

# **STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST**

**Obor č. 7: Zemědělství, potravinářství a vodní hospodářství**

## **Metody analýzy DNA pro autentizaci máku setého (*Papaver somniferum*)**

**Catherine Anne Portway**  
**Hlavní město Praha**

**Praha, 2020**

# STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 7: Zemědělství, potravinářství a vodní hospodářství

## Metody analýzy DNA pro autentizaci máku setého (*Papaver somniferum*)

## DNA analysis methods for the authentication of *Papaver somniferum*

**Autor:** Catherine Anne Portway

**Škola:** Gymnázium, Praha 5, Na Zatlance 11; Na Zatlance 11, 15000

**Kraj:** Hlavní město Praha

**Konzultant:** Ing. Eliška Čermáková, Ing. Kamila Zdeňková, Ph.D.

**Vedoucí práce:** RNDr. Tereza Krchová, Ph.D.

Praha 2020

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Praze dne 29. 2. 2020 .....

Catherine Anne Portway

## **Poděkování**

Zde bych ráda poděkovala Tereze Krchové za její velkou ochotu a pečlivost při zpracování mé práce. Velké poděkování patří také Elišce Čermákové z FPBT na VŠCHT Praha za její trpělivost a čas, který mi věnovala. Děkuji také Kamile Zdeňkové za užitečné rady a podporu. A také bych ráda poděkovala Zkušební laboratoři ÚBM FPBT na VŠCHT Praha, která mi umožnila využít jejich zázemí.

## **Anotace**

Tato práce se zabývá metodami analýzy DNA pro autentizaci máku setého (*Papaver somniferum*), pomocí kterých by bylo možné rychle a jednoduše odhalit falzifikáty této plodiny. V dnešní době nepoctiví obchodníci nahrazují kvalitní český mák levnějšími odrůdami či mákem technickým (farmaceutickým) pro vyšší zisk. Toto falšování poškozuje dobré jméno českého máku a snižuje jeho oblíbenost u zahraničních klientů. Cílem této práce bylo navrhnout a ověřit metodiky pro autentizaci máku setého založené na analýze DNA s využitím polymerázové řetězové reakce (PCR), izotermické amplifikace DNA (LAMP) a DNA barcodingu, který je založen na porovnání sekvencí různých druhů rostlin. Výsledkem je návrh metodiky využívající porovnání sekvencí pro rozlišení různých druhů rostlin od máku.

## **Klíčová slova**

mák setý; polymerázová řetězová reakce; izotermická amplifikace zprostředkovaná smýčkou; DNA barcoding; horizontální agarózová elektroforéza; spektrofotometrie, DNA analýza

## **Annotation**

This study deals with DNA analysis methods for the authentication of the poppy (*Papaver somniferum*), which would be able to detect counterfeits of this plant easily and quickly. Nowadays rogue traders use cheaper poppy varieties or ones used for pharmaceutical purposes to gain profit. These counterfeits damage the good name of the Czech poppy and reduces its popularity among foreign clients. The aim of this study is a proposal and verification of methods for authentication of this poppy based on a polymerase chain reaction (PCR), isothermal amplification (LAMP) and DNA barcoding, which is based on the comparison of sequences of different plant varieties. The result of my study is a proposal of a method using a comparison of sequences for differentiating varieties of plants from this poppy.

## **Keywords**

poppy; polymerase chain reaction; loop-mediated isothermal amplification; DNA barcoding; horizontal agarose electrophoresis; spectrophotometer, DNA analysis

## OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část .....	8
2.1	Mák setý .....	8
2.2	Falšování máku.....	8
2.3	Izolace DNA .....	9
2.4	Metody používané pro autentizaci máku setého.....	10
2.4.1	Metoda PCR .....	10
2.4.2	Metoda qPCR .....	12
2.4.3	Metoda PCR multiplex.....	12
2.4.4	Sekvenování .....	13
2.4.5	Metoda LAMP.....	13
2.4.6	DNA barcoding .....	14
3	Praktická část .....	15
3.1	Použité chemikálie.....	15
3.2	Použité roztoky a pufry.....	15
3.3	Přístroje a programové vybavení .....	16
3.4	Použité vzorky máku a dalších rostlin.....	17
3.5	Použité metody a postupy.....	18
3.5.1	Homogenizace vzorků.....	18
3.5.2	Izolace DNA kitem NucleoSpin Food kit .....	18
3.5.3	Horizontální agarózová elektroforéza .....	19
3.5.4	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	19
3.5.5	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR).....	21
3.5.6	DNA barcoding .....	23
3.5.7	LAMP.....	24
4	Výsledky a Diskuse.....	25
4.1	Izolace DNA .....	25
4.2	Polymerázová řetězová reakce .....	26
4.2.1	PCR s F3, B3, FIP a BIP primery .....	27
4.2.2	qPCR s rbcL a ITS2 primery .....	28
4.3	LAMP .....	31
4.4	DNA barcoding.....	32
5	Závěr .....	35

6	Seznam zkratek .....	36
7	Bibliografie .....	37

# 1 ÚVOD

Česká republika má velmi dobré podmínky pro pěstování máku setého a je tedy jedním z největších pěstitelů a vývozců potravinářského máku na světě. Český modrý mák má díky své kvalitě ve světě velmi dobré jméno, které je ale kvůli nepoctivým obchodníkům v poslední době ohroženo. Tito obchodníci nahrazují ve svých produktech český modrý mák za levnější odrůdy potravinářského či technického máku.

Je důležité, aby k tomuto falšování docházelo co nejméně. V současnosti je registrace dovozu máku velmi přísná a je také kontrolován obsah morfinových alkaloidů. Podle vyhlášky č. 329/1997 Sb. nesmí obsah morfinových alkaloidů v potravinářských odrůdách máku přesáhnout 25 mg/kg máku. Technický neboli farmaceutický mák, který může být též odrůdou máku setého, má zpravidla vyšší obsah morfinu než registrované české potravinářské odrůdy. Někteří obchodníci ale našli způsob, jak obsah morfinových alkaloidů uměle snížit a takto upravená semena poté vydávají za semena potravinářská. V některých případech bývají semena potravinářských odrůd nahrazována za semena máků okrasných.

Je tedy nutné se dále věnovat vývoji autentizačních metod, které by mohly falzifikáty rychle odhalit, a tím zabránit falšování a poškozování dobrého jména českého máku.

Tato práce se věnuje autentizaci máku setého pomocí metod analýzy DNA, konkrétně pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), izotermické amplifikace zprostředkované smyčkou (LAMP) a tzv. DNA barcodingu, s cílem navrhnout a ověřit metodu, která by byla schopná odhalit druhovou a/nebo odrůdovou záměnu máku.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Mák setý

Mák setý (*Papaver somniferum*) se řadí do čeledi makovité (*Papaveraceae*). Je to prastará rostlina původem z východní a přední Asie.<sup>1</sup> Tato plodina byla lidem prospěšná odjakživa. Její semena obsahují velmi hodnotné oleje a minerální látky jako např. vápník, fosfor, hořčík a draslík. Tato semena se dnes využívají v potravinářství např. jako dochucovadlo či k výrobě jedlého oleje.<sup>2</sup> Latex<sup>i</sup> máku setého obsahuje mnoho druhů alkaloidů, mezi něž patří např. morfin, kodein, thebain či papaverin.<sup>3</sup> Tři z těchto látek (morfin, thebain a kodein) řadíme mezi tzv. fenantrenové alkaloidy a jsou pod mezinárodní kontrolou OSN. Tyto tři alkaloidy se využívají ve farmaceutickém průmyslu a s papaverinem jsou ekonomicky významné. Zároveň ale bývají zneužívány pro výrobu opia či heroinu.<sup>4</sup>

Díky vysokému obsahu morfinu, který se široce využívá jako analgetikum<sup>ii</sup>, je mák velmi žádanou plodinou také ve farmaceutickém průmyslu. Suchá makovina z máku obsahuje rámcově 0,1 až 1 % morfinu (jedná se o hmotnostní podíl). Ve farmaceutickém průmyslu je požadován alespoň 0,25% obsah této účinné látky. V ČR se většinou pěstuje mák s 0,4–0,6 % morfinového obsahu, ale v jiných státech se často pěstují také tzv. vysoko obsahové máky.<sup>5</sup> Například v Maďarsku pěstují mák s morfinovým obsahem 1,5–2,5 %. V Tasmánii jsou pěstovány odrůdy až s 3% obsahem morfinu. Vzhledem k častému zneužívání morfinu je v některých zemích pěstování máku zcela zakázáno (např. Estonsko) a v některých státech je nutné mít k pěstování zvláštní povolení (např. Polsko, Ukrajina).<sup>6</sup> V České republice je třeba se řídit § 29 v zákoně o návykových látkách, který zahrnuje mj. tzv. ohlašovací povinnost při pěstování máku setého na ploše větší než 100 m<sup>2</sup>. Pro vývoz a dovoz této plodiny je navíc nutné získat povolení od ministerstva zdravotnictví.<sup>7</sup>

### 2.2 Falšování máku

Česká republika je jedním z největších pěstitelů a vývozců potravinářského máku na světě. Zároveň je také zemí s největší spotřebou této plodiny. Ročně je v České republice vypěstováno přibližně 28,5 tis. tun máku. Tato masivní produkce je dána především celosvětovou poptávkou a dostatkem vhodné půdy k pěstování této plodiny. Většina české produkce máku je vyvážena do různých koutů Evropy. Vzhledem k tomu, že je mák důležitá součást české kuchyně, je přibližně 5 tisíc tun máku určeno pro tuzemský trh.<sup>8</sup>

Mák pěstovaný v České republice má ve světě velmi dobré jméno díky své skvělé kvalitě, chuti, nutričním vlastnostem a jasné barvě. Tuto reputaci ale postupně ztrácí kvůli dovozu semen máku ze Španělska, Francie i z Tasmánie, kde je pěstován zejména technický (farmaceutický) mák, jehož semena byla původně spalována. Tento odpadní mák, který má vysoký obsah morfinu, výrazně horší chuť a má jinak zbarvená semena, se stal příležitostí pro nepoctivé obchodníky. Ti začali odpadní mák dovážet do ČR, míchat s kvalitním českým mákem a vyvážet tyto produkty pod etiketou „Český modrý mák“ do jiných států.<sup>9</sup>

