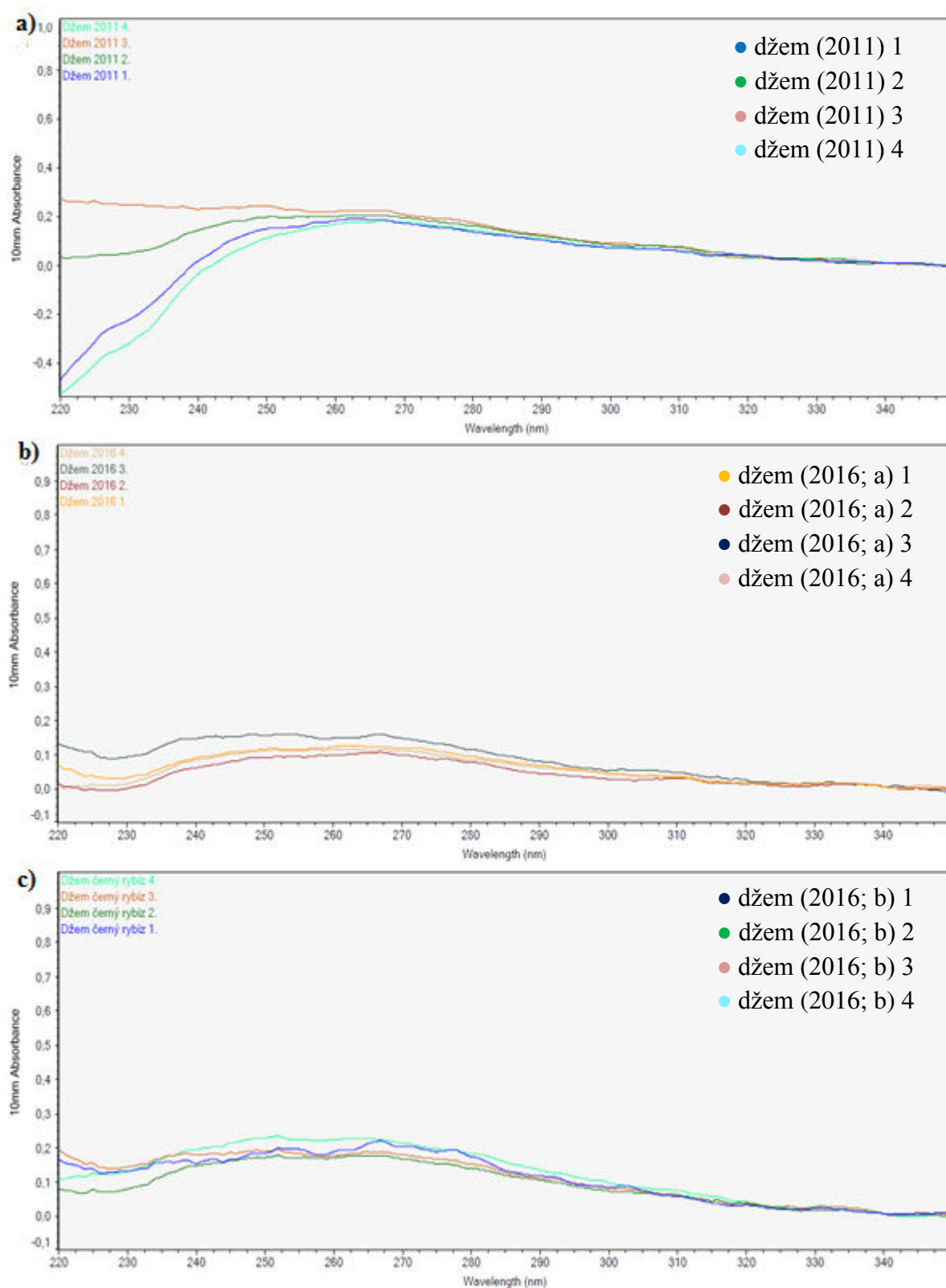
» Byly detegovány produkty PCR v různé intenzitě po amplifikaci všech DNA včetně DNA izolované z džemu (2011). Relativně silný produkt PCR byl detegován po amplifikaci DNA izolované z plodů a listů červeného rybízu. Přítomné inhibitory snižují citlivost PCR.

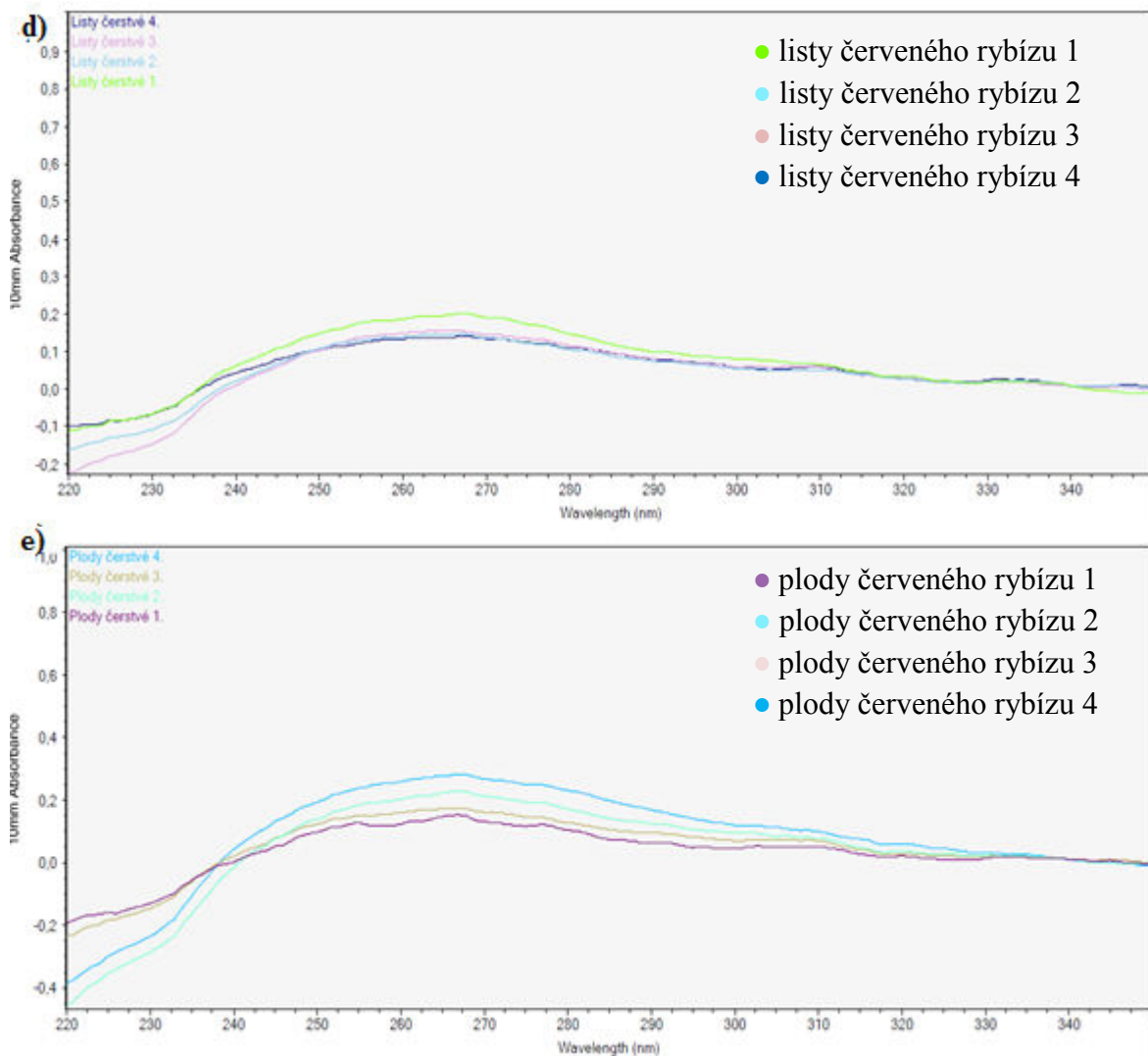
5.5 Vícenásobné opakování izolace DNA částicemi P(HEMA-co-GMA), její zakoncentrování přesrážením a gelová elektroforéza

S cílem vizualizovat DNA na gelu byla postupem uvedeným v kapitole 4.2.3.1 DNA izolována ve čtyřech opakováních. Naměřené hodnoty absorbancí DNA jsou zaznamenány v Tabulce 12. Křivky závislosti absorbance na vlnové délce jsou zobrazeny na Obrázku 17.

Tabulka 12: Naměřené koncentrace DNA izolované z 1 g rybízových džemů a dalších rostlinných materiálů ve 4 opakováních. Džemy byly homogenizovány kopistem v lyzačním roztoku s CTAB (500 μ l)

vzorek	č.	navážka [g]	c DNA [ng/ μ l]	$c_{\text{průměr}}$ [ng/ μ l]	A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{260nm/A_{280nm}}	A _{260nm/A_{230nm}}	DNA [ng]
džem (2011)	1	1	8,60	$\pm 9,13$	0,24	0,17	0,13	1,37	–	860
	2	1	9,50		0,04	0,19	0,15	1,28	5,09	950
	3	1	10,50		0,24	0,21	0,16	1,28	0,88	1050
	4	1	7,90		–	0,16	0,13	1,18	–	790
džem (2016; a)	1	1	5,70	$\pm 5,63$	0,02	0,11	0,09	1,13	4,97	570
	2	1	4,50		–	0,09	0,07	1,29	–	450
	3	1	7,00		0,09	0,14	0,11	1,30	1,65	700
	4	1	5,30		0,10	0,11	0,08	1,39	1,09	530
džem (2016; b)	1	1	9,00	$\pm 9,08$	0,13	0,18	0,17	1,08	1,44	900
	2	1	8,10		0,07	0,16	0,13	1,24	2,27	810
	3	1	8,40		0,14	0,17	0,15	1,16	1,23	840
	4	1	10,80		0,12	0,22	0,18	1,23	1,78	1080
plody červený rybíz	1	1	5,60	$\pm 8,75$	–	0,11	0,09	1,20	–	560
	2	1	9,60		–	0,19	0,16	1,19	–	960
	3	1	7,40		–	0,15	0,12	1,26	–	740
	4	1	12,40		–	0,25	0,22	1,13	–	1240
listy červený rybízu	1	0,1	8,80	$\pm 7,13$	–	0,18	0,14	1,28	–	880
	2	0,1	6,50		–	0,13	0,10	1,34	–	650
	3	0,1	7,00		–	0,14	0,11	1,30	–	700
	4	0,1	6,20		–	0,12	0,10	1,22	–	620





Obrázek 17: Závislost absorbance DNA na vlnové délce; a) džem (2011), b) džem (2016; a), c) džem (2016; b), d) listy červeného rybízu, e) plody červeného rybízu

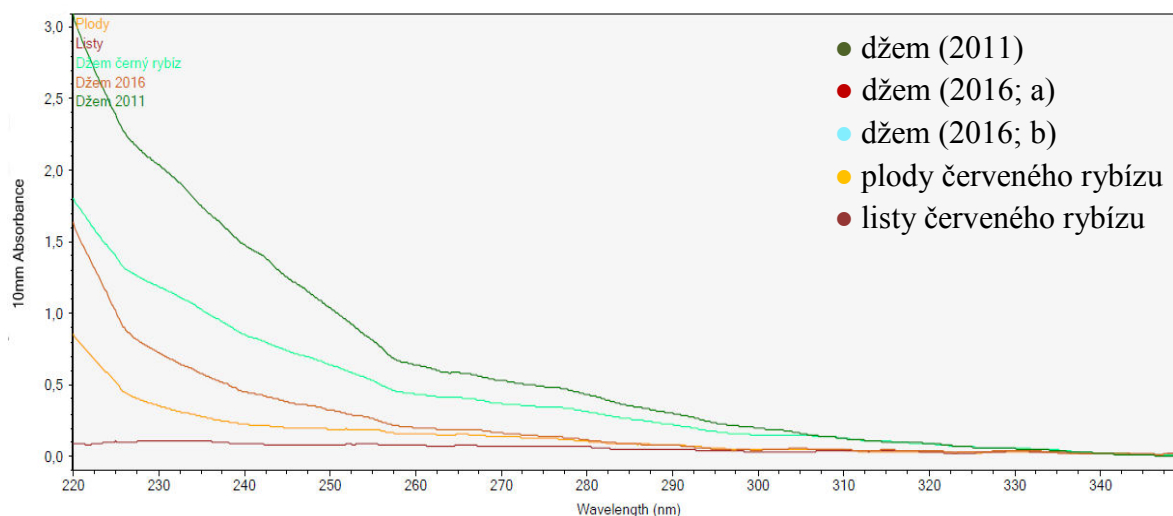
» DNA byla izolovaná o průměrné koncentraci 5,63 – 9,13 ng/μl. V různých opakováních byla DNA izolovaná v přibližně stejné kvalitě. Koncentrace DNA byla dostatečná pro gelovou elektroforézu.

5.5.1 Zakoncentrování DNA přesrážením ethanolom

Vzorky DNA z jednotlivých opakování byly spojeny a přesráženy ethanolom dle postupu uvedeném v kapitole 4.2.4, aby došlo k zakoncentrování DNA a DNA tak mohla být vizualizována na gelu. Výsledné hodnoty koncentrací po spektrofotometrickém stanovení DNA po přesrážení jsou zaznamenány v Tabulce 13. Závislosti absorbance DNA na vlnové délce po přesrážení byly zobrazeny na Obrázku 18.