<sup>i</sup> mléčná tekutina produkovaná mléčnicemi v pletivu máku

<sup>ii</sup> jakákoli látka z rozmanité skupiny léčiv používaných k úlevě od bolesti

Prvního ledna 2014 začala v ČR platit novela vyhlášky č. 329/1997 Sb., vydané podle zákona o potravinách, která v příloze č. 9 limituje obsah morfinových alkaloidů na nejvýše 25 mg/kg máku.<sup>10</sup> Technický mák využívaný při falšování často přesahuje tento limit, a proto se využívá tzv. termostabilizace, což je proces umělého snížení obsahu morfinu primárně u technického máku. Jde o přeměnu technického máku na mák potravinářský. Produkt obsahující kvalitní i technický mák se poté prodává za plnou cenu a je označen za 100% český. Český mák je také často nahrazován méně kvalitními odrůdami dovezenými z ciziny, které mohou mít až o dvě třetiny nižší cenovou hodnotu.<sup>11</sup>

Česká republika se v minulých letech snažila na úrovni Evropské komise prosadit zákon o používání pouze potravinářského máku v potravinářství tak, aby tuto tradiční českou komoditu ochránila. Bohužel však nebyla úspěšná. Evropská komise na základě jednání vydala pouze doporučující dokument<sup>12</sup> o správné praxi pro předcházení a snižování výskytu opiových alkaloidů v máku a makových produktech.<sup>13</sup>

Vzhledem ke stále častějšímu výskytu „falšovaného“ máku na českém trhu se zkušební laboratoř ÚBM<sup>iii</sup> FPBT<sup>iv</sup> na VŠCHT<sup>v</sup> Praha zabývá mj. také vývojem metod pro laboratorní kontrolu máku setého, které by se daly využít k odhalení těchto falzifikovaných produktů. Jednou z takových metod je metoda analýzy DNA, které jsou věnovány následující kapitoly této práce.

## 2.3 Izolace DNA

Aby bylo možné provést analýzu DNA určitého biologického materiálu, je nutné tuto DNA nejprve izolovat. Izolace DNA je proces, při kterém dochází k oddělení DNA od ostatních buněčných materiálů.<sup>14</sup> Tato izolace je nezbytná pro analýzu materiálu například pomocí metody PCR (Polymerase Chain Reaction, polymerázová řetězová reakce),<sup>15</sup> která je určena k rychlému a snadnému množení úseku DNA na principu replikace nukleových kyselin.<sup>16</sup> Přítomnost jiných látek ve vzorku DNA (např. proteinů, lipidů, polysacharidů, případně dalších, ať už organických či anorganických látek) by mohla ovlivnit enzymatické reakce, kterým je izolovaná DNA dále podrobena.<sup>17</sup> Špatný vliv by mohla mít např. přítomnost sekundárních metabolitů, jako jsou např. polysacharidy či polyfenolické sloučeniny.<sup>18</sup> Molekulárně-biologická analýza DNA se využívá např. v medicíně,<sup>19</sup> ve forenzní vědě<sup>20</sup> či k autentizaci potravin.<sup>21</sup>

Izolaci DNA můžeme provést u jakéhokoliv vzorku, který pochází z živého či mrtvého organismu. Může to být tkáň, epitelové buňky, krev nebo také zrnka máku.

Získání DNA probíhá v několika krocích:

- a) Lýza buněk
- b) oddělení DNA od ostatních komponentů buňky
- c) izolace DNA.

Prvním krokem izolace je tzv. lýza (rozpad) buněk. Tento proces je nezbytný pro destrukci proteinových struktur, narušení buněčných membrán a uvolnění nukleových kyselin z buňky. K této destrukci se využívá různých fyzikálních, chemických

---

<sup>iii</sup> Ústav biochemie a mikrobiologie

<sup>iv</sup> Fakulta potravinářské a biochemické technologie

<sup>v</sup> Vysoká škola chemicko-technologická

i enzymatických postupů. Je možné využít např. zvýšenou teplotu, dithiothreitol (DTT) ke štěpení disulfidových vazeb či činidlo, jako je třeba dodecylsírán sodný (SDS), který slouží k narušení buněčných membrán. Proteiny, proteázy<sup>vi</sup> a nukleázy<sup>vii</sup> deaktivuje teplota nebo chemická změna prostředí. Výsledkem denaturace je rozpad buněk a rozpuštění membrán.

Dalším krokem je oddělení DNA od ostatních komponentů. K tomu může být využito extrakční činidlo (příkladem může být směs chloroformu a isoamylalkoholu). Vzorek obsahující DNA a extrakční činidlo je centrifugován. Po centrifugaci dojde k rozdělení vzorku na horní vodnou fázi obsahující DNA a spodní organickou fázi tvořenou chloroformem. Vodná fáze je odebrána a přefiltrována. Posledním krokem je eluce DNA. Na filtru zachycenou DNA můžeme eluovat pomocí elučního pufru či NFW<sup>viii</sup>. Filtr s DNA je přemístěn do čisté zkumavky a DNA je pomocí zmíněného pufru eluována. Kvalitu takto získané DNA lze ověřit pomocí gelové elektroforézy.<sup>22</sup>

Poslední dva zmíněné kroky izolace DNA mohou proběhnout také pomocí ethanolu, který je použit jako srážecí činidlo. Pomocí centrifugace dojde k rozdělení směsi na peletu obsahující DNA a na supernatant obsahující ostatní komponenty vzorku. Dále je supernatant odsán a zkumavka je zahřívána tak, aby došlo k odpaření zbylé tekutiny. Teplota ale nesmí přesahovat 40 °C, aby nedošlo k poškození DNA. Nakonec je peleta rozpuštěna v pufru či NFW.<sup>23</sup>

## 2.4 Metody používané pro autentizaci máku setého

### 2.4.1 Metoda PCR

Metoda PCR (polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce) byla představena v roce 1983 americkým chemikem Kary Mullisem, který za tento objev získal v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii.<sup>24</sup> Od té doby je metoda PCR široce využívána v mnoha oborech, jako je např. virologie, mykologie, parazitologie, mikrobiologie, zubní lékařství či potravinářství.<sup>25</sup>

Metoda PCR je velmi efektivní. Pomocí této metody můžeme z velmi malého množství vzorku amplifikovat veliké množství námi vybraného úseku DNA. Kary Mullis jednou prohlásil: „*It lets you pick the piece of DNA you're interested in and have as much of it as you want.*”<sup>26</sup> což v překladu znamená: „Můžete si vybrat libovolný úsek DNA a namnožit si ho tolikrát, kolikrát si přejete.“

Další výhodou této metody je její vysoká senzitivita, která je důležitá např. při zjišťování genetických chorob či, v mém případě, k rozpoznání kvalitního českého máku od máku technického. Zároveň je však metoda PCR kvůli své senzitivě náchylná k inhibici, což může mít v některých případech za následek zavádějící výsledky.

K provedení testu PCR je zapotřebí templátová DNA, primery, nukleotidy, DNA polymeráza a pufr. DNA polymeráza je enzym, který spojuje jednotlivé nukleotidy dohromady a tím vytváří náš produkt. Tento enzym je izolován nejčastěji z bakterie *Thermus aquaticus* (pak nese označení Taq polymeráza). Tato bakterie je schopna žít v prostředí

---

<sup>vi</sup> enzymy štěpící proteiny

<sup>vii</sup> enzymy štěpící nukleové kyseliny rozkladem fosfodiesterové vazby

<sup>viii</sup> voda zbavená nukleáz (nuclease free water)

s teplotou až 80 °C. DNA polymeráza je tedy velmi odolná vůči vysokým teplotám. Je schopna odolat i prvnímu kroku metody PCR, kterou je denaturace templátové DNA při teplotě přibližně 95 °C. Využití této polymerázy značně zjednodušilo průběh reakce. Před objevením Taq polymerázy bylo potřeba po každém cyklu polymerázu doplnit.<sup>27</sup>

Nukleotidy (např. deoxyribonukleotid trifosfát - dNTP) obsahují čtyři nukleové báze: adenin (A), thymin (T), cytosin (C) a guanin (G), které jsou obsaženy v DNA. Tyto nukleotidy jsou stavební jednotky, které DNA polymeráza spojuje do výsledného produktu.<sup>28</sup> Další nezbytnou složkou k provedení PCR jsou primery, což jsou krátké oligonukleotidy. Tyto primery se vážou (přisedají) na komplementární úseky templátové DNA a ohraničují z obou stran amplifikovaný úsek. Primery jsou tak počátečním bodem syntézy a pouze v případě, že primery nasednou na templátovou DNA, může začít fungovat polymeráza.<sup>29</sup> Tyto primery se většinou objednávají na zakázku. Na webových stránkách příslušné firmy je možné provést objednávku primeru požadované sekvence, požadovaného množství a čistoty i s případnými modifikacemi oligonukleotidu.<sup>30</sup> Poslední složkou, která je k provedení metody PCR zapotřebí, je pufr. Ten zajišťuje vhodné pH prostředí a iontovou sílu pro reakci.<sup>29</sup>

Všechny zmíněné komponenty jsou smíchány ve zkumavce a jsou dány do přístroje, který umožňuje rychlé střídání teplot a opakování cyklů amplifikace DNA. V každém cyklu se daný úsek DNA namnoží exponenciálně.<sup>31</sup> Cyklus je možný začít tzv. inicializací, kdy dochází k aktivaci polymerázy a odstranění škodných enzymů ve vzorku při teplotě 94–96 °C po dobu přibližně 4–5 minut.<sup>24</sup> Poté se již opakují cykly, které se skládají z následujících 3 částí (Obr. 1):