Tabulka 13: Naměřené hodnoty koncentrace DNA po přesrážení ethanolem

DNA	c DNA [ng/μl]	A_{230nm}	A_{260nm}	A_{280nm}	A_{260nm}/A_{280nm}	A_{260nm}/A_{230nm}	DNA [ng]
džem (2011)	31,00	2,000	0,620	0,414	1,500	0,310	930
džem (2016; a)	9,00	0,716	0,179	0,094	1,900	0,250	270
džem (2016; b)	20,80	1,186	0,415	0,291	1,430	0,350	624
plody - červený rybíz	6,70	0,335	0,134	0,083	1,610	0,400	201
listy - červený rybíz	2,70	0,087	0,055	0,044	1,240	0,630	81



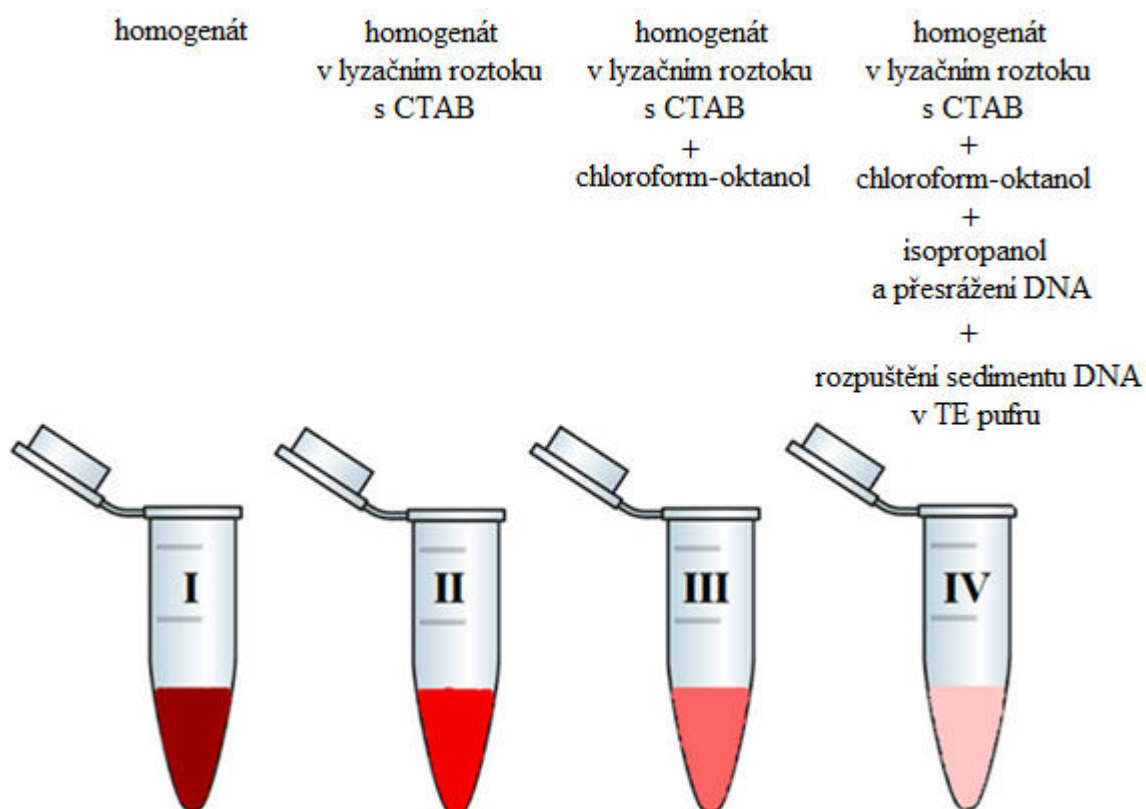
Obrázek 18: Závislosti absorbance na vlnové délce přesrážených vzorků DNA

» Přesrážením DNA došlo k částečnému zakoncentrování DNA izolované z různých rybízových džemů, plodů a listů červeného rybízu. Celkové množství DNA bylo nedostačující pro detekci pomocí gelové elektroforézy (s výjimkou džemu (2011) a džemu (2016; b)).

5.6 Izolace DNA částicemi PLL z rybízových džemů

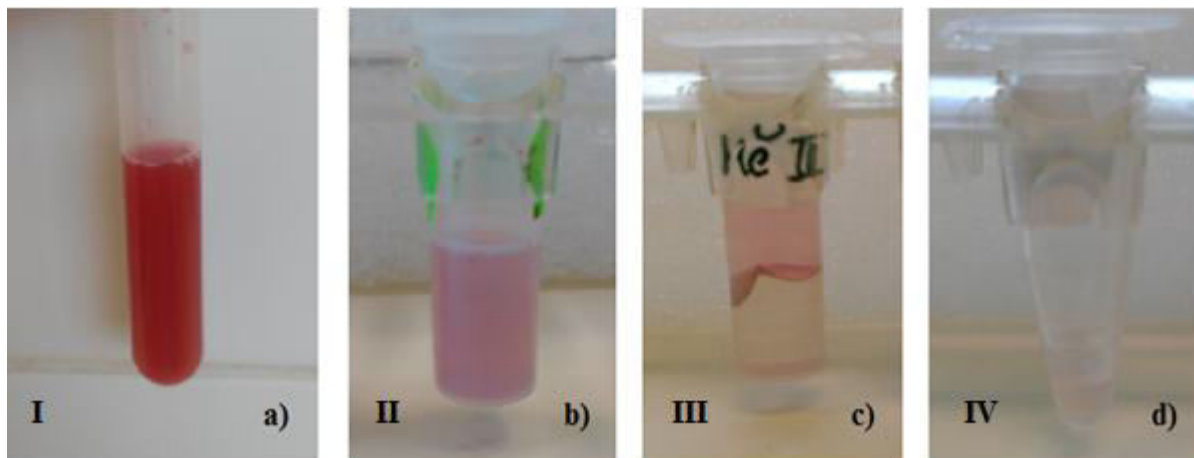
5.6.1 Příprava homogenátů džemů a jejich zpracování

Různě zpracovaný homogenizovaný džem ze stomacheru byl podroben separaci magnetickými částicemi PLL dle postupu 4.2.2. Byl používán stejný lyzační roztok s CTAB jako u částic P(HEMA-*co*-GMA). Schéma jednotlivých kroků při zpracování džemu pro separaci DNA pomocí magnetických částic PLL je zobrazeno na Obrázku 19.



Obrázek 19: Schéma jednotlivých kroků zpracování homogenátu z džemů pro separaci DNA pomocí magnetických nanočástic PLL

Zpracované homogenáty rybízového džemu (1 g) použité pro separaci magnetickými nanočásticemi PLL jsou zobrazeny na Obrázku 20.



Obrázek 20: Příprava různě zpracovaného homogenátu z rybízového džemu (2016; a) pro separaci magnetickými nanočásticemi PLL

a) I (homogenát),

b) II (homogenát + lyzační roztok s CTAB),

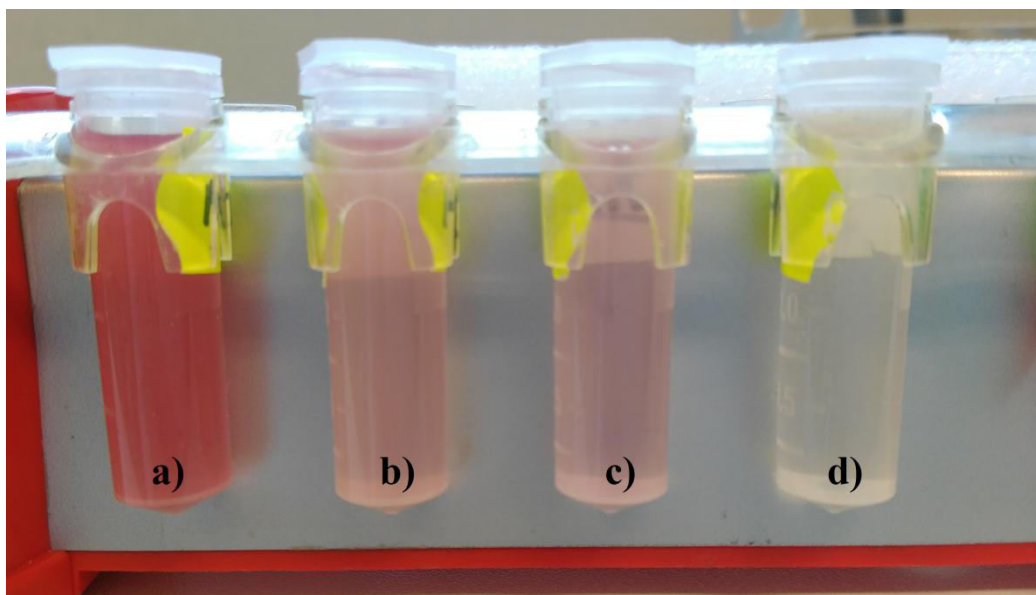
c) III (homogenát + lyzační roztok s CTAB + chloroform-oktanol, po centrifugaci a oddělení fází),

d) IV (homogenát + lyzační roztok s CTAB + chloroform-oktanol, po centrifugaci a oddělení fází + isopropanol a přesrážení DNA ve vodné fázi + rozpuštění sedimentu DNA v TE pufru)

» Pro izolaci DNA magnetickými nosiči byly použity různě zpracované homogenáty (I–IV).

5.6.1.1 Porovnání zabarvení separačních směsí různě zpracovaných homogenátů z rybízového džemu (2016; a)

Z Obrázku 20 je patrné, že postupným zpracováváním homogenátu se vytrácel zákal i zabarvení. Fakt, že docházelo ke ztrátě zabarvení je patrné i po namíchání separačních směsí, které obsahovaly magnetické nanočástice PLL (viz postup v kapitole 4.2.2). Eppendorfovy zkumavky obsahující separační směsi jsou zobrazeny na Obrázku 21.



Obrázek 21: Porovnání různě zpracovaného homogenátu z džemu (2016; a) používaného do separačních směsí s magnetickými částicemi PLL,

a) I (homogenát),

b) II (homogenát + lyzační roztok s CTAB),

c) III (homogenát + lyzační roztok s CTAB + chloroform-oktanol),

d) IV (homogenát + lyzační roztok s CTAB + chloroform-oktanol + isopropanol a přesrážení DNA + rozpuštění sedimentu DNA v TE pufu)

» Zabarvení různě zpracovaných homogenátů z rybízových džemů pro separaci magnetickými nanočásticemi PLL bylo odlišné. Postupně mizelo stejně jako zákal.

5.6.2 Izolace DNA z různě zpracovaných homogenátů z džemu (2016; a)

K homogenizaci džemu (20 g) byl využit stomacher (4.2.2). Polovina získaného homogenátu byla centrifugována (14 500 g; 3 minuty) a druhá polovina nikoliv. Byly tudíž porovnány centrifugované a necentrifugované homogenáty. Separační směsi byly připraveny dle kapitoly 4.2.3.2 s magnetickými částicemi PLL (0,1 mg/ml) (viz Obrázek 21) z:

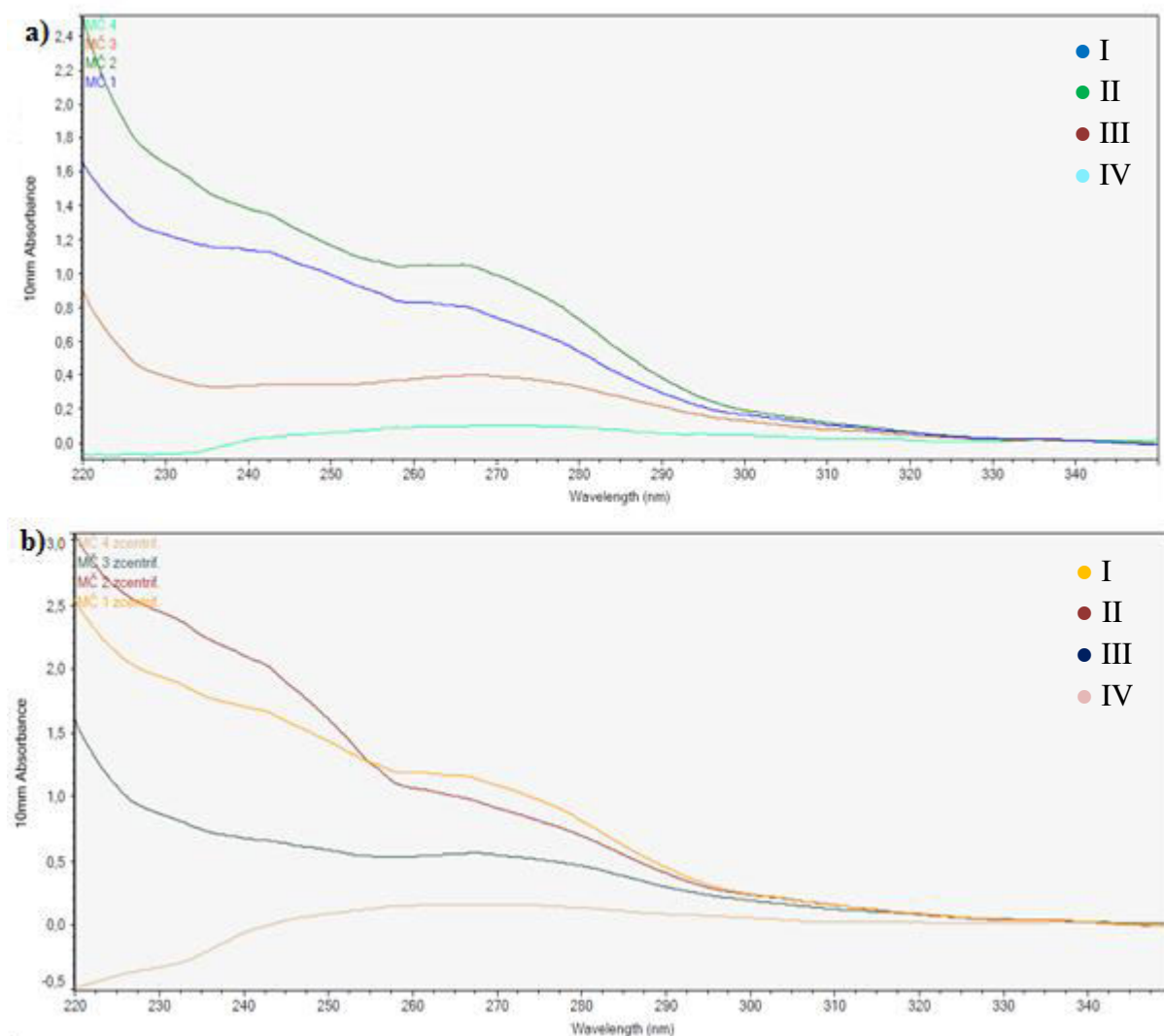
- 1) homogenátu (I)
- 2) homogenátu (II)
- 3) homogenátu (III)
- 4) homogenátu (IV).

Naměřené koncentrace DNA byly zaznamenány do Tabulky 14. Křivky závislosti absorbance DNA na vlnové délce jsou vykresleny v Obrázku 22.

Tabulka 14: Naměřené koncentrace a hodnoty absorbance DNA izolované z různě zpracovaných homogenátů z džemu (2016; a). Byly testovány homogenáty I–IV bez centrifugace a po centrifugaci

DNA	centrifugace	homogenát	c DNA [ng/μl]	A_{230nm}	A_{260nm}	A_{280nm}	A_{260nm}/A_{280nm}	A_{260nm}/A_{230nm}	DNA [ng]
džem (2016; a)	–	I	40,70	1,22	0,81	0,52	1,55	0,67	2 035
		II	51,50	1,64	1,03	0,72	1,44	0,63	2 575
		III	18,00	0,34	0,36	0,31	1,14	0,95	900
		IV	3,70	–	0,07	0,07	1,00	–	185
	+	I	58,40	1,92	1,17	0,79	1,48	0,61	2 920
		II	52,30	2,44	1,05	0,67	1,55	0,43	2 615
		III	25,40	0,85	0,51	0,44	1,16	0,60	1 270
		IV	6,20	–	0,13	0,11	1,15	–	310

Pozn.: – bez centrifugace, + s centrifugací

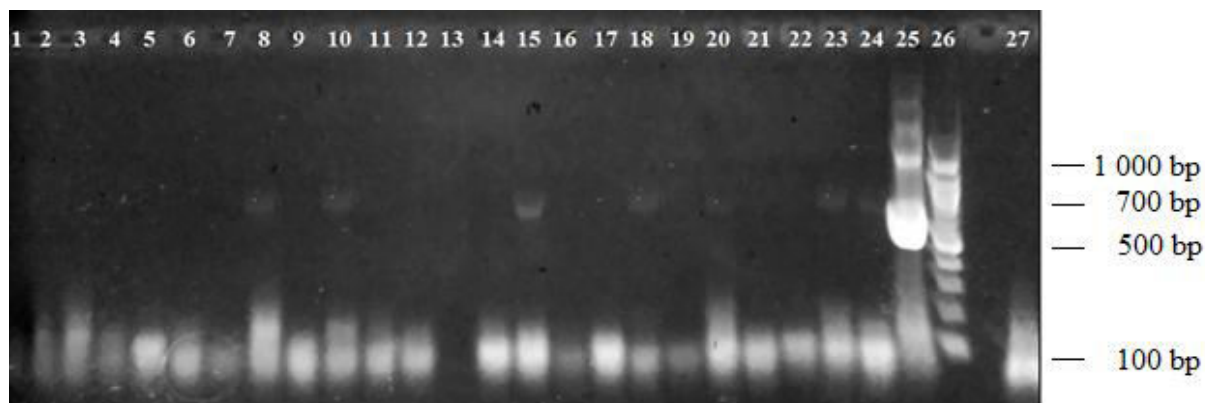


Obrázek 22: Křivky závislosti absorbance na vlnové délce DNA izolované z džemu (2016; a), a) homogenáty bez centrifugace, b) homogenáty s centrifugací

» DNA byla izolovaná v různém množství v závislosti na zpracování homogenátů. DNA byla znečištěna. Z centrifugovaných homogenátů bylo izolované větší množství DNA. Centrifugací se ztratil zákal a byly odseparovány hrubé nečistoty, což mohlo ovlivnit spektrofotometrické stanovení.