- Denaturace DNA – separace řetězců (při teplotě přibližně 95 °C)
- Připojení primerů (tzv. annealing; teplota přibližně 55 °C)
- Prodlužování řetězce (tzv. elongace; teplota přibližně 72 °C).<sup>32</sup>

Jelikož se mezi protilehlými bázemi v DNA (guaninem a cytosinem nebo adeninem a thyminem) vytvářejí vodíkové můstky, je třeba tyto můstky rozrušit. V prvním kroku každého cyklu jsou tyto můstky přerušeny pomocí vysoké teploty. Dojde tak k rozdělení dvouřetězcové DNA na dvě jednořetězcové DNA.<sup>33</sup>

V dalším kroku je teplota vzorku snížena přibližně na 55 °C. Přesná teplota je dána teplotou tání používaného primeru. To umožňuje primerům nasednout na specifické místo jednořetězcové templátové DNA. Primery nasednou na opačné strany cílového úseku a vytvářejí řetězec směrem k sobě. Podle směru rozeznáváme forward primer a reverse primer.<sup>31</sup>

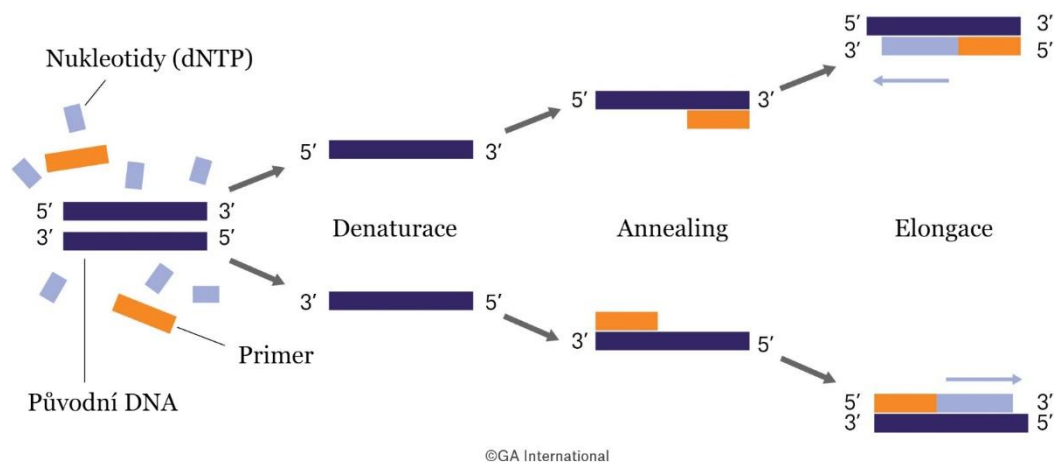
Posledním krokem je elongace, tedy prodlužování řetězce, při které DNA polymeráza vytvoří ve směru 5' → 3' komplementární řetězec k templátové DNA. Doba, po kterou se tento krok provádí, záleží na délce úseku. Kompletní reakci je možno zakončit finální elongací po dobu přibližně 10 minut.<sup>34</sup>

Metod PCR existuje celá řada. Každá z nich je vhodná pro jiný účel. Za zmínku stojí například metoda kvantitativní qPCR, multiplexní PCR, RT-PCR<sup>ix</sup> či RT-qPCR<sup>x</sup>.<sup>35</sup>

---

<sup>ix</sup> real-time polymerázová řetězová reakce

<sup>x</sup> real-time kvantitativní polymerázová řetězová reakce



Obr. 1: Průběh PCR (převzato z lit<sup>36</sup>, upraveno autorkou)

## 2.4.2 Metoda qPCR

Tato metoda je založena na principu klasické PCR. Pomocí metody qPCR (kvantitativní polymerázová řetězová reakce) je ale možné s využitím fluorescenčního značení sbírat data v průběhu reakce a sledovat tak nárůst amplifikovaných fragmentů DNA v reálném čase. V průběhu reakce je měřena fluorescence, která se zvyšuje s množstvím amplifikovaných fragmentů. Zdrojem této fluorescence může být např. fluorescenční barvivo, jako třeba ethidium bromid či SYBR Green I, které je specifické pro dvouvláknovou DNA (dsDNA). Nevýhodou této metody je, že se s její pomocí dá sledovat amplifikace pouze jedné cílové frekvence. Barvivo totiž nasedá na jakýkoliv vzorek s dsDNA bez specifity k sekvenci.<sup>31</sup> Metoda qPCR využívá k zachycení fluorescenčního záření optický systém. Data jsou pak analyzována pomocí počítače se speciálním softwarem.<sup>37</sup>

Další možností je využití např. oligonukleotidových sond specifických pro danou sekvenci. Existuje několik typů sond jako např. sondový systém TaqMan<sup>TM</sup>, který obsahuje dva typy značek: fluorofor (reportér), který nasedá na 5' konec, a tzv. quencher (zhášeč), který nasedá na 3' konec. Tyto sondy využívají aktivity Taq DNA polymerázy. Sonda se váže na sekvenci mezi oběma primery. V tuto chvíli zhášeč potlačuje fluorescence fluoroforu. Taq DNA polymeráza začne syntetizovat nový řetězec DNA a sondu rozštěpí. Jakmile se fluorofor dostane z vlivu zhášeče, fluorescence se projeví.<sup>31</sup>

## 2.4.3 Metoda PCR multiplex

Metoda PCR multiplex umožňuje amplifikaci více než jedné cílové sekvence DNA. Do směsi není přidána pouze jedna sada primerů, ale několik sad, a tím dojde k amplifikaci několika sekvencí. Tímto způsobem se ušetří mnoho času, práce a financí, aniž bychom snížili kvalitu získaných výsledků.<sup>38</sup> PCR multiplex byla již několikrát úspěšně využita v oborech analýzy nukleových kyselin včetně analýzy mutace,<sup>39</sup> polymorfismu,<sup>40</sup> detekci RNA<sup>41</sup> či kvantitativní analýze.<sup>42</sup> Je však náročnější reakci optimalizovat a je nutné ověřit specifitu primerů takovým způsobem, aby k sobě navzájem nebyly komplementární.<sup>43</sup>

## 2.4.4 Sekvenování

Sekvenování DNA je metoda, která slouží ke zjištění pořadí nukleotidů v sekvencích DNA. Tyto sekvence jsou součástí dědičné informace na chromozómech, plazmidech a mitochondriích.<sup>44</sup> Sekvence DNA se využívá např. v archeologii, antropologii, biotechnice,<sup>45</sup> při zjišťování genetických vad nebo k identifikaci živočišných či rostlinných druhů. V tomto případě je nutné najít takovou sekvenci DNA, která je jedinečná a není totožná s žádnou jinou. Odlišnosti sekvencí je možné využít i pro odlišení jednotlivých odrůd. Avšak ani v dnešní době nejsou v databázích nukleových kyselin dostupné sekvence pro odlišení některých rostlinných odrůd, například u máku setého.<sup>44</sup>

Mezi první metody sekvenace DNA, které se stále využívají, patří tzv. Sangerova metoda. Tuto metodu představil Frederick Sanger, který za ni získal v roce 1980 Nobelovu cenu.<sup>46</sup> Metoda funguje na podobném principu jako PCR, kdy se začíná amplifikací (zmnožením) templátové DNA pomocí primerů a DNA polymerázy. Na rozdíl od PCR využívá tato metoda pouze jeden primer a dochází tak k syntéze jen jednoho řetězce v jednom směru. Další odlišností Sangerovy metody v její původní podobě je to, že se provádí ve čtyřech zkumavkách, které obsahují totožné složky reakce (dNTP jako stavební bloky, templát, primer a polymerázu). K těmto složkám se ale ještě přidává tzv. dideoxyribonukleotid (ddATP v první zkumavce, ddTTP ve druhé, ddGTP ve třetí a ddCTP ve čtvrté). Tento nukleotid je specifický tím, že mu chybí na 3' uhlíku –OH skupina, která je nezbytná pro připojení dalšího nukleotidu. Celý řetězec začíná sekvencí primeru a poté dochází k začlenění dideoxyribonukleotidu, který syntézu řetězce zastaví. Kdy se tento nukleotid vmezeří do syntézy a ukončí vznik nového řetězce je tedy věcí náhody. Je ale známo, jakým nukleotidem nový řetězec končí. Pokud je v reakci přítomen např. nukleotid ddATP, tak nový řetězec vždy končí adeninem. Posledním krokem Sangerovy metody je analýza fragmentů pomocí citlivé gelové elektroforézy. Na gel je vedle sebe nanesen obsah zmíněných čtyř zkumavek a po separaci jednotlivých fragmentů je podle jejich délky možné určit pořadí nukleotidů. Pozice fragmentů totiž odpovídá pozici jednotlivých nukleotidů v sekvenovaném vzorku.<sup>47</sup>

Provedení Sangerovy metody se dnes již trochu liší, princip je ale stále stejný; místo čtyř zkumavek se používá pouze jedna, kde je každý dideoxyribonukleotid značený svou specifickou fluorescenční značkou. Fragmenty jsou poté detegovány pomocí kapilární elektroforézy. Fragmenty se na základě rozdílné velikosti v kapiláře rozdělí. Pomocí detektoru, který je schopen zaznamenat barvu „projíždějícího“ fragmentu, jsou pak úseky analyzovány.<sup>48</sup> Výsledkem je chromatogram s píky jednotlivých nukleotidů. Podle pořadí těchto píků pak poznáme sekvenci DNA.<sup>49</sup>

## 2.4.5 Metoda LAMP

Amplifikace nukleových kyselin pomocí metody LAMP (loop-mediated isothermal amplification; izotermická amplifikace zprostředkovaná smyčkou) kombinuje vysokou specifíčnost, jednoduchost a rychlost.<sup>50</sup> Řadí se mezi nově vyvinuté molekulárně-biologické metody pro amplifikaci specifických sekvencí DNA či RNA.<sup>51</sup> V porovnání s PCR má tato

metoda vyšší specifitu a citlivost a její reakce probíhá v izotermických<sup>xi</sup> podmínkách.<sup>52</sup> LAMP využívá DNA polymerázu a sadu čtyř speciálně navržených primerů, které rozpoznávají celkem až šest různých sekvencí cílové DNA. Vnitřní primer obsahující sekvence cílové DNA iniciuje LAMP. Poté dochází k záměně DNA řetězce syntézou nového řetězce, která je aktivována vnějším primerem. Při záměně se uvolňuje jednořetězcová DNA, která slouží jako templát k syntéze další DNA. Tato syntéza je aktivována druhým vnitřním a vnějším primerem, které hybridizují na druhý konec cílové DNA a vytvářejí strukturu DNA ve tvaru smyčky. V následujících cyklech jeden z vnitřních primerů hybridizuje na smyčce produktu a iniciuje dislokaci DNA syntézou nového řetězce. Tato cyklická reakce pokračuje akumulací až  $10^9$  kopií cílové DNA a celý proces trvá méně než hodinu.<sup>53</sup> Produkty jsou poté analyzovány pomocí gelové elektroforézy a pro vizuální detekci se využívají různá barviva jako např. SYBR Green I či hydroxynaftol modrý (HNB).<sup>54</sup>

## 2.4.6 DNA barcoding

DNA barcoding je identifikační systém založený na sekvencích DNA a zastupuje významnou roli v moderní taxonomii<sup>xii</sup>.<sup>55</sup> Tzv. *Barcode* (angl. čárový kód) je úsek DNA, v jehož sekvenci se druhy zkoumané taxonomické jednotky od sebe co nejvíce liší, a jedinci druhu se v něm naopak liší co nejméně.<sup>56</sup> Tento systém se nejvíce využívá k určování živočichů např. v ekologii či evoluční biologii, ale také k určování rostlin a jiných skupin organismů.<sup>57</sup> Barcoding používá standardní krátkou genomovou oblast, která je všeobecně přítomna v cílových řadách a má dostatečnou sekvenční variaci k rozlišení různých druhů organismů.<sup>58</sup> V praxi se DNA sekvence dá získat z krátké genomové oblasti z malého vzorku tkáně. Tato sekvence je poté porovnána v databázi sekvencí známých druhů a shoda sekvencí zajistí rychlou identifikaci neznámého organismu.<sup>59</sup>

---

<sup>xi</sup> probíhající při stále teplotě

<sup>xii</sup> vědní obor, zabývající se rozpoznáváním identity nebo základního charakteru organismu

## 3 PRAKTICKÁ ČÁST

### 3.1 Použité chemikálie

Pro přípravu PCR reakční směsi, elektroforetickou detekci ampliconů<sup>xiii</sup> a dalších roztoků byly použity následující chemikálie:

- **5PRIME, DEU:** 5X TBE pufr, voda zbavená nukleáz (nuclease free water)
- **Bio-Rad Laboratories Inc., USA:** Agaróza pro molekulární biologii
- **East Port Praha:** Primery
- **Elisabeth Pharmacon, spol. s.r.o., CZE:** Midori Green Advance DNA Stain
- **Eppendorf AG, DEU:** 5X TBE pufr
- **Invitrogen, USA:** Platinum<sup>®</sup> Taq DNA polymeráza, reakční pufr pro Platinum<sup>®</sup> Taq DNA polymerázu, chlorid horečnatý
- **Macherey-Nagel, DEU:** NucleoSpin<sup>®</sup> Food Kit
- **New England Biolabs, Inc., USA:** Bst 2.0 DNA polymeráza
- **New England Biolabs, Inc., USA:** Monarch DNA Gel Extraction Kit
- **Penta, CZE:** Chlorid sodný p.a., ethanol (96%), isopropanol p.a., chloroform p.a.
- **Promega Corporation, USA:** Standardy pro elektroforézu: nanášecí roztok na elektroforézu Blue/Orange 6x, směs 2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfátů, Go Taq<sup>®</sup> G2 Flexi DNA polymeráza, reakční pufr pro Go Taq<sup>®</sup> G2 Flexi DNA polymerázu, chlorid hořečnatý, voda zbavená nukleáz
- **Sigma-Aldrich, USA:** cetyltrimethylamonium bromid (CTAB), ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), ribonukleáza A (hovězí pankreas), proteinázy K (*Tritirachium album*), Tris-HCl p.a., SYBR<sup>®</sup> Green I
- **Sigma-Aldrich, USA:** GenElute PCR Clean-Up Kit
- **Solis Biodyne:** 5X HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix
- **Thermo Fisher Scientific:** GeneRuler DNA Ladder Mix, 50 bp DNA Ladder, 100 bp DNA Ladder

### 3.2 Použité roztoky a pufry

- **5X TBE pufr** (45mM Tris-borát, 1mM EDTA, pH = 8,3)  
Pufr 1X TBE byl připraven naředěním 200 ml zásobního roztoku (5X TBE) a 800 ml destilované vody.
- **CTAB extrakční pufr** (20 g·l<sup>-1</sup> CTAB, 1,4M NaCl, 100mM Tris<sup>xiv</sup>, 20mM EDTA; pH upraveno na hodnotu 8,0)  
10 g CTAB, 6,05 g Tris, 40,9 g NaCl, a 3,725 g EDTA bylo rozpuštěné v 250 ml sterilní destilované vody. Celkový objem byl doplněn do 500 ml; pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 8,0. Pufr byl následně sterilován v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 min.

<sup>xiii</sup> část DNA či RNA, která je zdrojem či výsledkem amplifikace

<sup>xiv</sup> tris(hydroxymethyl)aminomethan



- **CTAB precipitační roztok** (5 g·l<sup>-1</sup> CTAB, 40mM NaCl; pH upraveno na hodnotu 8,0)  
V 250 ml sterilní destilované vody bylo rozpuštěno 1,25 g NaCl a 2,5 g CTAB. Celkový objem byl doplněn vodou do 500 ml. A pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 8,0. Roztok byl sterilován v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 min.
- **1,2 M NaCl**  
Navážka 7 g NaCl byla doplněna destilovanou vodou do objemu 100 ml. Roztok byl následně sterilován v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 min.
- **Ethanol – 70% roztok** (v/v)  
Absolutní ethanol o objemu 70 ml byl smíchán s 30 ml sterilní destilované vody.
- **Proteináza K (20 mg·ml<sup>-1</sup>)**  
K 20 mg proteinázy K (EC 3.1.27.5) byl přidán 1 ml NFW<sup>xv</sup>. Dle výrobce byla aktivita proteinázy K min. 8 DMC-U na mg. Roztok byl skladován při teplotách od -18 do -25°C.
- **Ribonukleáza A (10 mg·ml<sup>-1</sup>)**  
K 10 mg ribonukleázy A (EC 3.1.27.5) byl přidán 1 ml NFW. Roztok byl skladován při teplotách od -18 do -25°C.

### 3.3 Přístroje a programové vybavení

Analytické váhy	Denver Instrument, USA
Analytické váhy	Sartorius 2006 MP Sartorius AG, DEU
Autokláv PS20A	Chirana Group a.s., CZE
Box s laminárním prouděním vzduchu	Bioair Instruments, ITA
Box s laminárním prouděním vzduchu	Clean Air, NLD
Centrifuga HERMLE, Z 233 MK-2	Hermle Labortechnik GmbH, DEU
Centrifuga Mikro20	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, DEU
Digitální kamera C-4040ZOOM	Olympus Optical Co., Ltd., DEU
Fotodokumentační systém (Quantum)	Schoeller Instruments, s.r.o, CZE Vilber Lourmat)
Horizontální elektroforéza EO 638	Sigma-Aldrich, Inc., USA
Horizontální elektroforéza MS SafeBlue	Major Science, USA
Horkovzdušný sterilizátor HS 32A	LABO-MS, spol. s.r.o., CZE
Lednice (2–6 °C)	Liebherr Premium, DEU
Mikrocentrifuga Force 13	Denver Instrument, USA
Mikrocentrifuga DUAL – ROTOR	P-LAB a.s., CZE
Mikrocentrifuga MINISPIN (PLUS)	Eppendorf AG, DEU
Mikrovlnná trouba	Concept, CZE
Mikrovlnná trouba	Zanussi, ITA
Mrazicí box (-20 °C)	Liebherr Comfort, DEU
NanoPhotometer	Implen, DEU
pH meter PHM 202	Radiometer Copenhagen, DAN
Pipety	Eppendorf AG, DEU

<sup>xv</sup> nuclease-free water

Program Primer-Blast; Program pro globální zarovnání, BLAST	National Center for Biotechnology Information, USA
Program MAFFT	European Molecular Biology Laboratory – The European Bioinformatics Institute, UK
Termocykler T Gradient	Whatman Biometra, DEU
Termocykler s fluorescenčním detektorem	Applied Biosystems USA
Třecí miska s tloučkem	
Třepací vodní lázeň SW22 Julabo	Schoeller Instrument, s.r.o., CZE
UV transluminátor	Vilber Lourmat, FRA
Vortex MS1 Minishaker IKA, Vortex MS3 Basic	IKA-Works, INS., USA
Výhřevný blok DRI-BLOCK DB 2A	Techne, GBR
Výhřevný blok Mixing Block MB – 102	Schoeller instruments, s. r. o., CZE
Zařízení na přípravu destilované vody	Labor Komplet, CZE
Zařízení na přípravu ledu Ice Flaker	Brema Ice Makers, ITA
Zdroj pro elektroforézu Power PAC 300	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Zdroj pro elektroforézu 250EX	Whatman Biometra, DEU
Zoner Photo Studio 14	ZonerInc., USA

### 3.4 Použité vzorky máku a dalších rostlin

Analýze bylo podrobena celkem 26 vzorků různých odrůd rostlin; z toho 12 vzorků byly odrůdy máku. Vybrané rostliny, zahrnující většinu odrůd máku, byly poskytnuty Výzkumným ústavem rostlinné výroby (VÚRV v. v. i.) a Českou zemědělskou univerzitou. Okrasné máky byly získány od značky FloraSelf a mák modrý byl získán od firmy IBK Trade. Mák M5 a T4 jsou neznámé odrůdy, které byly poskytnuty k výzkumu. Mák M5 má zvýšený obsah morfinu a mák T4 má zvýšený obsah thebainu. Seznam všech odrůd máku je shrnut v Tab. 1 a ostatní rostliny jsou popsány v Tab. 2.