5.6.2.1 Amplifikace DNA

DNA byla amplifikovaná za použití primeru 18S_for a primeru 5,8S_rev dle postupu v kapitole 4.2.6 (Tabulka 7). Amplifikace probíhala podle programu, který je uveden v Tabulce 8. Jako pozitivní kontrola byla využita DNA *Brassica oleracea* (10 ng/μl). Výsledky detekce produktů PCR jsou zobrazeny na Obrázku 23.



běh	DNA z homogenátu	centrifugace	DNA/ PCR směs [ng]	produkt PCR	inhibitory
1	I	–	81,4	–	+
2		–	8,14	–	
3		–	0,814	–	
4	II	–	103	–	+
5		–	10,3	–	
6		–	1,03	–	
7	III	–	36,0	–	+
8		–	3,60	+	
9		–	0,360	–	
10	IV	–	7,4	+	
11		–	0,74	–	
12		–	0,074	–	
13	I	+	116,8	–	+
14		+	11,68	–	+
15		+	1,168	++	
16	II	+	104,6	–	+
17		+	10,46	–	+
18		+	1,046	+	
19	III	+	50,8	–	+
20		+	5,08	+	
21		+	0,508	–	
22	IV	+	12,4	–	+
23		+	1,24	+	
24		+	0,124	+	
25	pozitivní kont.	<i>B. oleracea</i>	20	+++	
26	standard				
27	negativní kont.			–	

Pozn.: +, ++, +++ produkt PCR detegován v různé intenzitě, – produkt PCR nedetegován

Obrázek 23: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (700 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná z různě zpracovaných homogenátů (I–IV) z rybízového džemu (2016; a) magnetickými částicemi PLL za využití primeru 18S_for a primeru 5,8S_rev

» PCR produkty slabé intenzity byly detegovány po amplifikaci DNA izolované z homogenátu, který byl před zpracováním centrifugován. Z centrifugovaného homogenátu bylo izolováno větší množství DNA. DNA byla znečištěna a obsahovala inhibitory PCR.

5.6.3 Izolace DNA modifikovaným lyzačním roztokem s CTAB s přídavkem PVP z různě zpracovaného homogenátu džemu (2016; a)

K optimalizaci metody byl využit modifikovaný lyzační roztok s CTAB s přídavkem PVP, kdy CTAB rozpouští polysacharidy a PVP napomáhá odstranit polyfenoly ze vzorku. Džem byl homogenizován za pomoci stomacheru a následně byl homogenát zpracován (4.2.2). Poté byla DNA izolovaná magnetickými částicemi PLL o dvou různých koncentracích - 0,1 a 0,5 mg/ml. Při použití vyšší koncentrace (0,5 mg/ml) magnetických nanočástic došlo k zabarvení různě zpracovaných homogenátů. Částice následně nešlo resuspendovat a hodnota naměřené koncentrace DNA i křivky závislosti absorbance DNA na vlnové délce byly ovlivněny jejich přítomností. Nadále byla tedy využívána pouze nižší koncentrace magnetických nanočástic – 0,1 mg/ml. Postup separace byl obdobný jako v kapitole 4.2.3.2, separace částicemi s DNA však probíhala 20 minut. Ze sáčku s membránou, který se využívá k homogenizaci ve stomacheru, byly vybrány zrníčka, která byla následně homogenizována za pomoci kopistu v modifikovaném lyzačním roztoku (kapitola 4.2.1).

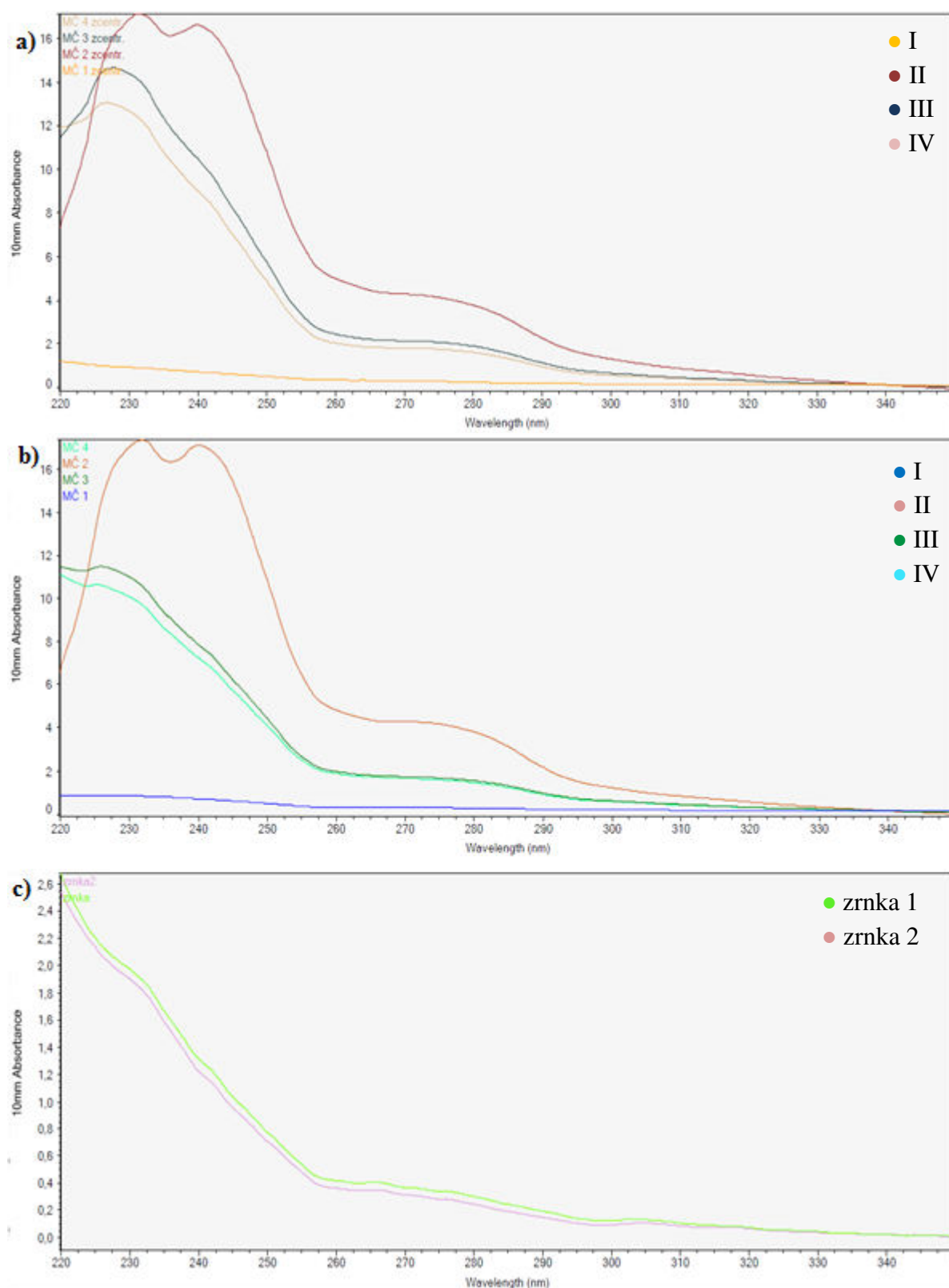
Takto připravené homogenizované vzorky byly podrobeny izolaci DNA částicemi (v prostředí 16% PEG 6000) a spektrofotometrickému stanovení (4.2.5). Naměřené hodnoty absorbancí a koncentrace DNA jsou uvedeny v Tabulce 15. Závislost absorbance DNA na vlnové délce různě zpracovaných homogenátů a zrněk je zobrazena na Obrázku 24.

Tabulka 15: Koncentrace DNA izolované z džemu (2016; a) a zrněk – po homogenizaci byl použit modifikovaný lyzační roztok s CTAB s přídavkem PVP

DNA	centrifugace	homogenát	c DNA [ng/μl]	A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{260nm} / A _{280nm}	A _{260nm} / A _{230nm}	DNA [ng]
rybíz (2016; a)	–	I	8,70	0,70	0,18	0,13	1,32	0,25	435
		II	235,20	16,80	4,70	3,70	1,27	0,28	11 760
		III	91,80	10,81	1,84	1,41	1,30	0,17	4 590
		IV	86,90	10,22	1,74	1,32	1,32	0,17	4 345
	+	I	10,90	0,80	0,22	0,13	1,68	0,27	545
		II	244,60	16,87	4,89	3,67	1,33	0,29	12 230
		III	116,80	14,60	2,34	1,79	1,31	0,16	5 840
		IV	96,10	12,82	1,92	1,50	1,28	0,15	4 805
		zrnka 1	19,90	1,99	0,40	0,28	1,41	0,20	995
		zrnka 2	17,10	1,90	0,34	0,23	1,52	0,18	855

Pozn.: – homogenát nebyl centrifugován, + homogenát byl centrifugován,

I–IV – různě zpracované homogenáty

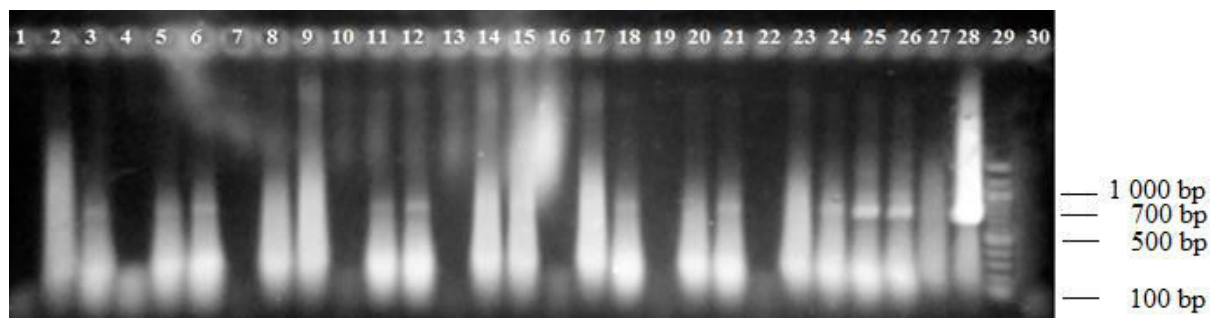


Obrázek 24: Křivky závislosti absorpance DNA izolované z džemu (2016; a) na vlnové délce,
a) DNA izolovaná z necentrifugovaného různě zpracovaného homogenátu,
b) DNA izolovaná z centrifugovaného různě zpracovaného homogenátu,
c) DNA izolovaná ze zrněk z džemu (2016; a);
I–IV – různě zpracované homogenáty

» DNA byla izolovaná v různém množství. Hodnota $A_{260\text{nm}}$ je vyšší u homogenátů, které byly před zpracováním centrifugovány. DNA ze zrnků byla izolovaná v koncentračním rozmezí 17,10–19,90 ng/μl. DNA byla znečištěna.

5.6.3.1 Amplifikace DNA

DNA byla kvůli možné přítomnosti inhibitorů 10x a 100x naředěna a následně byla amplifikovaná za využití primerů 18S_for a 5,8S_rev a Taq DNA polymerázy 1.1 (1U/μl) (viz Tabulka 7). Amplifikace DNA probíhala podle programu, který je uveden v Tabulce 8. Jako pozitivní kontrola byla využita *Brassica oleracea* (1 ng/μl). Produkty PCR byly nanášeny na 1,2% agarózový gel. Gel je zobrazen na Obrázku 25.



běh	homogenát	centrifugace	DNA/ PCR směs [ng]	produkt PCR	inhibitory
1	I	–	17,4	–	+
2		–	1,74	–	+
3		–	0,174	+	
4	II	–	470,4	–	+
5		–	47,04	+	
6		–	4,704	++	
7	III	–	183,6	–	+
8		–	18,36	–	+
9		–	1,836	–	+
10	IV	–	173,8	–	+
11		–	17,38	+	
12		–	1,738	++	
13	I	+	21,8	–	+
14		+	2,18	–	+
15		+	0,218	–	
16	II	+	489,2	–	+
17		+	48,92	–	+
18		+	4,892	+	
19	III	+	233,6	–	+
20		+	23,36	+	
21		+	2,336	+	
22	IV	+	192,2	–	+
23		+	19,22	–	+
24		+	1,922	+	
25	zrnka	–	39,8	++	
26		–	3,98	++	
27		–	0,398	–	
28	pozitivní k.	<i>B. oleracea</i>	10	+++	
29	standard				
30	negativní k.			–	

Pozn.: +, ++, +++ produkt PCR detegován v různé intenzitě, – produkt PCR nedetegován

Obrázek 25: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (700 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná z různě zpracovaných homogenátů (I–IV) rybízového džemu (2016; a) a ze zrnka za použití primerů 18S_for a primeru 5,8S_rev.

» Byly detegovány produkty PCR o velikosti 700 bp v slabé intenzitě. Detegovány byly především amplikony nasyntetizované po amplifikaci zředěné DNA (DNA obsahovala i inhibitory PCR). DNA izolovaná ze zrněk se amplifikovala a amplikony byly detegovány ve větší intenzitě a to pravděpodobně proto, že DNA, která se v nich nachází, byla méně degradovaná.

5.6.4 Izolace DNA modifikovaným lyzačním roztokem s CTAB z různě zpracovaných homogenátů z více druhů džemů, plodů a listů červeného rybízu

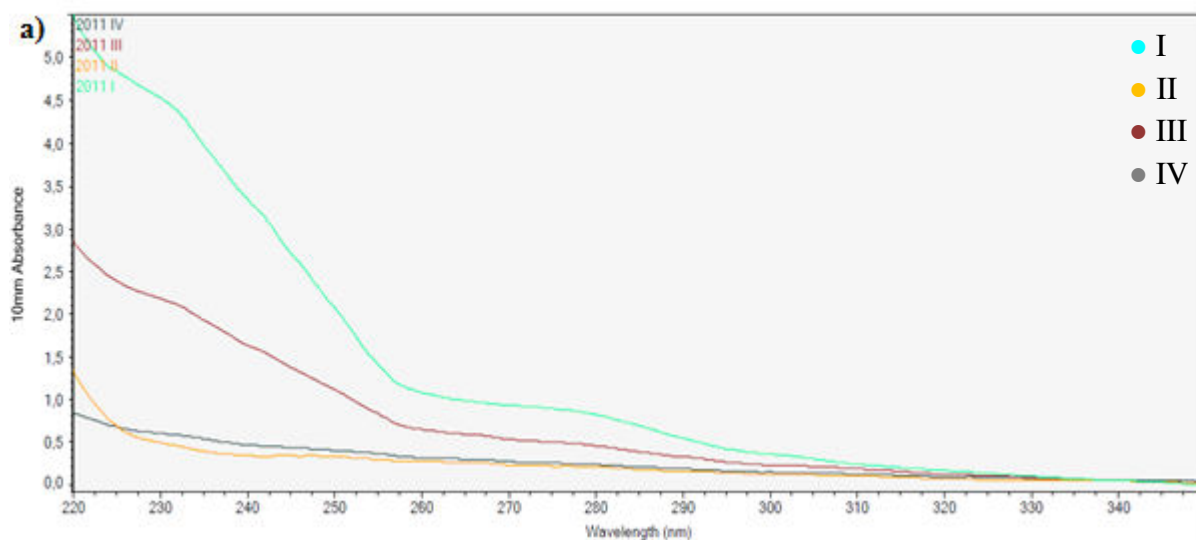
S cílem otestovat, zda přídavek PVP měl kladný vliv na amplifikovatelnost DNA, byla tato metoda využita pro všechny druhy džemů a zrnka, která se v džemech nacházejí. Pro kontrolu byla také DNA izolována z listů a plodů červeného rybízu.