Tab. 1: Přehled použitých vzorků máku.

Číslo vzorku	Název	Původ
1	Vlčí	FloraSelf
2	Mák modrý	IBK Trade
3	M5	VŠCHT Praha
4	T4	VŠCHT Praha
5	Maraton	ČZU, VÚVR v. v. i.
6	Major	ČZU, VÚVR v. v. i.
7	Aplaus	ČZU, VÚVR v. v. i.
8	Opál	ČZU, VÚVR v. v. i.
9	Postomi	ČZU, VÚVR v. v. i.
10	Buddha	ČZU, VÚVR v. v. i.
11	Východní mák	FloraSelf
12	Turecký mák	FloraSelf

Tab. 2: Přehled použitých vzorků rostlin (mimo mák).

Číslo vzorku	Název	Původ
1	Hořčice	VÚRV v. v. i.
2	Hrách	VÚRV v. v. i.
3	Ječmen	VÚRV v. v. i.
4	Kukuřice	VÚRV v. v. i.
5	Pšenice	VÚRV v. v. i.
6	Řepka	VÚRV v. v. i.
7	Slunečnice	VÚRV v. v. i.
8	Sója	VÚRV v. v. i.
9	Čirok	VÚRV v. v. i.
10	Tymián	VÚRV v. v. i.
11	Rozmarýn	VÚRV v. v. i.
12	Oregano	VÚRV v. v. i.
13	Paprika	VÚRV v. v. i.
14	Bazalka	VÚRV v. v. i.

## 3.5 Použité metody a postupy

### 3.5.1 Homogenizace vzorků

Před samotnou izolací rostlinné DNA byla provedena homogenizace vzorků. Části rostlin (semena nebo listy) byly rozdrčeny v třecí misce pomocí tloučku. Před každým drcením byla třecí miska s tloučkem omyta vodou, ethanolem (70%), 1% roztokem Sava a nakonec opět ethanolem. Mikrozkušavky se vzorky byly uschovány v mrazicím boxu ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

### 3.5.2 Izolace DNA kitem NucleoSpin Food kit

Po homogenizaci vzorku byla provedena izolace DNA pomocí NucleoSpin Food kitu dle následujícího postupu:

1. Navážení 200 mg homogenizovaného vzorku do 2ml mikrozkušavky
2. Lýza buněk:
  - a. přidání 550  $\mu\text{l}$  CF pufru předeřátého na  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; promíchání
  - b. přidání 10  $\mu\text{l}$  proteinázy K; promíchání
  - c. inkubace při  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 30 min
  - d. centrifugace (10 min, 10 000 g)
  - e. odebrání supernatantu do nové zkušavky
  - f. přidání C4 pufru a ethanolu v poměru 1:1:1 (od každé kapaliny 300  $\mu\text{l}$ ); promíchání
3. Navázání DNA:
  - a. přemístění 700  $\mu\text{l}$  roztoku z předešlého kroku do zkušavky s filtrem (NucleoSpin Food Column)

- b. centrifugace (1 min, 11 000 g)
  - c. vylití tekutiny, která protekla do spodní části zkumavky; předešlé dva kroky byly zopakovány
4. Vymytí a vysušení filtru:
  - a. první promytí – přidání 400 µl pufru CQW, centrifugace (1 min, 11 000 g), vylití proteklé tekutiny
  - b. druhé promytí – přidání 700 µl C5 pufru, centrifugace (1 min, 11 000 g), vylití proteklé tekutiny
  - c. třetí promytí – přidání 200 µl C5 pufru, centrifugace (1 min, 11 000 g), vylití proteklé tekutiny
5. Eluce DNA:
  - a. vložení vnitřní zkumavky s filtrem do nové mikrozkušavky o objemu 1,5 ml
  - b. přidání 100 µl elučního pufru CE přehřátého na 70 °C
  - c. inkubace po dobu 5 min při pokojové teplotě
  - d. centrifugace (1 min, 11 000 g)

Takto izolovaná DNA byla poté uskladněna při teplotě 4 °C do dalšího zpracování. Dlouhodobé skladování probíhalo při teplotách od -18 do -25 °C.

### 3.5.3 Horizontální agarózová elektroforéza

Kvalita izolované DNA byla ověřena horizontální agarózovou elektroforézou za použití 1% gelu. Po provedení PCR byla kvalita vzorků ověřena pomocí 2% gelu. Gel byl namíchan z příslušného množství agarózy a 1X TBE pufru v závislosti na velikosti vany a potřebné koncentraci gelu. Roztok agarózy a 1X TBE pufru byl zahříván v mikrovlnné troubě, dokud se agaróza zcela nerozpustila. Poté byl roztok zchlazen vodou přibližně na 50 °C a na 100 ml gelu bylo do roztoku napipetováno 5 µl interkalačního činidla Midori green advance DNA stain, které je schopno zviditelnit polohu pásů nukleových kyselin na elektroforeogramu. Tekutý gel byl přemístěn do formy, kde byl ponechán na 20 min ke ztuhnutí.

Takto připravený gel byl převeden do elektroforetické vany. Následně bylo do první jamky napipetováno 5 µl markeru, který sloužil jako standard k určení velikosti jednotlivých fragmentů DNA. Během této práce byly využity dva markery. Více používaný byl 100 bp DNA Ladder, který se využívá na vzorky s větším produktem. Jako druhý marker byl využitý 50 bp DNA Ladder, který je přesnější při určení velikosti produktu. Je vhodný pro menší produkty. Následně bylo smícháno 5 µl vzorku s 3 µl barviva SYBR Green a 5 µl této směsi bylo napipetováno do jamky. Elektroforéza s gelem byla spuštěna na 30–60 min při napětí 90 V a při proudu 300 mA. Po skončení byla provedena fotodokumentace gelu pod UV zářením.

### 3.5.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce byla použita k odlišení různých odrůd máku a druhů rostlin. Použity byly dva teplotní programy (viz Tab. 3 a Tab. 4). Při reakcích bylo vyzkoušeno několik párů primerů. Sekvence všech primerů jsou znázorněny v Tab. 5. Všechny reakční směsi pro PCR jsou popsány v Tab. 6 a Tab. 7. Reakční směs v Tab. 6 byla použita

pro primery F3 a B3, FIP a BIP a pro všechny 4 primery dohromady, kdy bylo množství druhého páru primeru odečteno z množství NFW.

Přidaná DNA byla zředěna na koncentraci 25 ng/μl. V reakcích PCR byla vyzkoušena Bst a GoTaq polymeráza. Pro každou reakci byla provedena také beztemplátová zkouška, při které byla DNA nahrazena NFW. Před samotnou přípravou byly všechny složky směsi řádně homogenizovány a několik sekund centrifugovány.

Tab. 3: Teplotní program pro PCR při využití GoTaq polymerázy.

Teplotní program	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	4 min	1
Denaturace templátu	95	30 s	
Nasednutí primeru	55	30 s	35
Prodlužování primeru pomocí polymerázy	72	2 min	
Závěrečná polymerace	72	5 min	1

Tab. 4: Teplotní program pro PCR při využití Bst polymerázy.

Teplotní program	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	4 min	1
Denaturace templátu	95	30 s	
Nasednutí primeru	58	30 s	30
Prodlužování primeru pomocí polymerázy	72	2 min	
Závěrečná polymerace	72	5 min	1

Tab. 5: Přehled použitých primerů pro PCR a qPCR.

Amplifikovaný úsek	Primer	Sekvence	Velikost produktu [bp]
COR1	F3	TTGTATAAATATCCCCGGAGTA	22
COR1	B3	TCTGATTATGCCCTTATTCAAC	20
COR1	FIP	CAATAGTGGAAGCAATTGTCTCAAC GATATCAACTTAAGACAGTTGTTTC	43
COR1	BIP	ACTTGTATTAAGTTGGATCCGGGAA TACCCATATCTTCTAAAAGTGG	45
RbcL	RbcL F	AGACCTWTTTGAAGAAGGTTTCWGT	285
	RbcL R	GTAATAATCAAGTCCACCRCG	511
ITS2	ITS2 F	GATGCGGAGATTGGCCCCCGTGC	246
	ITS2 R	GTTTCTTTTCCCTCCGCT	250

Tab. 6: Složení reakční směsi s využitím F3, B3 a FIP, BIP primerů a GoTaq polymerázy.

<b>Chemikálie</b>	<b>Objem v reakční směsi na 1 vzorek [μl]</b>	<b>Koncentrace zásobních roztoků</b>	<b>Konečná koncentrace v reakční směsi</b>
NFW	12,86	-	-
Pufr	5,00	5X	1X
MgCl <sub>2</sub>	2,50	25 mM	2,5 mM
dNTP	1,25	10 mM	0,5 mM
F3/FIP	0,63	20 μM	0,504 μM
B3/BIP	0,63	20 μM	0,504 μM
GoTaq polym.	0,13	5 U/μl	0,026 U/μl
DNA	2,00	-	-
<b>Celkem</b>	<b>25</b>		

Tab. 7: Složení reakční směsi s využitím dvou párů primerů (F3, B3 a FIP, BIP) a Bst polymerázy.

<b>Chemikálie</b>	<b>Objem v reakční směsi na 1 vzorek [μl]</b>	<b>Koncentrace zásobních roztoků</b>	<b>Konečná koncentrace v reakční směsi</b>
NFW	9,50	-	-
Pufr Bst	2,50	10X	1X
MgSO <sub>4</sub>	1,50	100 mM	6mM
dNTP	3,50	10 mM	1,4 mM
Primer F3+FIP	0,50 + 2,00	20 μM	0,4 + 1,6 μM
Primer B3+BIP	0,50 + 2,00	20 μM	0,4 + 1,6 μM
Bst polymeráza	1,00	8 000 U/μl	320 U/μl
DNA	2,00	-	
<b>Celkem</b>	<b>25</b>		

### 3.5.5 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)

Během této práce byla také vyzkoušena qPCR na různých odrůdách máku a různých druzích rostlin při teplotním programu uvedeném v Tab. 8 a Tab. 9. Při qPCR byly využity dva páry primerů rbcL a ITS2. Sekvence těchto primerů jsou uvedeny v Tab. 5. Do směsi byla přidána také Platinum polymeráza, nebo HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix a DNA zředěná na koncentraci 25 ng/μl. Složení reakčních směsí je popsáno v Tab. 10 a Tab. 11.

Stejně jako při PCR byla provedena beztemplátová kontrola, při které byla DNA nahrazena NFW. Před samotnou přípravou směsí byly všechny složky směsi řádně homogenizovány a několik sekund centrifugovány.

Tab. 8: Teplotní program pro qPCR s Platinum polymerázou.

<b>Teplotní program</b>	<b>Teplota [°C]</b>	<b>Čas</b>	<b>Počet cyklů</b>
Počáteční denaturace	94	2 min	1
Denaturace templátu	94	30 s	
Nasednutí primeru	60	30 s	35
Prodlužování primeru pomocí polymerázy	72	30 s	
Závěrečná polymerace	72	5 min	1

Tab. 9: Teplotní program pro qPCR při využití HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix.

<b>Teplotní program</b>	<b>Teplota [°C]</b>	<b>Čas</b>	<b>Počet cyklů</b>
Počáteční denaturace	95	12 min	1
Denaturace templátu	95	15 s	
Nasednutí primeru	60	20 s	40
Prodlužování primeru pomocí polymerázy	72	30 s	
Závěrečná polymerace	60	1 min	1

Tab. 10: Složení reakční směsi pro qPCR s využitím rbcL primerů a Platinum polymerázy.

<b>Chemikálie</b>	<b>Objem v reakční směsi na 1 vzorek [μl]</b>	<b>Koncentrace zásobních roztoků</b>	<b>Konečná koncentrace v reakční směsi</b>
NFW	16,625	-	-
Pufr	2,50	10X	1X
MgCl <sub>2</sub>	1,25	50 mM	2,5 mM
dNTP	1,25	10 mM	0,5 mM
Primer rbcL forward	0,625	10 μM	0,25 μM
Primer rbcL reverse	0,625	10 μM	0,25 μM
Platinum Polymerase	0,125	5 U/μl	0,25 U/μl
DNA	2,00	-	-
<b>Celkem</b>	<b>25</b>		

Tab. 11: Složení reakční směsi pro qPCR s využitím HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermixu.

Chemikálie	Objem v reakční směsi na 1 vzorek [ $\mu$ l]	Koncentrace zásobních roztoků	Konečná koncentrace v reakční směsi
NFW	11,40	-	-
HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix	4,00	5X	1X
Primer ITS2/rbcL forward	0,30	10 $\mu$ M	150 nM
Primer ITS2/rbcL reverse	0,30	10 $\mu$ M	150 nM
DNA	4,00	-	-
Celkem	20		

### 3.5.6 DNA barcoding

Pomocí metody PCR byl namnožen vybraný úsek DNA několika odrůd máku a několika druhů rostlin. Úspěšnost amplifikace DNA byla po PCR ověřována pomocí gelové elektroforézy. Směsi s kvalitními výsledky byly přečištěny pomocí ethanolu či přečišťovacího kitu Monarch DNA Gel Extraction Kit a GenElute PCR Clean-Up Kit.

Přečišťování ethanolem bylo provedeno následujícím způsobem: Vyříznutý produkt z gelu byl po dobu 15 min zahříván na teplotu 50 °C. Poté bylo do každé zkumavky s produktem přidáno 400  $\mu$ l ethanolu. Zkumavky byly vloženy do mrazáku a po 15 min při teplotě -20 °C se DNA ze směsi vysrážela. Vzorky byly 60 s centrifugovány. Vzniklá peleta obsahovala DNA. Zbytek tekutiny byla odsána pipetou a poté byla zkumavka s otevřeným víkem zahřívána na teplotu 40 °C tak, aby se vypařila všechna zbylá tekutina. Nakonec bylo do zkumavek přidáno 50–100  $\mu$ l NFW. Vzniklý roztok DNA byl umístěn do lednice.

Přečišťování kity proběhlo dle pokynů výrobce. Kvalita přečištěné DNA byla ověřena na spektrofotometru, který se používá zejména pro odhad koncentrace vzorků DNA a zjištění jejich čistoty. Kvalita vzorku se zjišťuje pomocí poměru absorbancí  $A_{260}/A_{280}$  a  $A_{260}/A_{230}$ . Podle poměru  $A_{260}/A_{280}$  (poměr absorbance při 260 a 280 nm) posuzujeme čistotu vzorku. Tento poměr by se měl pohybovat okolo hodnoty 1,8. Hodnoty pod 1,75 značí znečištění proteiny (popř. fenolem) a hodnoty nad 2,0 poukazují na vysoké množství RNA.<sup>60</sup> Poměr  $A_{260}/A_{230}$  je sekundární kontrolou pro čistotu nukleových kyselin. Její hodnoty by se měly pohybovat mezi 2–2,2. Pokud jsou hodnoty nižší, poukazuje to na znečištění inhibitory, které pohlcují světlo při 230 nm.<sup>61</sup> Vzorky vhodné kvality a kvantity DNA byly poslány na sekvenaci. Před posláním vzorků k sekvenaci DNA bylo do dvou zkumavek vždy přidáno určité množství použitého primeru tak, aby každá zkumavka obsahovala 25 pmol primeru. Do jedné zkumavky byl přidán forward primer a do druhé reverse primer. Poté bylo do zkumavek přidáno určité množství DNA dle její koncentrace tak, aby koncentrace DNA ve vzorku odpovídala hodnotě 100 ng. Nakonec byl objem každé zkumavky doplněn NFW tak, aby celkový roztok měl objem 10  $\mu$ l. Tato směs byla poslána k sekvenaci do firmy SEQme.



### 3.5.7 LAMP

Analýza máku pomocí metody LAMP byla vyzkoušena na odrůdě Opál a mák modrý (IBK Trade). Při reakci byla využita Bst polymeráza a DNA byla zředěna na koncentraci 25 ng/μl. Reakční směs (Tab. 12) byla 5 minut před přidáním polymerázy zahřáta na teplotu 95 °C a celá reakce probíhala při teplotě 63 °C. Při analýze máku metodou LAMP byly provedeny dvě beztemplátové kontroly. Při jedné kontrole byla místo DNA máku přidána NFW. Při druhé kontrole byla vodou (NFW) nahrazena DNA máku i polymeráza. Použité primery jsou zobrazeny v Tab. 13.

Tab. 12: Reakční směs pro LAMP.

Chemikálie	Objem v reakční směsi na 1 vzorek [μl]	Koncentrace zásobních roztoků	Konečná koncentrace v reakční směsi
NFW	8,00	-	-
Pufr Bst	2,50	10X	1X
MgSO <sub>4</sub>	1,50	100 mM	6 mM
dNTP	3,50	10 mM	1,4 mM
HNB	1,50	2 mM	0,12 mM
Primer FIP	2,00	20 μM	1,6 μM
Primer BIP	2,00	20 μM	1,6 μM
Primer F3	0,50	20 μM	0,4 μM
Primer B3	0,50	20 μM	0,4 μM
Bst polymeráza	1,00	8 000 U/μl	320 U/μl
DNA	2,00	-	-
Celkem	25		

Tab. 13: Použité primery pro LAMP.

Specifikace	Primer	Sekvence primeru
Mák	F3	TTGTATAAATATCCCCGGAGTA
	B3	TCTGATTATGCCCTTATTCAAC
	FIP	CAATAGTGGAAGCAATTGTCTCAACGATATCAACTTAAGA CAGTTGTTTC
	BIP	ACTTGTATTAAGTTGGATCCGGGAATACCCATATCTTCTA AAAGTGG

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Tato práce je zaměřena na autentizaci máku setého pomocí analýzy DNA. Základem těchto analýz je tak izolace kvalitní rostlinné DNA. Prvním krokem k nalezení správné metody pro autentizaci máku je schopnost odlišit mák od jiných druhů rostlin a poté odlišit druhy a/nebo odrůdy máku mezi sebou.

### 4.1 Izolace DNA

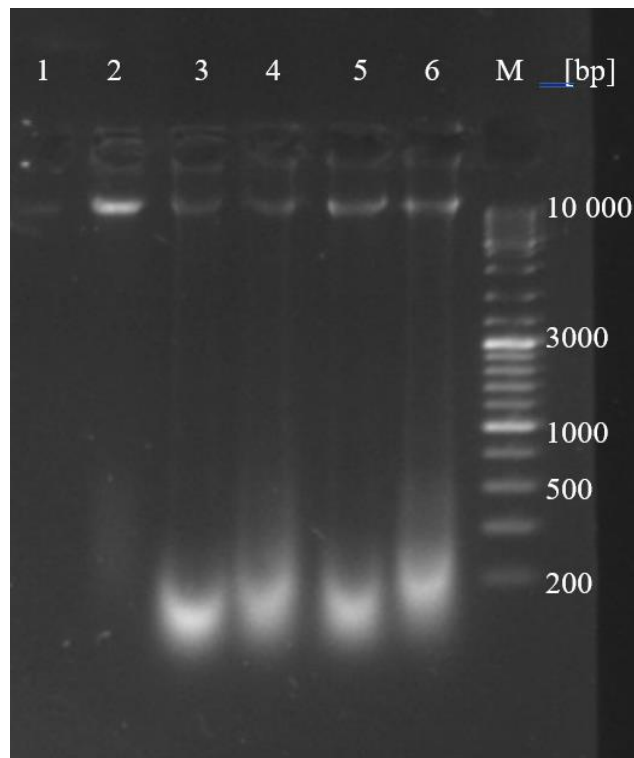
Vzorky máku byly podrobeny izolaci pomocí izolačního kitu NucleoSpin Food (Macherey-Nagel, Německo). Izolace byla provedena podle postupu od výrobce. DNA ostatních druhů rostlin byla poskytnuta pracovníky ze Zkušební laboratoře ÚBM FPBT na VŠCHT Praha. Následným krokem bylo spektrofotometrické ověření kvality a kvantity DNA, kdy byla naměřena koncentrace vzorků a poměry absorbancí  $A_{260}/A_{280}$  a  $A_{260}/A_{230}$ . Výsledky měření zobrazuje Tab. 14. Rozmezí poměru absorbancí  $A_{260}/A_{280}$  pro čistou DNA byla stanovena na hodnoty 1,75–2. Tuto podmínku splnilo 20 % vzorků; 30 % vzorků bylo znečištěno proteiny či fenolem. Zbývajících 50 % vzorků bylo znečištěno RNA. Znečištění RNA by bylo možné snížit pomocí přídavku enzymu RNasa, který není součástí izolačního kitu. Výrobce pouze doporučuje jeho přidání u vzorků bohatých na RNA, a to přímo do lyzačního pufru. RNasu není vhodné přidávat do vzorku po izolaci; došlo by totiž k rozštěpení RNA na nukleotidy, které by ve vzorku zůstaly a mohly by ovlivnit spektrofotometrii. Přidání RNasy by také navýšilo cenu za reakci. Z těchto důvodů tedy RNasa použita nebyla.