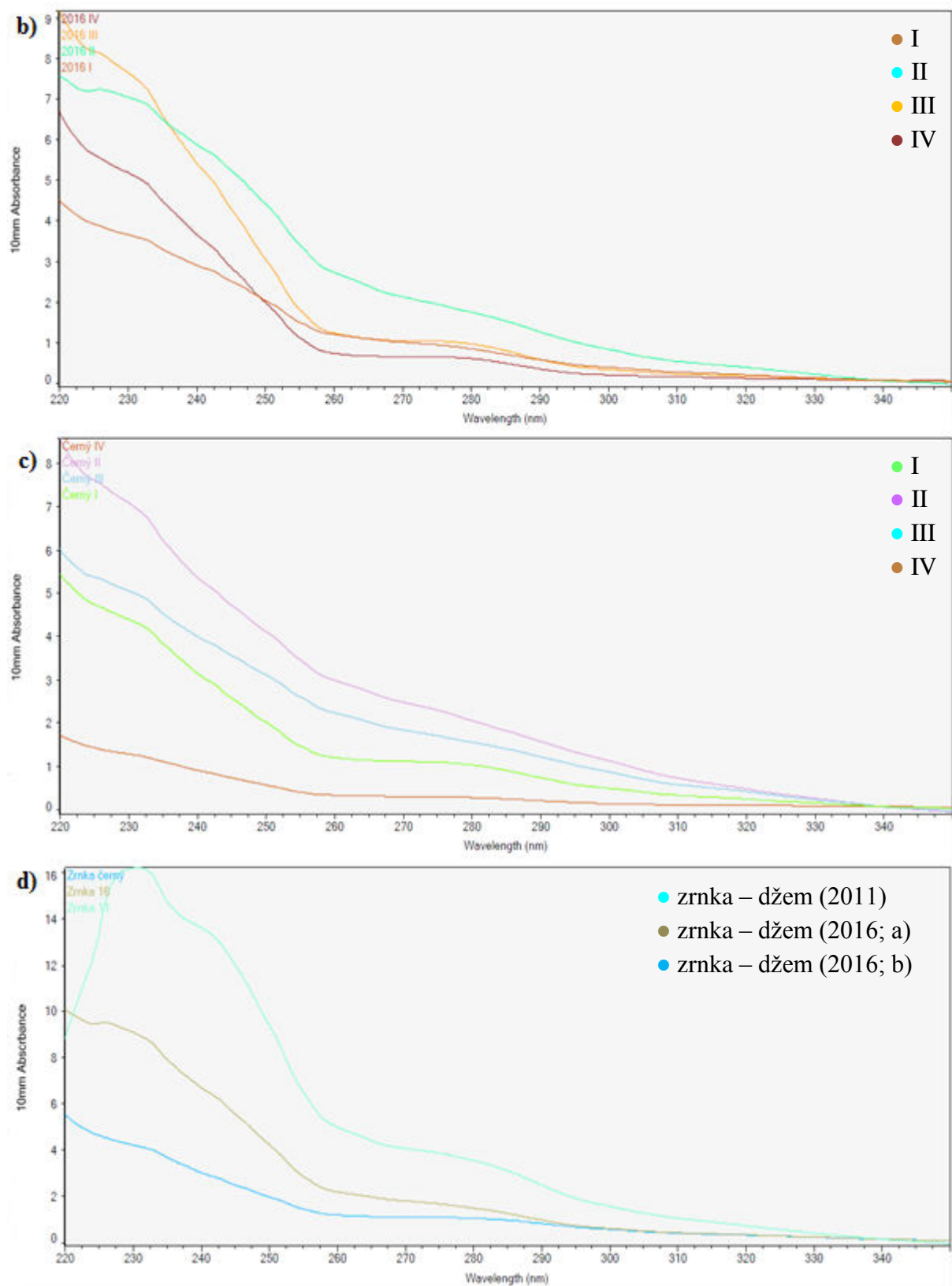
Džemy, listy a plody červeného rybízu byly homogenizovány za pomoci stomacheru v TEN pufru a poté byly připraveny různé homogenáty I–IV (4.2.2), z kterých byla následně izolovaná DNA magnetickými částicemi PLL o koncentraci 0,1 mg/ml (4.2.3.2). Zrnka, která zůstala v sáčku s membránou, byla odebrána do čisté Eppendorfovy zkumavky a následně byla homogenizována za pomoci plastového kopistu v modifikovaném lyzačním roztoku s CTAB (kapitola 4.2.1).

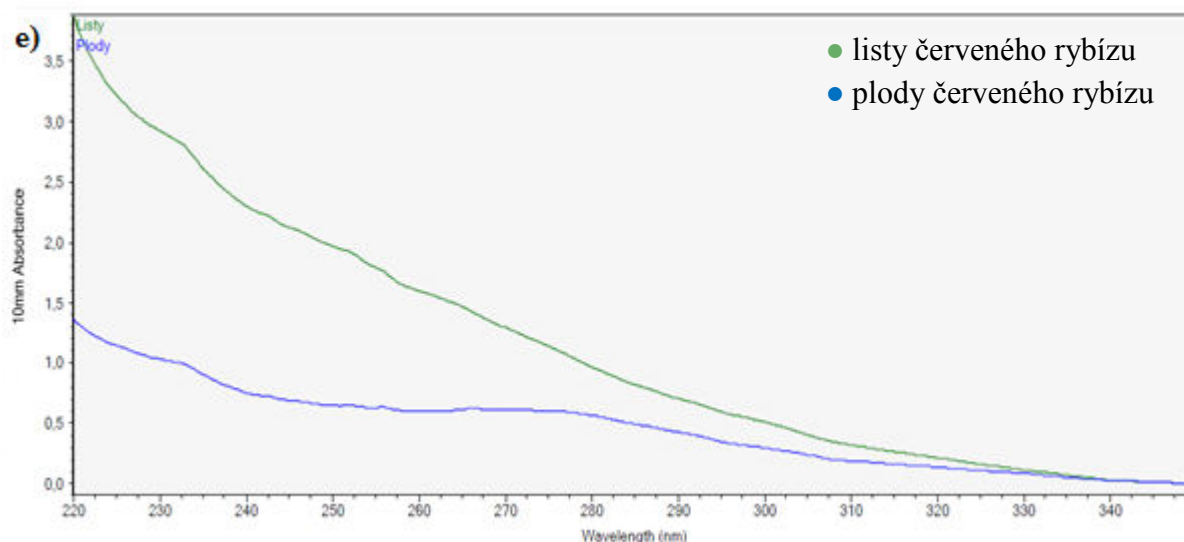
U získané DNA byla změřena koncentrace DNA a absorbance v rozmezí 220–350 nm. Získané hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 16. Závislosti absorbance na vlnové délce jsou uvedeny na Obrázku 26.

Tabulka 16: Koncentrace a absorbance DNA izolované ze všech druhů džemů, zrněk z nich získaných, plodů a listů červeného rybízu

DNA	centrifugace	homogenát	c DNA [ng/μl]	A_{230nm}	A_{260nm}	A_{280nm}	A_{260nm}/A_{280nm}	A_{260nm}/A_{230nm}	DNA [ng]
džem (2011)	+	I	51,80	4,50	1,04	0,78	1,33	0,23	2 590
		II	11,10	0,44	0,22	0,16	1,40	0,50	555
		III	30,10	2,15	0,60	0,41	1,47	0,28	1 505
		IV	13,40	0,56	0,27	0,19	1,42	0,48	670
		zrnka	243,60	16,24	4,87	3,43	1,42	0,30	12 180
džem (2016; a)	+	I	57,10	3,57	1,14	0,79	1,45	0,32	2 855
		II	133,80	7,04	2,68	1,69	1,58	0,38	6 690
		III	58,80	7,85	1,18	0,91	1,30	0,15	2 940
		IV	33,80	5,19	0,68	0,54	1,24	0,13	1 690
		zrnka	103,30	8,98	2,07	1,36	1,52	0,23	5 165
džem (2016; b)	+	I	57,10	4,40	1,14	0,97	1,18	0,26	2 855
		II	146,60	6,98	2,93	2,00	1,46	0,42	7 330
		III	109,00	5,07	2,18	1,50	1,45	0,43	5 450
		IV	13,20	1,20	0,26	0,21	1,24	0,22	660
		zrnka	52,60	4,05	1,05	0,92	1,15	0,26	2 630
plody	–	–	28,90	1,01	0,58	0,54	1,07	0,57	1 445
listy	–	–	78,60	2,91	1,57	0,94	1,67	0,54	3 930





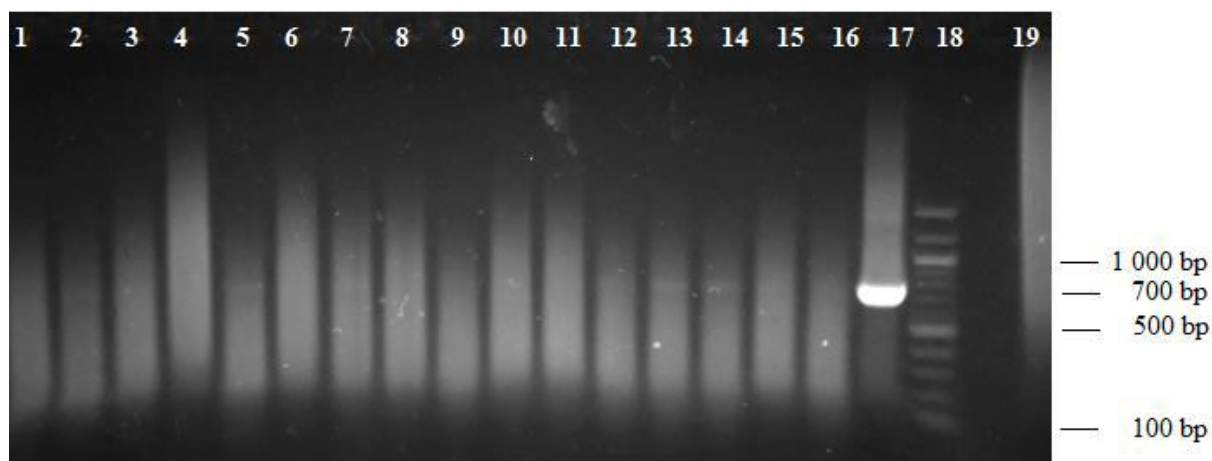


Obrázek 26: Křivky závislosti absorbance DNA na vlnové délce izolované z testovaných druhů džemů, zrněk, plodů a listů červeného rybízu; a) džem (2011), b) džem (2016; a), c) džem (2016; b), d) zrnka z jednotlivých džemů, e) listy a plody červeného rybízu

» DNA byla izolovaná ze vzorků džemů v různé koncentraci (11,10–133,80 ng/μl) a ze zrníček v rozmezí 52,60–243,60 ng/μl. Koncentrace izolované DNA z plodů červeného rybízu byla 28,90 ng/μl a listů červeného rybízu 78,60 ng/μl. DNA byla znečištěna

5.6.4.1 Amplifikace DNA

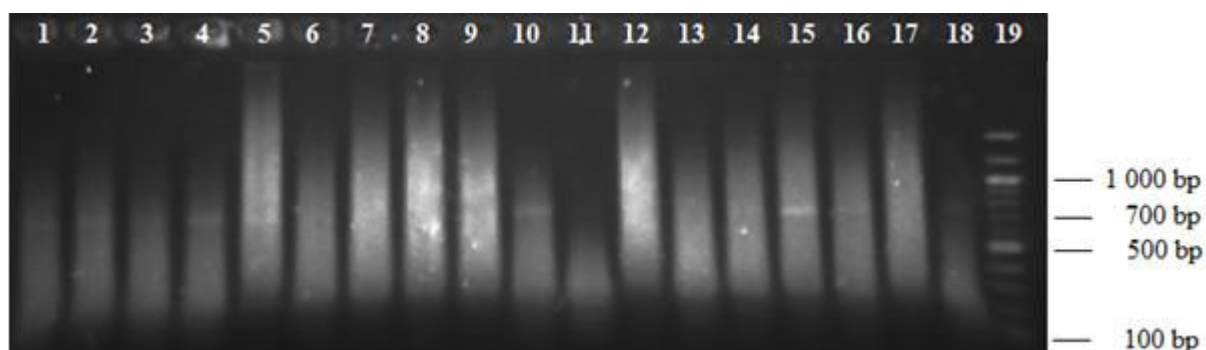
Izolovaná DNA byla kvůli možné přítomnosti inhibitorů naředěna 10x a 100x. Podle výsledků v kapitole 5.6.3 byla PCR podrobena pouze naředěná DNA, kde byla amplifikovaná za použití primerů 18S_for a 5,8S_rev a DNA polymerázy o koncentraci 5 U/μl dle postupu v kapitole 4.2.6 (Tabulka 6). Amplifikace probíhala podle programu, který je uveden v Tabulce 8. Jako pozitivní kontrola byla využita DNA *Brassica oleracea* (1 ng/μl). Výsledné produkty PCR byly detegovány na 1,2% agarózovém gelu. Výsledný gel s amplikony amplifikovanými z džemu (2011) a džemu (2016; a) je zobrazen na Obrázku 27. Gel obsahující produkty PCR z DNA, která byla izolovaná džemu (2016; b), zrněk, plodů a listů je zobrazen na Obrázku 28.



běh	DNA	homogenát	centrifugace	DNA/ PCR směs [ng]	produkt PCR	inhibitory
1	džem (2011)	I	+	10,36	–	+
2			+	1,036	+	
3		II	+	2,22	–	
4			+	0,222	–	
5		III	+	6,02	+	
6			+	0,602	–	
7		IV	+	2,68	+	
8			+	0,268	–	
9	džem (2016; a)	I	+	11,42	–	
10			+	1,142	–	
11		II	+	26,76	–	+
12			+	2,676	+	
13		III	+	11,76	+	
14			+	1,176	+	
15		IV	+	6,76	+	
16			+	0,676	–	
17	pozitivní k.	<i>B. oleracea</i>		2	+++	
18	standard					
19	negativní k.				–	

Pozn.: +, ++, +++ produkt PCR detegován v různé intenzitě, – produkt PCR nedetegován

Obrázek 27: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (700 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná z různě zpracovaných homogenátů pocházejících z džemů (2011 a 2016; a) za využití primerů 18S_for a 5,8S_rev a DNA polymerázy o koncentraci 5U/μl.