Pro další ověření kvality získané DNA byla použita horizontální gelová elektroforéza v 1% gelu. Nukleové kyseliny byly na gelu zviditelněny pod UV světlem a vyfoceny. Vyfocený elektroforeogram je vyobrazen na Obr. 2. Izolace proběhla úspěšně. Vidíme, že vznikly specifické produkty DNA. Je také viditelné, že kromě východního máku, který i u spektrofotometrie prokázal dobré výsledky, jsou vzorky znečištěné RNA. Beztemplátová kontrola nebyla ničím kontaminována.

Všechny vzorky izolované komerčním kitem NucleoSpin Food kit byly sice dostatečně kvalitní pro použití k další analýze, ale objevovalo se v nich časté znečištění RNA, které by podle popisu tohoto kitu nemělo nastat. Výhodou tohoto kitu je jeho časová nenáročnost (pro jeden vzorek cca 65 min). Nevýhodou je jeho vysoká cena, která se pohybuje kolem 100 Kč za reakci (cena za izolační soupravu a ethanol).

Tab. 14: Výsledky spektrofotometrie vzorků máku izolované kitem NucleoSpin Food kit.

Název	Koncentrace [ng/μl]	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>
Aplaus	139	2,206	1,986
Buddha	325	1,000	-
Major	39,5	2,324	1,681
Maraton	468	1,628	2,463
M5	610	1,810	2,824
Postomi	146	2,172	2,405
T4	65	1,461	-
Turecký mák	61	2,440	1,070
Vlčí mák	34	2,194	2,000
Východní mák	45,5	1,857	1,369



Obr. 2: Elektroforeogram znázorňující velikost fragmentů DNA po izolaci NucleoSpin Food kitem. Dráhy: 1 – NT; 2 – východní mák; 3 – turecký mák; 4 – vlčí mák; 5 – Aplaus; 6 – Maraton; M – marker 100 bp.

## 4.2 Polymerázová řetězová reakce

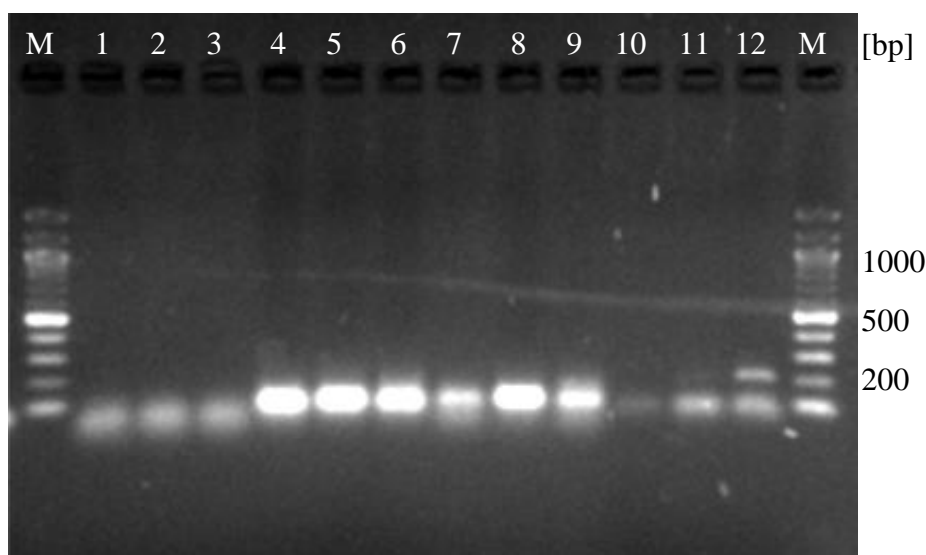
Při autentizaci máku setého byla využita metoda PCR i qPCR. Testovány byly čtyři různé polymerázy a čtyři různé páry primerů, které jsou spolu s teplotními programy a reakčními směsmi popsány v kapitole 3.5.4 a 3.5.5. Po každé proběhlé PCR byla ověřena úspěšnost amplifikace DNA pomocí horizontální agarózové elektroforézy ve 2% gelu, ve kterém byly poté zviditelněny fragmenty DNA pomocí UV záření.

## 4.2.1 PCR s F3, B3, FIP a BIP primery

Při analýze PCR byly nejdříve vyzkoušeny dva páry primerů F3, B3, FIP a BIP, které jsou navrženy pro LAMP. Tyto primery byly zprvu testovány na LAMP, u kterého nebyly výsledky dle očekávání, tudíž tyto primery byly také vyzkoušeny na PCR pro porovnání. Tyto primery byly testovány spolu s Bst 2.0 DNA Polymerase, která je také optimalizována pro LAMP, a s GoTaq® Flexi DNA Polymerase. Tyto primery a polymerázy byly otestovány minimálně třikrát.

Vzorky s Bst polymerázou nevytvořily při PCR žádné produkty. Na elektroforeogramu (Obr. 3) vidíme pouze nespecifické produkty, které jsou menší než 100 bp; očekávaný produkt u primerů F3 a B3 by se měl pohybovat kolem 200 bp. Stejný problém nastal i u LAMPu, jehož výsledky jsou popsány v kapitole 4.3. Je možné, že polymeráza nebyla dostatečně aktivována teplotou. Také musíme brát v potaz, že Bst polymeráza je optimalizovaná pro LAMP, kde se teplotní cyklus od PCR liší.

Naopak vzorky s GoTaq polymerázou vytvořily produkt kolem 200 bp při použití všech 4 primerů (Obr. 3). U Opálu je produkt dobře znatelný; u modrého máku (IBK Trade) vidíme pouze velmi slabý produkt. Při využití pouze primerů F3 a B3 vznikaly silné nespecifické produkty. Mohlo dojít ke vzniku tzv. dimerů primeru, a tím k inhibici reakce. Dimery vznikají tehdy, jestliže je pár primerů mezi sebou komplementární. V případě použití primerů FIP a BIP vznikly (stejně jako u F3 a B3) také pouze nespecifické produkty. Nejsilnější nespecifický produkt vznikl u máku modrého (IBK Trade). Polymeráza GoTaq se jeví jako vhodná polymeráza. Při použití Bst polymerázy k amplifikaci nedošlo, a proto s ní nebylo dále u PCR reakcí pracováno. U testovaných primerů vznikaly často nespecifické produkty a dimery. Bylo by vhodné vyzkoušet ještě jiné reakční podmínky, případně jiné páry primerů.



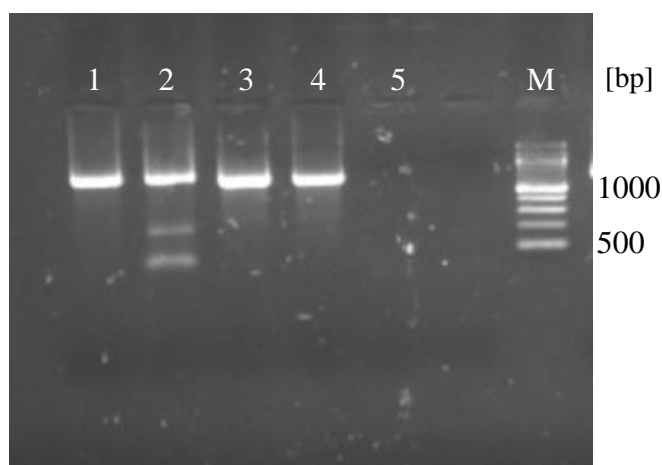
Obr. 3: Elektroforeogram znázorňující velikost fragmentů DNA po PCR s primery F3, B3, FIP a BIP při použití Bst polymerázy a GoTaq polymerázy. Vlevo (dráha 1–3) byla využita reakční směs z Tab. 7 s Bst polymerázou, vpravo (dráha 4–12) byla využita reakční směs z Tab. 6 s GoTaq polymerázou. Dráhy: M – marker 100 bp; 1,4,7,10 – NT; 2,5,8,11 – mák modrý (IBK Trade); 3,6,9,12 – Opál; 1–3 – F3, B3, FIP, BIP; 4–6 – F3, B3; 7–9 – FIP, BIP; 10–12 – F3, B3, FIP, BIP.