běh	DNA	homogenát	centrifugace	DNA/ PCR směs [ng]	produkt PCR	inhibitory
1	džem (2016; b)	I	+	11,42	+	
2			+	1,142	+	
3		II	+	29,32	+	
4			+	2,932	+	
5		III	+	21,8	+	
6			+	2,18	–	
7		IV	+	2,64	–	
8			+	0,264	–	
9	zrnka džem (2011)	–	–	48,76	–	+
10		–	–	4,876	+	
11	zrnka džem (2016; a)	–	–	20,66	–	
12		–	–	2,066	–	
13	zrnka džem (2016; b)	–	–	10,52	–	+
14		–	–	1,052	+	
15	listy	–	–	15,72	++	
16		–	–	1,572	+	
17	plody	–	–	5,78	–	+
18		–	–	0,578	+	
19	standard		+			

Pozn.: +, ++, +++ produkt PCR detegován v různé intenzitě, – produkt PCR nedetegován

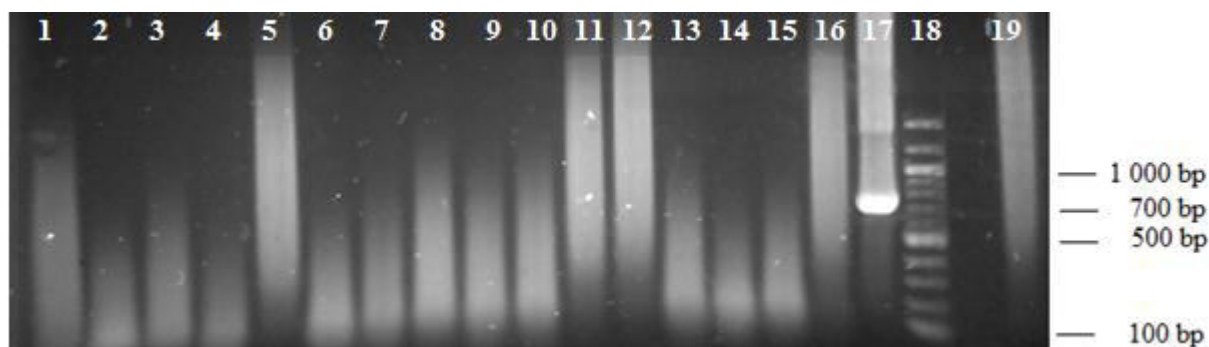
Obrázek 28: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (700 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná z různě zpracovaných homogenátů z džemu (2016; b), zrněk, listů a plodů červeného rybízu za použití primerů 18S_for a 5,8S_rev a DNA polymerázy 5 U/μl.

» Produkty PCR velmi slabé intenzity byly detegovány. Nejsilnější byl amplikon amplifikovaný z DNA, která byla izolována z listů červeného rybízu. DNA obsahovala inhibitory PCR.

5.6.4.2 PCR produkty po amplifikaci většího množství DNA

Jelikož byly v kapitole 5.6.4.1. detegovány slabé produkty PCR, byla ředěná DNA amplifikována za použití primerů 18S_for a 5,8S_rev a DNA polymerázy o koncentraci 5 U/μl dle postupu v kapitole 4.2.6 (Tabulka 6) s tou změnou, že bylo do PCR směsi

přidáváno 3 µl DNA na úkor PCR vody. Amplifikace probíhala podle programu, který je uveden v Tabulce 8. Jako pozitivní kontrola byla využita DNA *Brassica oleracea* (1 ng/µl). PCR produkty získané amplifikací DNA z džemu (2011) a džemu (2016; a) jsou zobrazeny na Obrázku 29. Amplikony amplifikované z džemu (2016; b), zrneku, plodů a listů jsou zobrazeny na 1,2% agarózovém gelu na Obrázku 30.



běh	DNA	homogenát	centrifugace	DNA/ PCR směs [ng]	produkt PCR	inhibitory
1	džem (2011)	I	+	15,54	–	+
2			+	1,554	–	+
3		II	+	3,33	–	+
4			+	0,333	–	+
5		III	+	9,03	–	+
6			+	0,903	–	+
7		IV	+	4,02	–	+
8			+	0,402	–	+
9	džem (2016; a)	I	+	17,13	–	+
10			+	1,713	–	+
11		II	+	40,14	–	+
12			+	4,014	–	+
13		III	+	17,64	–	+
14			+	1,764	–	+
15		IV	+	10,14	–	+
16			+	1,014	–	+
17	pozitivní k.	<i>B. oleracea</i>	+	3	+++	
18	standard		+			
19	negativní k.		+		–	

Pozn.: +, ++, +++ produkt PCR detegován v různé intenzitě, – produkt PCR nedetegován

Obrázek 29: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (700 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná z různě zpracovaných homogenátů pocházejících z džemů (2011 a 2016; a) za využití primerů 18S_for a 5,8S_rev a DNA polymerázy o koncentraci 5U/µl. Do směsi pro PCR byly přidány 3 µl DNA



běh	DNA	homogenát	centrifugace	DNA/ PCR směs [ng]	produkt PCR	inhibitory
1	džem (2016; b)	I	+	17,13	–	+
2			+	1,713	–	+
3		II	+	43,98	–	+
4			+	4,398	–	+
5		III	+	32,70	–	+
6			+	3,270	–	+
7		IV	+	3,96	–	+
8			+	0,396	–	+
9	zrnka džem (2011)	–	–	73,14	–	+
10		–	–	7,314	–	+
11	zrnka džem (2016; a)	–	–	30,99	–	+
12		–	–	3,099	–	+
13	zrnka džem (2016; b)	–	–	15,78	–	+
14		–	–	1,578	–	+
15	listy	–	–	23,58	+	–
16		–	–	2,358	–	+
17	plody	–	–	8,67	–	+
18		–	–	0,867	–	+
19	standard		+			

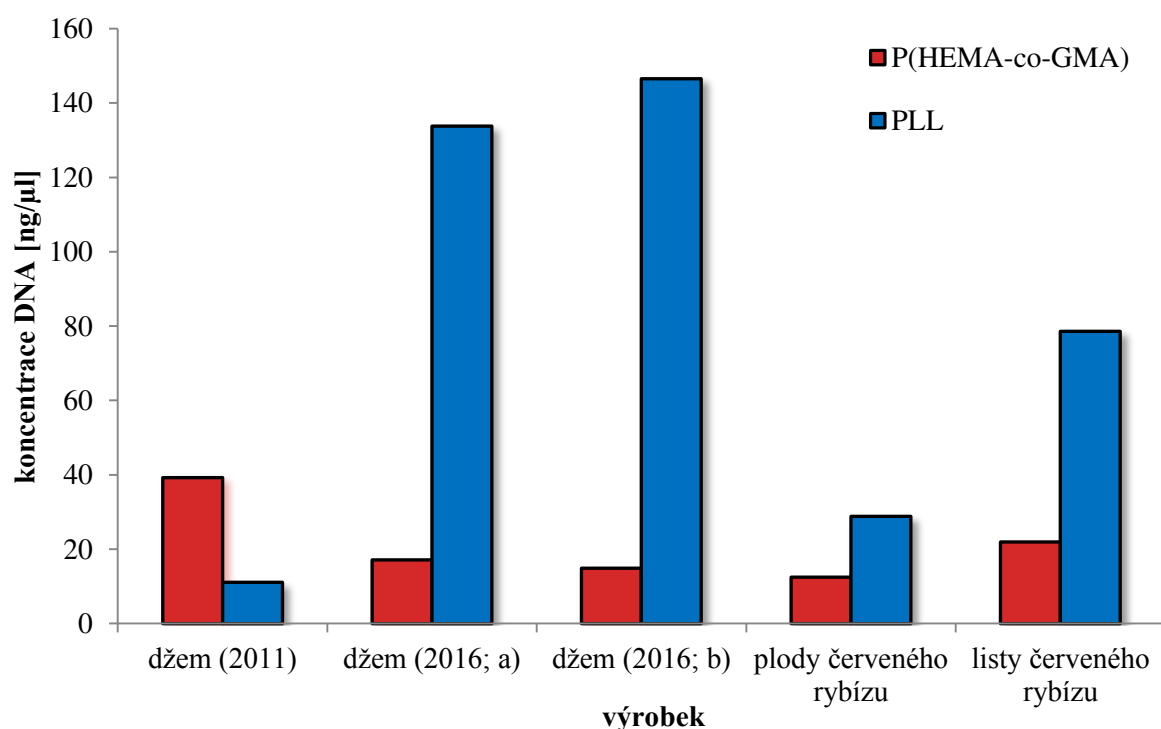
Pozn.: +, ++, +++ produkt PCR detegován v různé intenzitě, – produkt PCR nedetegován

Obrázek 30: Agarózová gelová elektroforéza produktů PCR (700 bp). Amplifikována byla DNA izolovaná z různě zpracovaných homogenátů pocházejících z džemu (2016; b), zrněk, plodů a listů červeného rybízu za využití primerů 18S_for a 5,8S_rev a DNA polymerázy o koncentraci 5U/μl. Do PCR směsi byly přidány 3 μl DNA

» Detegován byl pouze produkt PCR, který byl amplifikovaný z DNA izolované z listů červeného rybízu. Přidáním většího množství DNA do PCR směsi byla prokázána přítomnost inhibitorů PCR i u vyředěné DNA.

5.7 Porovnání magnetických částic použitých při izolaci DNA z rybízových džemů

V této práci byla testována izolace DNA z rybízových džemů dvěma druhy magnetických částic – P(HEMA-*co*-GMA) a PLL. DNA byla izolovaná za pomoci magnetických částic z různě zpracovaných homogenátů z rybízových džemů (viz kapitola 4.2.1 a 4.2.2), a však pro porovnání účinnosti magnetických částic P(HEMA-*co*-GMA) a PLL byly vybrány podobně zpracované homogenáty. Na Obrázku 31 je zobrazena koncentrace DNA, která byla izolovaná za pomoci magnetických částic P(HEMA-*co*-GMA) z homogenátu, jenž byl připraven homogenizací plastovým kopistem v lyzačního roztoku s CTAB (viz kapitola 5.4) a koncentrace DNA, která byla izolovaná za pomoci magnetických částic PLL z homogenátu, který byl centrifugovaný a obsahoval modifikovaný lyzační roztok s CTAB s přídavkem PVP (II), viz kapitola 5.6.4.



Obrázek 31: Izolované množství DNA u džemů, plodů a listů za využití magnetických částic P(HEMA-*co*-GMA) a PLL v lyzačním roztoku s CTAB (s přídavkem PVP).

» DNA byla izolovaná v různém množství. Koncentrace DNA byla vyšší při využití magnetických částic PLL (s výjimkou džemu (2011)).

6 DISKUZE

6.1 Testování separace DNA částicemi P(HEMA-co-GMA) přímo z rybízových džemů (bez homogenizace)

Při přípravě džemů dochází varem k homogenizaci plodů rybízu, tudíž i k rozrušení buněk a následnému uvolnění DNA do roztoku. Džemy jsou následně tepelně zpracovány, což umožňuje degradaci DNA. Jestli se uvolněná DNA nachází v džemu, bylo ověřeno testováním separace DNA magnetickými částicemi P(HEMA-co-GMA) bez působení lyzačního pufru s CTAB. Vzorky džemů byly naředěny sterilní vodou v poměru 1:1 a ihned byly použity pro separování DNA za pomoci magnetických částic (4.2.3.1), kdy výsledná koncentrace PEG 6 000 byla 8% a 16%.

Z naměřených koncentrací DNA a absorbancí (Tabulka 9) je zřejmé, že k rozrušení buněk a k následnému uvolnění DNA do roztoku při přípravě džemu dochází. Nejvyšší naměřená koncentrace je u džemu (2016; a), kdy DNA z džemu byla izolovaná za přítomnosti 8% PEG 6 000. U této DNA byla také nejvyšší absorbance látek, které absorbují při 230 nm (fenoly), 260 nm (nukleové kyseliny) i 280 nm (proteiny).

Z výsledků je patrné, že koncentrace DNA izolované za přítomnosti 8% PEG 6000 byla vyšší než při využití 16% PEG 6000, avšak DNA izolovaná v přítomnosti 8% PEG 6000 byla však více znečištěna.

6.1.1 Vizualizace DNA na gelu

Tímto stanovením se mělo ověřit, zda-li je DNA izolovaná bez využití homogenizace v lyzačním pufru s CTAB čistá, degradovaná, anebo obsahuje malé množství DNA a tudíž jsou hodnoty absorbance ($A_{260\text{nm}}$) zapříčiněny jinými látkami (dochází k překryvu).

Na gelu (Obrázek 8) byla vizualizována pouze kontrolní DNA fága lambda o různých koncentracích. Vzorky izolované DNA vizualizovány nebyly. Tudíž byla DNA degradovaná nebo byla izolována ve velmi malém množství. Vyšší hodnoty absorbancí a koncentrací mohou být zapříčiněny jinými látkami než nukleovými kyselinami (např. polyfenoly, které absorbují při 240–280 nm, proteiny, které mají absorpční maximum při 280 nm [49]).

6.2 Homogenizace džemů, plodů a listů červeného rybízu

6.2.1 Testování homogenizace pomocí kopistu

Pro izolaci DNA z džemu se testovala modifikovaná metoda CTAB, která se využívá pro izolaci rostlinné DNA. Vzorky rostlinného původu obsahují velké množství polysacharidů, polyfenolů a proteinů [45]. Po rozrušení buněk může dojít k jejich absorpci na DNA, proto je velmi důležité tyto látky odstranit. Za tímto účelem se ke vzorku džemu přidává lyzační roztok s CTAB v přítomnosti vyšší koncentrace NaCl (pro odstranění polysacharidů) a merkaptoethanol, který se využívá k odstranění polyfenolů.

Plastový kopist byl využit k homogenizaci vzorků, při čemž došlo k rozrušení buněk, tkání a zrnek, čímž se DNA uvolnila do roztoku. DNA izolovaná z džemu byla degradovaná, což bylo zřejmě zapříčiněno tepelným zpracováním produktu. Relativně nedegradovaná DNA

je uložena v zrnkách rybízu, proto je velmi důležité dbát na šetrnou homogenizaci, čímž dochází k uvolnění DNA do roztoku. Homogenizace se provádí za chladu, aby se předešlo enzymatické degradaci DNA. Do lyzačního roztoku s CTAB se přidává EDTA, která vyvazuje kationty nezbytné pro aktivitu nukleáz [50].

6.2.2 Příprava homogenátů v lyzačním roztoku s CTAB s přídavkem nebo bez přídavku chloroform-oktanolu

Po homogenizaci v lyzačním roztoku s CTAB za pomoci plastového kopistu byl testován přídavek chloroform-oktanolu. Po následné centrifugaci došlo k rozdělení homogenátů do fází. Vzorky, které byly připraveny v lyzačním roztoku s CTAB bez přídavku chloroform-oktanolu, byly rozděleny na sediment a supernatant. Vzorky, jež obsahovaly lyzační roztok s CTAB s přídavkem chloroform-oktanolu, byly rozděleny na tři fáze, kdy jednu fázi tvořil přímo chloroform-oktanol, což je zdokumentováno i na Obrázku 10.

Podle Obrázku 10 je patrné, že vzorek a) (džem (2011) po inkubaci v lyzačním pufru s CTAB) byl po centrifugaci rozdělen na sediment a supernatant. Pro izolaci DNA (4.2.3.1) byl odebrán supernatant, který byl mírně zabarvený. Sediment obsahoval hrubé nečistoty vzniklé při homogenizaci.

U vzorku b) (džem (2011) po inkubaci v lyzačním pufru s CTAB s následným přídavkem chloroform-oktanolu) se po centrifugaci vytvořily tři vrstvy. Spodní vrstva obsahovala chloroform-oktanol, prostřední vrstvu tvořily proteiny a nečistoty z džemu a horní vrstva obsahovala vodnou fázi s DNA. Ta fáze, která obsahovala DNA, byla následně odpipetována do čisté Eppendorfovy zkumavky a byla použita pro separaci za pomoci magnetických nosičů P(HEMA-*co*-GMA) (dle kapitoly 4.2.3.1).

Z ostatních vzorků (džem (2016; a), džem (2016; b), plody a listy červeného rybízu) byl po působení lyzačního roztoku s CTAB a po centrifugaci odebrán supernatant, který byl použit pro separaci DNA za pomoci magnetických částic P(HEMA-*co*-GMA) (4.2.3.1). Supernatant byl u všech vzorků zakalený, nejsilněji však u vzorku d) (džem (2016; b)). Sedimenty obsahovaly hrubé nečistoty.

6.2.3 Testování homogenizace za pomoci stomacheru

Testování homogenizace za pomoci stomacheru bylo provedeno dle kapitoly 4.2.2. Přístroj homogenizuje vzorky za pomoci pedálu, což umožňuje rychlé a spolehlivé rozmělnění a promíchání. Speciální sáček s membránou zabraňuje pronikání větších kousků do homogenátů. Vzniklý homogenát byl zabarvený a kalný. Testovány byly čtyři různě zpracované homogenáty:

- homogenát (I),
- homogenát + lyzační roztok s CTAB (II),
- homogenát + lyzační roztok s CTAB + chloroform-oktanol (III),
- homogenát + lyzační roztok s CTAB + chloroform-oktanol + isopropanol a přesrážení DNA + rozpuštění sedimentu DNA v TE pufru (IV)

Tato metoda homogenizace je na rozdíl od homogenizace za pomoci kopistu (4.2.1) velmi rychlá. Nedochází však k rozmělnění zrníček rybízu, ve kterých se nachází nedegradovaná DNA. Proto po ukončení homogenizace byly ze sáčku s membránou zrnka rybízu vybrány

a byly homogenizovány za pomoci plastového kopistu bez přidavku chloroform-oktanolu (viz kapitola 4.2.1).

6.3 Testování izolace DNA částicemi P(HEMA-co-GMA) z homogenátů rybízového džemu (2011) s přidavkem a bez přidavku chloroform-oktanolu

Homogenát obsahující DNA byl získán homogenizací džemu (2011) plastovým kopistem v lyzačním roztoku s CTAB (4.2.1). DNA byla následně z homogenátu izolována magnetickými částicemi P(HEMA-co-GMA) (podle postupu v kapitole 4.2.3.1). Cílem této kapitoly bylo určit, zda-li přidavek chloroform-oktanolu zlepšuje čistotu a amplifikovatelnost izolované DNA z tepelně zpracovaných výrobků (džemů). Výsledky s přidavkem chloroform-oktanolu a bez přidavku chloroform-oktanolu jsou dosti podobné. Z naměřených koncentrací, jednotlivých poměrů absorbancí a křivek závislosti absorpance DNA na vlnových délkách (Tabulka 10; Obrázek 12) je patrné, že izolovaná DNA je silně znečištěná. Rozdíly v množství izolované DNA jsou zřejmě dány odběrem džemu, kdy závisí především na obsahu zrníček, které obsahují méně degradovanou DNA. Přítomnost chloroform-oktanolu výrazně neovlivňovala hodnotu $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$. Koncentrace DNA byla dostačující k tomu, aby byly vzorky podrobeny PCR. Jestliže se hodnota $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ nachází v rozmezí 1,8–2,0 lze izolovanou DNA považovat za čistou (nekontaminovanou proteiny či RNA). Pokud je hodnota $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ nižší než 1,8 je DNA kontaminovaná proteiny, pokud je tato hodnota vyšší než 2,0 – DNA je znečištěna RNA. Dalším ukazatelem čistoty DNA je poměr absorbancí $A_{230\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$. Pokud se naměřená hodnota liší od rozmezí 1,8–2,2 může být DNA znečištěna fenoly, solemi, bílkoviny či polysacharidy [51].

Dle produktů PCR (Obrázek 13) lze konstatovat, že u DNA, která byla čištěna chloroform-oktanolem, byl po amplifikaci detegován produkt PCR slaběji, než u DNA bez přidavku chloroform-oktanolu. Detegovány byly i nespecifické produkty PCR – dimery primerů. Jelikož by metoda izolace měla být co nejjednodušší – chloroform-oktanol nebyl dále přidáván.

6.4 Izolace DNA z různých džemů, plodů červeného rybízu a listů částicemi P(HEMA-co-GMA)

DNA byla izolovaná ze všech vzorků džemů, listů a plodů za pomoci magnetických částic P(HEMA-co-GMA) dle postupu uvedeném v kapitole 4.2.3.1. Dle naměřených koncentrací DNA a křivek závislosti absorpance DNA na vlnové délce (Tabulka 11; Obrázek 14) lze říci, že DNA je znečištěna, a to především polyfenoly a proteiny. Nejvyšší hodnota absorpance je okolo 250 nm, kdy při této vlnové délce absorbují fenolické látky.

Naměřená koncentrace DNA je nejvyšší u džemu z červeného rybízu (2011). Tento vzorek má však také nejvyšší absorpanci při 240 nm, což znamená, že obsahuje hodně polyfenolů, čímž může být ovlivněna právě i hodnota koncentrace (může docházet k překryvu). DNA byla u všech vzorků izolovaná v dostatečném množství pro PCR.

6.4.1 Amplifikace DNA

DNA byla podrobena PCR. Pro amplifikaci izolované DNA byly použity primery publikované v [48]. Produkty PCR byly detegovány. Intenzivní produkt PCR byl detegován v běhu č. 16 (Obrázek 15). Tento běh obsahoval amplikon po amplifikaci DNA izolované z listu červeného rybízu a plodu červeného rybízu. Tato DNA byla amplifikována především z toho důvodu, že tyto tkáně nebyly nikterak zahřívány a nedocházelo tedy k degradaci či nalámání DNA. Obdobných výsledků bylo také dosaženo v publikaci [52], kde nejvyšší čistotu měla DNA, která byla izolovaná z ovocných plodů a listů jabloně a kdouloně. Tato DNA byla následně amplifikována a amplikony byly detegovány silněji než amplikony, které obsahovaly amplifikovanou DNA z džemů.

Dále byl detegován produkt PCR v běhu č. 4 a č. 6. Tyto běhy obsahovaly amplikony z džemu (2016; a). Slabě detegován byl také produkt PCR po amplifikaci DNA z džemu (2016; b). Produkty PCR byly slabé intenzity.

6.4.2 Amplifikace DNA v přítomnosti enhanceru PCR

Amplifikace DNA fragmentů pomocí PCR vyžaduje optimalizaci reakčních podmínek, čímž se odstraňují nežádoucí produkty a především se zvyšuje množství PCR produktu. Optimalizace může být provedena přidáním aditiv, kdy jednou z možností je právě PCR enhancer, který je v kvalitě vhodné pro přímé přidání do reakční směsi PCR [53].

Po přidání enhanceru byly detegovány slabé produkty PCR po amplifikaci všech DNA (Obrázek 16). Došlo tedy k částečnému odstranění látek inhibujících amplifikaci DNA. Nejsilněji byl detegován produkt PCR v běhu č. 14, který obsahoval produkt PCR po amplifikaci DNA izolované z listu červeného rybízu. Tento produkt PCR byl nejsilněji detegován zřejmě z toho důvodu, že při přípravě vzorku nedocházelo k žádnému tepelnému zpracování, tudíž nemohlo dojít k degradaci DNA. Stejného výsledku bylo dosaženo i v kapitole 5.4.1. Tepelné zpracování má vliv na amplifikaci DNA. Při teplotách vyšších než 100 °C dochází ke štěpení a k nevratné ztrátě sekundární struktury DNA [54].

6.5 Vícenásobné opakování izolace DNA částicemi P(HEMA-co-GMA), její zakoncentrování přesrážením a gelová elektroforéza

DNA byla izolovaná z homogenátů různých džemů, listů a plodů červeného rybízu pomocí magnetických částic P(HEMA-co-GMA) ve čtyřech opakováních. Toto stanovení bylo provedeno především z toho důvodu, aby byla ověřena přesnost metody a také aby bylo získáno větší množství DNA potřebné k zakoncentrování pomocí ethanolu (viz kapitola 4.2.4) a vizualizaci DNA na gelu.

Naměřené koncentrace DNA byly u všech vzorků podobné (viz Tabulka 12). Nejmenší koncentrace byla naměřena u džemu (2016; a) (stejných výsledků bylo dosaženo i v kapitole 5.4), což může být zapříčiněno delším varem při přípravě džemu. Závislost absorbance DNA na vlnové délce zobrazené na Obrázku 17 ukazují, že DNA je znečištěna polyfenoly.

Vícenásobným opakováním izolace DNA ze všech druhů džemů, plodů a listů červeného rybízu bylo prokázáno, že metoda je relativně přesná (naměřené hodnoty koncentrací

a jednotlivých absorbancí jsou dosti podobné – viz Tabulka 12). Výchyly v naměřených koncentracích u vzorků džemů a plodů červeného rybízu mohou být způsobeny obsahem zrníček a jejich správnou homogenizací.

6.5.1 Zakoncentrování DNA po přesrážení ethanolem

DNA, která byla vícenásobně izolovaná (kapitola 5.4), byla přesrážena ethanolem, čímž dochází k zakoncentrování DNA. Tato metoda se využívá k purifikaci DNA a ke zvýšení její koncentrace, když se po přesrážení rozpustí v menším množství pufru [38].

Podle naměřených dat a křivek závislosti absorpance DNA na vlnových délkách (Tabulka 13; Obrázek 18) je zřejmé, že koncentrace přesrážené DNA je vyšší než u vzorků před srážením. K vzrůstu koncentrace izolované DNA došlo především u vzorků džemů. Naopak u vzorků listů a plodů došlo k poklesu koncentrace DNA, což mohlo být zapříčiněno přesušením či ztrátou DNA při postupu. Na rozdíl od DNA před srážením (Tabulka 12) obsahují tyto vzorky DNA i velké množství polyfenolů. Nejvíce fenolů a jiných látek absorbujících při 230 nm obsahuje džem (2011) a džem (2016; b). Tyto vzorky jsou znečištěné i proteiny.

6.6 Izolace DNA částicemi PLL z rybízových džemů

6.6.1 Příprava homogenátů džemů a jejich zpracování

Pro homogenizaci džemů byl použit stomacher. Byl použit především z toho důvodu, že dochází k rychlé a účinné homogenizaci. Džem, který byl homogenizován ve stomacheru, byl dále zpracován (4.2.2). Různě zpracované homogenáty se od sebe lišily obsahem různých látek a následně také zabarvením (viz Obrázek 20). U prvního odběru vzorku pro separaci DNA magnetickými částicemi PLL (I), což byl přímo homogenát získaný po homogenizaci ve stomacheru, byl vzorek silně zakalený i zabarvený. Druhý odběr (II) byl proveden po přidavku lyzačního roztoku s CTAB s přidavkem merkaptoethanolu, po následné inkubaci a centrifugaci. Vzorek byl po centrifugaci rozdělen na sediment a supernatant, který byl stále silně zakalený. Intenzita barvy byla již nižší. U třetího odběru homogenátu (III), jenž byl proveden po přidavku chloroform-oktanolu, se po centrifugaci vytvořily v Eppendorfově zkumavce tři vrstvy. Spodní vrstvu tvořil chloroform-oktanol. Prostřední vrstvu tvořily proteiny. Vodná (horní) fáze obsahovala DNA a byla čirá jen s mírným růžovým zabarvením. Poslední odběr byl proveden po přidavku isopropanolu, přesrážení DNA, centrifugaci a po rozpuštění sedimentu v TE pufru (IV). Tento vzorek byl čirý a téměř bezbarvý.

Zabarvení vzorků bylo prokázáno i po namíchání separačních směsí obsahujících částice PLL o koncentraci 1 mg/ml (Obrázek 21). Intenzita zabarvení mohla negativně ovlivňovat spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA i amplifikaci.

6.6.2 Izolace DNA z různě zpracovaných homogenátů z džemu (2016; a)

Vzorek džemu (2016; a) byl homogenizován ve stomacheru za pomoci pedálů. Vzniklý homogenát byl dále zpracováván (viz kapitola 4.2.2). Z různě zpracovaných homogenátů (I–IV) byla magnetickými částicemi PLL izolována DNA (4.2.3.2), u které byla spektrofotometricky stanovena koncentrace (4.2.5). Byly porovnávány centrifugované a necentrifugované homogenáty.

Z naměřených hodnot koncentrací a absorbancí (Tabulka 14) je patrné, že vyšší absorbanci při 260 nm mají vzorky, které byly před zpracováním centrifugovány. Centrifugace byla prováděna především z toho důvodu, aby došlo k odstranění hrubších částic a zákalu. Tyto vzorky však obsahují větší množství fenolů či jiných látek, které absorbují při 230 nm. Izolovaná DNA je v obou případech znečištěna proteiny. Z křivek (závislost absorbance DNA na vlnové délce – Obrázek 22) je patrné, že vzorky jsou také znečištěny polyfenoly a proteiny. Čím více byly homogenáty (I–IV) upravovány, tím docházelo ke snižování koncentrace DNA stanovené z hodnoty $A_{260\text{nm}}$. Nejvyšší naměřená koncentrace byla u homogenátu přímo po homogenizaci (I) a poté u homogenátu, do kterého byl následně přidán lyzační pufr s CTAB s přídavkem merkptoethanolu (II). Docházelo také ke snižování koncentrace fenolů a poměru $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$. Zřejmě dochází k překryvu absorbance DNA dalšími látkami (polyfenoly).

Z naměřených výsledků je patrné, že koncentrace DNA izolované magnetickými částicemi PLL je vyšší než koncentrace DNA, která byla izolovaná magnetickými částicemi P(HEMA-co-GMA). Částice PLL jsou menší a tudíž mají větší povrch umožňující navázat velké množství ligandů [31].

6.6.2.1 Amplifikace DNA

DNA separovaná magnetickými částicemi PLL byla amplifikována za použití primerů 18S_for a 5,8_rev. Výsledné produkty byly detegovány na 1,2% agarózovém gelu (Obrázek 23). Detegovány byly především běhy, které obsahovaly produkty PCR po amplifikaci DNA z homogenátů, jenž byly po homogenizaci ve stomacheru centrifugovány (viz kapitola 4.2.3.2). Nejsilněji byl detegován amplikon v běhu č. 15. V tomto běhu se nacházel amplikon z homogenátu, který nebyl nikterak upravovaný (I) a DNA byla 100x zředěná. Především byly detegovány produkty PCR po amplifikaci zředěné DNA, což svědčí o tom, že DNA obsahovala inhibitory PCR.

6.6.3 Izolace DNA modifikovaným lyzačním roztokem s CTAB s přídavkem PVP z různě zpracovaného homogenátu džemu (2016; a)

Jelikož ve vzorcích přetrvává velké množství polyfenolů, byl k lyzačnímu roztoku s CTAB přidán PVP, který napomáhá k jejich odstranění [49]. Džem byl homogenizován ve stomacheru a z různě upravených homogenátů (I–IV) byla separována magnetickými částicemi PLL (0,1 mg/ml) DNA. Separace na magnetickém separátoru byla prodloužena na 20 minut. Byla také vyzkoušena vyšší koncentrace magnetických částic. Při použití koncentrace magnetických částic 0,5 mg/ml došlo k špatné separaci DNA. Vzorky byly po separaci zabarvené (II) a částice nešlo dále oddělit. Při promývání ethanolom byly vytvořeny agregáty, které nešlo resuspendovat (především III a IV). Naměřená koncentrace

DNA i křivky byly ovlivněny přítomností částic. Z těchto výsledků bylo usouzeno, že pro další separaci bude dále využívána pouze nižší koncentrace magnetických částic.

Zrnička zbylá v sáčku po homogenizaci byla vybrána a byla homogenizována za pomoci plastového kopistu (4.2.1). DNA z nich byla separována magnetickými částicemi PLL o koncentraci 0,1 mg/μl.

U izolované DNA byla spektrofotometricky měřena koncentrace (viz Tabulka 15). Vyšší hodnota $A_{260\text{nm}}$ byla naměřená u homogenátů, které byly před zpracováním centrifugovány a tudíž byly v tomto kroku odstraněny hrubé částice a zákal (výsledky shodné s kapitolou 5.6.2). Nejvyšší naměřená koncentrace byla u homogenátu, ke kterému byl přidáván lyzační roztok s CTAB a PVP s přídavkem merkptoethanolu (II). Ze závislosti absorbance DNA na vlnové délce (Obrázek 24) je patrné, že vzorky jsou znečištěny polyfenoly (včetně zrněk), i přes přídavek PVP. U homogenátu, do kterého byl přidán lyzační pufru s CTAB a PVP s přídavkem merkptoethanolu (II), se nacházejí dvě maxima (232 a 240 nm). Tento tvar křivky je zřejmě zapříčiněn zůstatkem lyzačního pufru s CTAB a PVP ve vzorku. Z poměru $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ vyplývá, že vzorky jsou znečištěny i proteiny.

6.6.3.1 Amplifikace DNA

Izolovaná DNA byla v dostatečné kvalitě pro PCR. DNA byla amplifikována za použití primerů 18S_for a 5,8_rev. PCR produkty byly detegovány pomocí gelové elektroforézy. Nejsilněji byly detegovány amplikony po amplifikaci DNA ze zrněk. Čímž se prokázalo, že DNA v zrnkách je méně degradovaná než DNA v džemech. Dále byly detegovány běhy, které obsahovaly amplikony po amplifikaci ředěné DNA. DNA, která nebyla ředěná, nedávala vizualizovatelný amplikon. Vzorky DNA obsahují tedy značné množství inhibitorů, které lze vyředit. Pro další stanovení byla proto využívána pouze ředěná DNA.

Při použití lyzačního roztoku s přídavkem PVP nedošlo k odstranění polyfenolů, naopak došlo ke zvýšení absorbance při 230 nm a také ke zvýšení hodnoty $A_{260\text{nm}}$. Produkty PCR byly však čteněji detegovány po amplifikaci DNA izolované s přídavkem PVP než bez přídavku PVP.

6.6.4 Izolace DNA modifikovaným lyzačním roztokem s CTAB z různě zpracovaných homogenátů z více druhů džemů, plodů a listů červeného rybízu

Z předchozích výsledků (kapitola 6.6.2 a 6.6.3) bylo usouzeno, že vyšších hodnot koncentrace DNA a lepší amplifikovatelnosti bylo dosaženo u centrifugovaných homogenátů, ke kterým byl přidáván lyzační roztok s CTAB a PVP. Všechny druhy džemů, plody a listy červeného rybízu byly homogenizovány ve stomacheru. Vzniklý homogenát byl zcentrifugován a poté dále upravován (viz kapitola 4.2.2). Z takto připravených homogenátů (I–IV) byla separována DNA magnetickými částicemi PLL. Zrnka, která zbyla po homogenizaci ve stomacheru v sáčcích, byla vybrána do Eppendorfovy zkumavky, kde byla homogenizována plastovým kopistem (4.2.1).

U DNA byla měřena koncentrace a čistota DNA (viz Tabulka 16). Nejvyšší koncentrace DNA byla naměřena u zrněk džemu (2011). Koncentrace DNA v homogenátech z džemu (2011) byla naopak nejnižší. DNA nebyla zřejmě při přípravě uvolněna do roztoku a zůstala v zrnkách. Nejvyšší naměřená koncentrace byla u homogenátů, ke kterým byl následně

přidán lyzační roztok s CTAB a PVP (II). Koncentrace DNA pocházející z homogenátů, ke kterým byl přidán chloroform-oktanol a isopropanol je nižší. Z křivek (Obrázek 26) je patrné, že DNA je znečištěna především polyfenoly. Dále je znečištěna proteiny ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ je nižší než 1,8).

6.6.4.1 Amplifikace DNA

DNA byla podrobena PCR, protože cílem je izolovat amplifikovatelnou DNA. Produkty PCR byly detegovány na 1,2% agarózovém gelu (Obrázek 27; Obrázek 28). Nejsilněji detegovány byly amplikony pocházející z DNA listů. Listy nebyly oproti džemům nikterak zahřívány. Gely obsahují šmouhy DNA, které byly nejspíš zapříčiněny primery, které mohou být málo purifikované nebo degradované.

6.6.4.2 PCR produkty po amplifikaci většího množství DNA

Jelikož byly detegovány slabé produkty PCR (kapitola 5.6.4.1) byly do PCR směsi přidány 3 μl DNA na úkor PCR vody. Mělo dojít k zesílení produktu PCR. Výsledné produkty PCR byly detegovány za pomoci gelové elektroforézy (Obrázek 29; Obrázek 30). Byl detegován amplikon v běhu č. 15 na Obrázku 30. Tento běh obsahoval amplikon po amplifikaci DNA izolované z listů červeného rybízu. DNA izolovaná z džemů, zrněk a plodů nedávala po amplifikaci vizualizovatelný PCR produkt. DNA obsahuje inhibitory, které zabraňují amplifikovatelnosti. Gel obsahoval opět šmouhy DNA i po změně všech komponentů PCR.

6.7 Porovnání magnetických částic použitých při izolaci DNA z rybízových džemů

Byly testovány dva druhy magnetických částic – mikročástice P(HEMA-co-GMA) a nanočástice PLL. Výsledné koncentrace izolované DNA jsou zobrazeny na Obrázku 31. Vyšší koncentrace DNA bylo dosaženo za pomoci magnetických nanočástic PLL (s výjimkou džemu (2011)). U džemu (2011) byla naopak naměřena nejvyšší koncentrace DNA v zrníčkách (viz Tabulka 16). Tudíž lze předpokládat, že se v džemu nacházela především degradovaná DNA a při homogenizaci nedošlo k rozrušení zrníček a uvolnění DNA do roztoku. Jinou možností je, že dužina plodu obsahuje oproti zrnkům (embryu) malé množství DNA. Vyšší koncentrace izolované DNA za pomoci magnetických částic PLL se dala předpokládat a to především z toho důvodu, že tyto magnetické částice jsou menší a tudíž mají větší povrch pro adsorpci DNA.

7 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo vytvoření neoptimálnějšího postupu pro izolaci DNA z rybízových džemů o dostatečné kvalitě vhodné pro PCR. Po porovnání výsledků bylo zjištěno, že přídavek ztužovacího přípravku pro vytvoření vhodné rosolovité konzistence k džemu neměl výrazný vliv při izolaci DNA. Následně předpokládáme, že tepelným zpracováním výrobku dochází k částečné degradaci DNA, což značně ovlivňuje amplifikovatelnost DNA v PCR. Dále bylo zjištěno, že nedegradovaná DNA se nachází u rybízových džemů v zrnkách, která zůstanou v sáčku po homogenizaci stomacherem.

Vyšší koncentrace DNA bylo dosaženo při použití modifikovaného lyzačního roztoku s CTAB s přídavkem PVP a při využití magnetických nanočástic PLL. Z těchto kritérií vyplývá jako nejvhodnější postup následující:

Do stomacherového sáčku s membránou bylo naváženo 20 g džemu a bylo přidáno 20 ml TEN pufru. Při vážení bylo dbáno na to, aby se navážka nacházela na dně sáčku, nikoliv po stěnách. Připravená směs byla homogenizována za pomoci stomacheru po dobu 2 minut. Vzniklý homogenát byl centrifugován při 14 500 g po dobu 3 minut a po centrifugaci bylo do čisté Eppendorfovy zkumavky odpipetováno 750 μ l vzniklého supernatantu, k němuž bylo následně přidáno 750 μ l modifikovaného lyzačního roztoku s CTAB s přídavkem merkptoethanolu (3 ml modifikovaného lyzačního roztoku s CTAB s přídavkem PVP + 3 μ l merkptoethanolu). Vzorek byl poté inkubován za stálého protřepávání 1 hodinu při 65 °C. Takto upravený homogenát byl podroben separaci magnetickými nanočásticemi PLL o koncentraci 0,1 mg/ml v prostředí 16% PEG 6000. Připravená směs s magnetickými částicemi byla inkubována při laboratorní teplotě po dobu 15 minut. Poté byly vzorky vloženy na magnetický separátor a separace probíhala 20 minut. Supernatant byl odpipetován a magnetické nosiče s navázanou DNA byly dvakrát promyty 70% ethanolem (500 a 100 μ l). Eluce DNA probíhala přes noc v 50 μ l TE pufru. Izolovaná DNA byla 10x a 100x naředěna a amplifikována v PCR za využití primerů 18S_for a 5,8S_rev a DNA polymerázy o koncentraci 5U/ μ l. Produkty PCR byly detegovány agarózovou gelovou elektroforézou na 1,2% gelu.

Po homogenizaci rybízového džemu za pomoci stomacheru zůstaly zachyceny v membráně zrníčka, které byly odebrány do čisté Eppendorfovy zkumavky. K těmto zrníčkům bylo přidáno 750 μ l modifikovaného lyzačního roztoku s CTAB s přídavkem merkptoethanolu. Pomocí plastového kopistu byla provedena homogenizace, která probíhala za stálého chlazení. Následně byl vzorek inkubován 1 hodinu při 65 °C. Dále bylo postupováno jako u izolace DNA z džemů.

Postup mikroizolace DNA z rybízových džemů v kvalitě vhodné pro PCR s využitím magnetických částic je nutno dále optimalizovat. Například moje výsledky ukazují, že bude zapotřebí vyvinout jednoduchou separaci plodových zrněk (kde se nachází poměrně vysoká koncentrace DNA) od ostatních složek džemu. Rovněž mnou používaný PCR produkt je relativně dlouhý a vyžaduje tedy dlouhou templátovou genomovou DNA, která je však přítomna jen ve velmi malém množství v tepelně zpracovaných ovocných produktech, jako jsou džemy. Lze očekávat, že snížením velikosti amplikonu by se mohlo dosáhnout vyšších výtěžků PCR a tím i celkového zcitlivění genetické analýzy. Výsledky v této

diplomové práci by mohly posloužit při dalším studiu izolace rostlinné DNA magnetickými částicemi.

Část výsledků obsažených v diplomové práci byla prezentována na studentské vědecké konferenci – Chemie je život.

8 LITERATURA

- [1] ČÍŽKOVÁ, H., ŠEVČÍK, R., RAJCHL, A., PIVOŇKA, J., VOLDŘICH, M. Trendy v autenticitě potravin a v přístupech k detekci falšování. *Chemické Listy*. 2012, (106), 903-910.
- [2] LOHUMI, S., LEE, S., LEE, H., CHO, B-K. A review of vibrational spectroscopic techniques for the detection of food authenticity and adulteration. *Trends in Food Science & Technology*. 2015, **46**(1), 85-98. DOI: 10.1016/j.tifs.2015.08.003. ISBN 10.1016/j.tifs.2015.08.003. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092422441500196X>
- [3] MADESIS, P., GANOPOULOS, I., SAKARIDIS, I., ARGIRIOU, A., TSAFTARIS, A. Advances of DNA-based methods for tracing the botanical origin of food products. *Food Research International*. 2014, (60), 163-172. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.10.042. ISBN 10.1016/j.foodres.2013.10.042. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996913005905>
- [4] POREBSKI, S., BAILEY, L. G., BAUM, B. R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*. **15**(1), 8-15. DOI: 10.1007/BF02772108. ISBN 10.1007/BF02772108. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02772108>
- [5] CUHRA, P. Zkušenosti s prokazováním falšování potravin v uplynulých letech. ČÍŽKOVÁ, H. *Metody a kriteria pro ověřování autenticity potravin a potravinářských surovin*. Ostrava: Key Publishing, 2011, s. 8-15. ISBN 978-80-7418-124-5.
- [6] COLEY, N. The fight against food adulteration. *Royal Society of Chemistry* [online]. 2005 [cit. 2017-04-05]. Dostupné z: <https://eic.rsc.org/section/feature/the-fight-against-food-adulteration/2020253.article>
- [7] CORRADO, G. Advances in DNA typing in the agro-food supply chain. *Trends in Food Science & Technology*. 2016, (52), 80-89. DOI: 10.1016/j.tifs.2016.04.003. ISBN 10.1016/j.tifs.2016.04.003. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224415300972>
- [8] WOOLFE, M., GURUNG, T., a WALKER, M. J. Can analytical chemists do molecular biology? A survey of the up-skilling of the UK official food control system in DNA food authenticity techniques. *Food Control*. 2013, 33(2), 385–392. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.03.015. ISBN 10.1016/j.foodcont.2013.03.015. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713513001370>

- [9] TRANTAKIS, I. A., CHRISTOPOULOS, T. K., SPANIOLAS, S., KALAITZIS, P., IOANNOU, P. C., TUCKER, G. A. Quantitative Bioluminometric Method for DNA-Based Species/Varietal Identification in Food Authenticity Assessment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012, (60), 912-916. DOI: 10.1021/jf203531h. ISBN 10.1021/jf203531h. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf203531h>
- [10] HRIČOVSKÝ, I. *Rybíz, angrešt na zahrádce*. 2. Praha: SZN - Státní zemědělské nakladatelství, 1990. ISBN 80-209-0097-7.
- [11] DUŠKOVÁ, L., KOPŘIVA, J. *Pěstujeme rybíz, angrešt a jostu*. 1. Praha: Grada, 2002. ISBN 80-247-0223-1.
- [12] NOUR, V., STAMPAR, F., VEBERIC, R., JAKOPIC, J. Anthocyanins profile, total phenolics and antioxidant activity of black currant ethanolic extracts as influenced by genotype and ethanol concentration. *Food Chemistry*. 2013, **141**(2), 961-966. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.03.105. ISBN 10.1016/j.foodchem.2013.03.105. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814613004512>
- [13] RICHTER, M. *Malý obrazový atlas odrůd ovoce*. 1. Lanškroun: TG Tisk, 2004. ISBN 80-903487-6-9.
- [14] HARANT, M., ZACHA, V. *Pěstujeme bobuloviny*. 1. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1974. ISBN 07-059-74.
- [15] VYSLOUŽIL, J. *Databáze odrůd ovocných dřevin* [online]. 2014 [cit. 2017-04-08]. Dostupné z: http://jirivyslouzil.cz/database_ovoce/
- [16] DJORDJEVIĆ, B., ŠAVIKIN, K., ZDUNIĆ, G., JANKOVIĆ, T., VULIĆ, T., OPARNICA, Č., RADIVOJEVIĆ, D. Biochemical Properties of Red Currant Varieties in Relation to Storage. *Plant foods for Human Nutrition*. 2010, **65**(4), 326-332. DOI: 10.1007/s11130-010-0195-z. ISBN 10.1007/s11130-010-0195-z. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11130-010-0195-z>
- [17] LIU, P., KALLIO, H., YANG, B. Flavonol glycosides and other phenolic compounds in buds and leaves of different varieties of black currant (*Ribes nigrum* L.) and changes during growing season. *Food Chemistry*. 2014, **160**, 180-189. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.03.056. ISBN 10.1016/j.foodchem.2014.03.056. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614004476>
- [18] MITIĆ, M. N., OBRADOVIĆ, M. V., KOSTIĆ, D. A., MICIĆ, R. J., PAUNOVIĆ, D. Đ. Phenolic profile and antioxidant capacities of dried red currant from Serbia, extracted with different solvent. *Food Science and Biotechnology*. 2011, **20**(6), 1625-1631. DOI: 10.1007/s10068-011-0224-1. ISBN 10.1007/s10068-011-0224-1. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10068-011-0224-1>

- [19] Vyhláška č. 157/2003 Sb.: Vyhláška, kterou se stanoví požadavky pro čerstvé ovoce a čerstvou zeleninu, zpracované ovoce a zpracovanou zeleninu, suché skořápkové plody, houby, brambory a výrobky z nich, jakož i další způsoby jejich označování. In: *Sbírka zákonů České republiky*. 2003, částka 59. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2003-157>
- [20] SAHU, S. K., THANGARAJ, M., KATHIRESAN, K. DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. *ISRN Molecular Biology*. 2012, (2012), 1-6. DOI: 10.5402/2012/205049. ISBN 10.5402/2012/205049. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/205049/>
- [21] HEIN, I., WILLIAMSON, S., RUSSELL, J., POWELL, W. Isolation of high molecular weight DNA suitable for BAC library construction from woody perennial soft-fruit species. *BioTechniques*. 2005, **38**(1), 69-71.
- [22] NUNES, C. F., FERREIRA, J. L., FERNANDES, M. C. N., et al. An improved method for genomic DNA extraction from strawberry leaves. *Ciência Rural*. 2011, **41**(8), 1383-1389. DOI: 10.1590/S0103-84782011000800014. ISBN 10.1590/S0103-84782011000800014. Dostupné také z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext
- [23] MARY, W., DAVIES, H. V., BRENNAN, R. M., TAYLOR, M. A. The isolation of genomic DNA from blackcurrant (*ribes nigrum* L.). *Molecular Biotechnology*. 1998, (9), 243-246. DOI: 10.1007/BF02915797. ISBN 10.1007/BF02915797. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02915797>
- [24] MOYO, M., S.O. AMOO, M.W. BAIRU, J.F. FINNIE a J. VAN STADEN. Optimising DNA isolation for medicinal plants. *South African Journal of Botany*. 2008, **74**(4), 771–775. ISBN 10.1016/j.sajb.2008.07.001. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0254629908002640>
- [25] LUTZ, K. A., WANG, W., ZDEPSKI, A., MICHAEL, T. P. Isolation and analysis of high quality nuclear DNA with reduced organellar DNA for plant genome sequencing and resequencing. *BCM Biotechnol*. 2011, **11**(54). DOI: 10.1186/1472-6750-11-54. ISBN 10.1186/1472-6750-11-54. Dostupné také z: <http://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6750-11-54>
- [26] POREBSKI, S., BAILEY, L. G., BAUM, B. R.. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1997, **15**(1), 8-15. DOI: 10.1007/BF02772108. ISBN 10.1007/BF02772108. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02772108>
- [27] SOUZA, H. A. V., MULLER, L. A. C., BRANDÃO, R. L., LOVATO, M. B. Isolation of high quality and polysaccharide-free DNA from leaves of *Dimorphandra mollis*

- (Leguminosae), a tree from the Brazilian Cerrado. *Genetics and Molecular Research*. 2012, **11**(1), 756-764. DOI: 10.4238/2012.March.22.6. ISBN 10.4238/2012.March.22.6. ISSN 1676-5680. Dostupné také z: <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2012/vol11-1/pdf/gmr1734.pdf>
- [28] TIWARI, K.L., S.K. JADHAV a S. GUPTA. Modified CTAB Technique for Isolation of DNA from some Medicinal Plants. *Research Journal of Medicinal Plant*. 2012, **6**(1), 65-73. DOI: 10.3923/rjmp.2012.65.73. ISBN 10.3923/rjmp.2012.65.73. Dostupné také z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=rjmp.2012.65.73>
- [29] DOBSON, J., McBAIN, S. C., YIU, HP. H. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*. 2008, **3**(2), 169-180. DOI: 10.2147/IJN.S1608. ISBN 10.2147/IJN.S1608. Dostupné také z: <http://www.dovepress.com/magnetic-nanoparticles-for-gene-and-drug-delivery-peer-reviewed-article-IJN>
- [30] HORÁK, D., RITTICH, B., ŠPANOVÁ, A., BENEŠ, M. J. Magnetic microparticulate carriers with immobilized selective ligands in DNA diagnostics. *Polymer*. 2005, (46), 1245-1255. DOI: 10.1016/j.polymer.2004.11.049. ISBN 10.1016/j.polymer.2004.11.049. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386104011553>
- [31] PEČOVÁ, A., ZAJONCOVÁ, L., POLÁKOVÁ, K., et al. Biologicky aktivní látky imobilizované na magnetických nosičích a jejich využití v biochemii a biotechnologii. *Chemické listy*. 2011, (105), 524-530.
- [32] RÖDIGER, S., LIEBSCH, C., SCHMIDT, C., LEHMANN, W., RESCH-GENGER, U., SCHEDLER, U., SCHIERACK, P. Nucleic acid detection based on the use of microbeads: a review. *Microchim Acta*. 2014, (181), 1151-1168. DOI: 10.1007/s00604-014-1243-4. ISBN 10.1007/s00604-014-1243-4. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00604-014-1243-4>
- [33] RITTICH, B., ŠPANOVÁ, A. SPE and purification of DNA using magnetic particles. *Journal of Separation Science*. 2013, **36**(15), 2472–2485. DOI: 10.1002/jssc.201300331. ISBN 10.1002/jssc.201300331. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201300331>
- [34] KUČÍRKOVÁ, L., KRÁLOVEC, K., HAVELEK, R., BRŮČKOVÁ, L., SEDLÁK, M. Toxicita magnetických nanočástic. *Chemické listy*. 2015, (109), 693-700.
- [35] BERENSMEIER, S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, **73**(3), 495–504. DOI: 10.1007/s00253-006-0675-0. ISBN 10.1007/s00253-006-0675-0. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-006-0675-0>

- [36] UMUT, E. Surface Modification of Nanoparticles Used in Biomedical Applications. ALIOFKHAZRAEI, M. *Modern Surface Engineering Treatments*. InTech, 2013, s. 185-208. DOI: 10.5772/55746. ISBN 978-953-51-1149-8. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/modern-surface-engineering-treatments/surface-modification-of-nanoparticles-used-in-biomedical-applications>
- [37] ŠAFARÍK, I., ŠAFARÍKOVÁ, M. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *Journal of Chromatography B*. 1999, (722), 33-53. DOI: 10.1186/1477-044X-2-7. ISBN 10.1186/1477-044X-2-7. Dostupné také z: <http://biomagres.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-044X-2-7>
- [38] ŠPANOVÁ, A., RITTICH, B. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. ISBN 978-80214-4004-3.
- [39] FUKAL, L., RAUCH, P., et al. *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 978-807080-449-3.
- [40] JOSHI, M., DESHPANDE, J.D. POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION. *International Journal of Biomedical Research*. 2010, , 81-97. DOI: 10.7439/ijbr.v2i1.83. ISBN 10.7439/ijbr.v2i1.83. Dostupné také z: <http://ssjournals.com/index.php/ijbr/article/view/640>
- [41] HRSTKA, R., KOLÁŘOVÁ, T., MICHALOVÁ, E., VOJTĚŠEK, B. Vývoj metod založených na PCR a jejich aplikace v onkologickém výzkumu a praxi. *Klin Onkol*. 2014, 27(1), 69-74.
- [42] Principles and Medical Applications of the Polymerase Chain Reaction. *Molecular biomethods handbook*. 2nd ed. / . Totowa, NJ: Humana Press, c2008, s. 29-40. ISBN 978-1-60327-374-9.
- [43] GARIBYAN, L., AVASHIA, N. Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Invest Dermatol*. 2013, **133**(3), 1-4. DOI: 10.1038/jid.2013.1. ISBN 10.1038/jid.2013.1. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X1536139X>
- [44] SCHRADER, C., SCHIELKE, A., ELLERBROEK, L., JOHNE, R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*. 2012, **113**(5), 1014-1026. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x. ISBN 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- [45] ZHANG, L., WANG, B., PAN, L., PENG, J. Recycling Isolation of Plant DNA, A Novel Method. *Journal of Genetics and Genomics*. 2013, **40**(1), 45-54. DOI: 10.1016/j.jgg.2012.10.001. ISSN 16738527. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1673852712001920>

- [46] KUTHAN, M. Hybridizační metody studia nukleových kyselin. *Živa*. 2009, **1**, 44-45.
Dostupné také z: <http://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/hybridizacni-metody-studia-nukleovych-kyselin.pdf>
- [47] LEE, P. Y., COSTUMBRADO, J., HSU, Ch., KIM, Y. H. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*. 2012, (62).
DOI: 10.3791/3923. ISBN 10.3791/3923. Dostupné také z:
<http://www.jove.com/video/3923/>
- [48] KOVARIK, A. a spol. Rapid Concerted Evolution of Nuclear Ribosomal DNA in Two Tragopogon Allopolyploids of Recent and Recurrent Origin. *Genetics*. 2005, **169**(2), 931-944. DOI: 10.1534/genetics. Dostupné také z:
<http://www.genetics.org/cgi/doi/10.1534/genetics.104.032839>
- [49] REZADOOST, M. H., KORDROSTAMI, M., KUMLEH, H. H. An efficient protocol for isolation of inhibitor-free nucleic acids even from recalcitrant plants. *3 Biotech*. 2016, **6**(1), 61. DOI: 10.1007/s13205-016-0375-0. ISBN 10.1007/s13205-016-0375-0.
Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s13205-016-0375-0>
- [50] VINOD, K.K. Total genomic DNA extraction, quality check and quantitation. *Classical and modern plant breeding techniques: A handson training*. Centre for Plant Breeding and Genetics, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, India, 2004, 109-121.
- [51] OLSON, N. D., MORROW, J. B. DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Res Notes*. 2012, **5**(668). DOI: 10.1186/1756-0500-5-668. ISBN 10.1186/1756-0500-5-668. Dostupné také z:
<http://bmcrenotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-5-668>
- [52] ARLEO, M., RUIBAL, F., PEREYRA, J., a spol. A DNA-based approach to discriminate between quince and apple in quince jams. *International Food Research Journal*. 2012, **19**(4), 1471-1477.
- [53] PCR enhancer. *Top-Bio* [online]. Vestec [cit. 2017-04-19]. Dostupné z: <http://www.top-bio.cz/dalsi-material-pro-pcr-21.html?pcr-enhancer-1185>
- [54] GRYSON, N. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. *Analytical Chemistry and Bioanalytical*. 2010, **396**(6), 2003-2022. DOI: 10.1007/s00216-009-3343-2. ISBN 10.1007/s00216-009-3343-2. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-009-3343-2>

9 POUŽITÉ ZKRATKY

zkratka	vysvětlení zkratky
bp	pár bází (base pair)
CTAB	cetyltrimethylammonium bromid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleosidtrifosfát
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
GMA	glycidylmethakrylát
HEMA	hydroxyethylmethakrylát
HCl	kyselina chlorovodíková
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEG	polyethylenglykol
PGMA	poly(glycidyl methakrylát)
P(HEMA- <i>co</i> -GMA)	magnetické částice poly(2-hydroxyethylmethakrylát- <i>co</i> -glycidylmethakrylát)
PLL	magnetické nanočástice oxidů železa pokryté poly(L-lysinem)
PVP	polyvinylpyrrolidon
TMA	tetramethylammonium oxalát

Využití magnetických částic při izolaci DNA z rybízových džemů

Bc. Aneta Hronová

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

doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.

*Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií
Purkyňova 464/118, 612 00, Brno, Česká republika
xchronova@fch.vutbr.cz*

Při identifikaci falšovaných potravin se v poslední době začínají uplatňovat metody založené na genetické analýze. Podmínkou úspěšné analýzy je dostupnost kvalitní DNA. Izolace DNA z tepelně zpracovaných výrobků rostlinného původu je však velmi komplikovaný proces. Hlavním problémem je skutečnost, že rostlinné tkáně obsahují velké množství látek, které nepříznivě ovlivňují kvalitu a amplifikovatelnost DNA v polymerázové řetězové reakci (PCR). Jedná se především o polyfenoly, polysacharidy a proteiny. Z tohoto důvodu je nutné tyto látky ze vzorku odstranit nebo alespoň snížit jejich množství. Další překážkou při izolaci DNA je její degradace, ke které dochází během přípravy a během tepelného zpracování potravinového výrobku.

Cílem práce byla izolace DNA za pomoci magnetických částic z tepelně zpracovaných potravinových výrobků (džemů) vhodná pro PCR a další analýzy. Pro analýzu byly vybrány rybízové džemy, které byly připraveny různými postupy (přítomnost či nepřítomnost ztužovacího přípravku). Džemy byly za chladu homogenizovány různými postupy a získané homogenáty byly následně použity pro izolaci DNA magnetickými částicemi. Byly provedeny dva typy homogenizace – plastový kopist a stomacher. K homogenátu byl přidán lyzační roztok, který ze vzorku odstraňuje polysacharidy a polyfenoly. Jedná se o komplexní roztok obsahující cetyl trimetyl amonium bromid (CTAB) s přísadkou merkaptioethanolu. Dále byl testován vliv chloroform-oktanolu a izopropanolu na deproteinizaci vzorku. Po odstředění komplexů CTAB s proteiny, polyfenoly a polysacharidy byla hrubá frakce DNA purifikována vazbou na magnetické částice. Byly testovány dva druhy magnetických nosičů: mikročástice poly(hydroxyethylmethakrylát-co-glycidylmethakrylát) P(HEMA-co-GMA) a nanočástice oxidů železa pokryté poly(L-lysinem).

Izolovaná DNA byla podrobena spektrofotometrické analýze, kde byla zjišťována její koncentrace a stupeň kontaminace polyfenoly a proteiny. Poté byla testována amplifikovatelnost DNA v reakci PCR. Pro amplifikaci byly využity primery specifické pro rostlinnou ribosomální DNA (dvojice primerů 18S_for a 5,8S_rev amplifikující podoblast ITS1). Produkty PCR s očekávanou délkou 700 bp byly detekovány agarózovou gelovou elektroforézou. V práci bylo prokázáno, že z džemů lze pomocí testovaných magnetických nosičů izolovat DNA v dostatečné kvalitě vhodné pro PCR.

Klíčová slova: izolace DNA, magnetické mikročástice, magnetické nanočástice, PCR