## 4.2.2 qPCR s rbcL a ITS2 primery

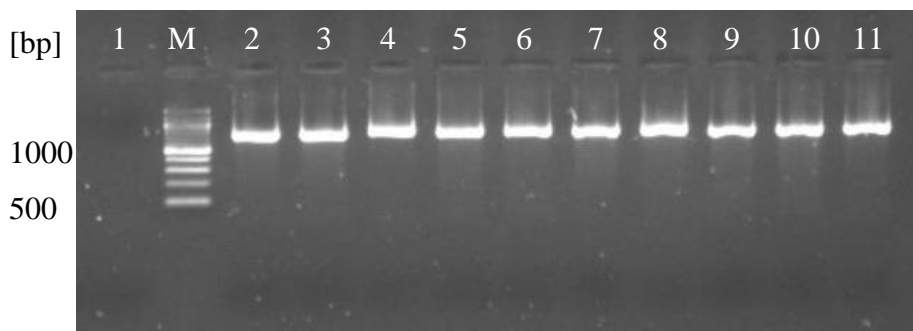
Po reakcích PCR s F3, B3, FIP a BIP primery byl vyzkoušen pár primerů rbcL, který je navržen pro odlišení máku od jiných rostlin, a pár primerů ITS2, který je navržen i pro odlišení odrůd máku mezi sebou. Využita byla Platinum™ Taq DNA Polymerase a HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix. Tyto primery a polymerázy byly testovány pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR). Produkty PCR byly ověřeny také horizontální agarózovou elektroforézou.

Na Obr. 4 je zobrazen elektroforeogram z reakce s rbcL primery. Reakční směs je popsána v Tab. 11. Na elektroforeogramu jsou vidět jasné specifické produkty a čistá beztemplátová kontrola. U máku T4 vidíme také dva nespecifické produkty, které mohly vzniknout nasedáním primerů i na jiných úsecích DNA, což poukazuje na odlišnost od ostatních odrůd máku. Specifické produkty byly u všech čtyř testovaných rostlin vyříznuty z gelu, a následně přečištěny. Po ověření koncentrace přečištěné DNA byla poslána na sekvenaci hořčice a máky major a maraton. Výsledky, popis přečištění a sekvenace jsou popsány v kapitole 4.4.

Na Obr. 5 je zobrazen elektroforeogram z reakce s ITS2 primery. Reakční směs je popsána v Tab. 11. Na elektroforeogramu jsou viditelné pouze jasné specifické produkty s čistou beztemplátovou kontrolou.



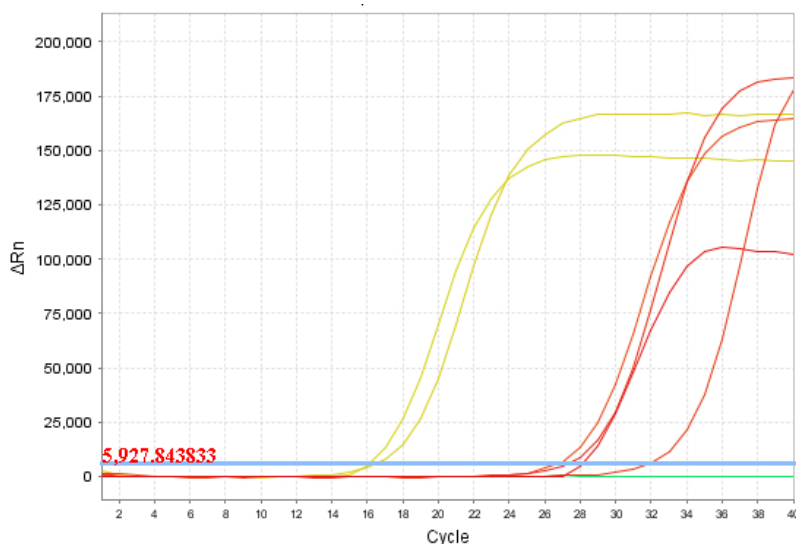
Obr. 4: Elektroforeogram znázorňující velikost fragmentů DNA po PCR s primery rbcL při použití HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix. Dráhy: M – marker 100 bp; 1 – hořčice; 2 – T4; 3 – major; 4 – maraton; 5 – NT.



Obr. 5: Elektroforeogram znázorňující velikost fragmentů DNA po qPCR s primery ITS2 při použití HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix. Dráhy: 1 – NT; M – marker 100 bp; 2 – hořčice; 3 – hrách; 4 – ječmen; 5 – kukuřice; 6 – pšenice; 7 – řepka; 8 – slunečnice; 9 – sója; 10 – čirok.

Na Obr. 6 je zobrazen graf tzv. amplifikačních křivek<sup>xvi</sup> PCR s primery *rbcL*, který porovnává naměřené křivky různých odrůd máku a 4 druhů olejnin. Křivky se liší hodnotou prahového detekčního cyklu ( $C_t^{xvii}$ ). Jedná se o nejnižší amplifikační cyklus, ve kterém hodnota fluorescence měřeného vzorku vzroste nad hodnotu fluorescence pozadí. Z Obr. 6 je patrné, že se hodnoty  $C_t$  u máků a olejnin liší přibližně o deset cyklů. Jelikož bylo do reakce přidáváno stejné množství DNA, lze usuzovat, že mají primery vyšší specifitu pro DNA máku. U bezteplátové kontroly k amplifikaci nedošlo.

Na Obr. 7 a Obr. 8 jsou zobrazeny křivky tání DNA různých odrůd máku. Křivky tání u DNA odrůd máku setého mají stejný tvar a vrchol křivky nastává při přibližně stejné teplotě (přibližně 88 °C). Tvar a umístění vrcholu křivky tání u DNA olejnin se liší jak od máku, tak také mezi sebou. Dle těchto zjištění je tedy qPCR s využitím primerů *rbcL* a ITS2 metoda, která by byla schopná odlišit mák od jiných druhů rostlin, ale pro odlišení odrůd máku mezi sebou je spolehlivější DNA barcoding, kterému je věnovaná kapitola 4.4.

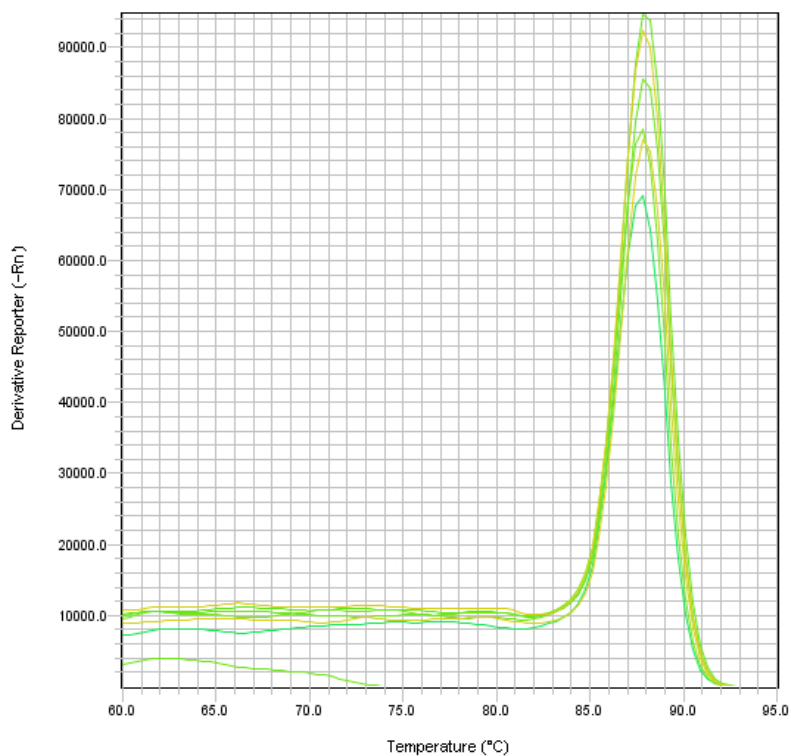


Obr. 6: Amplifikační křivka<sup>xviii</sup> z qPCR s *rbcL* primery. Žluté křivky – odrůdy máku (Aplaus, Opál), červené křivky – olejnin (řepka, kukuřice, sója, hořčice), zelená křivka – NT.

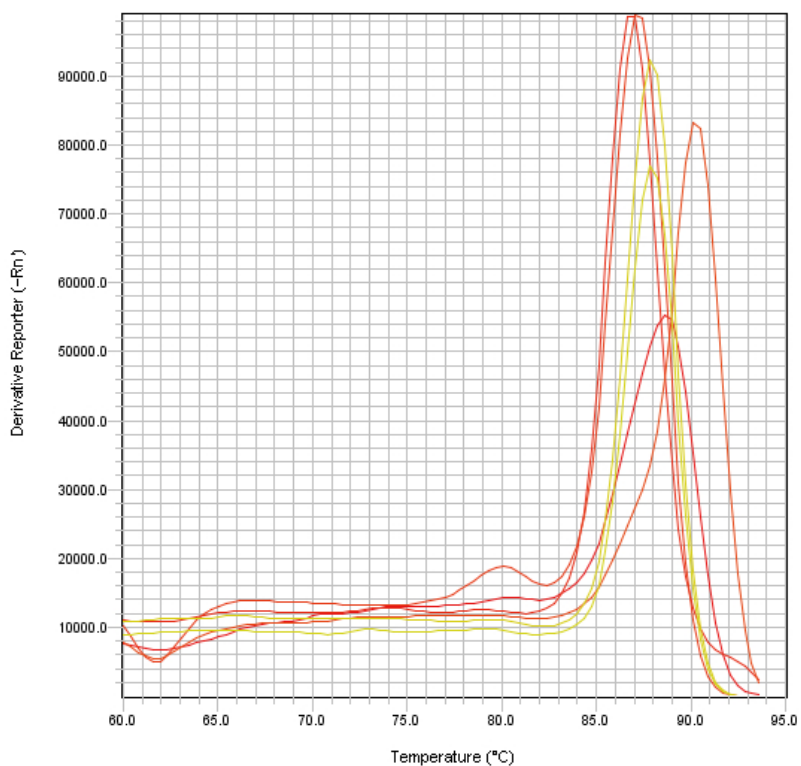
<sup>xvi</sup> závislost naměřené fluorescence na počtu proběhlých cyklů

<sup>xvii</sup> threshold cycle

<sup>xviii</sup>  $\Delta R_n$  – velikost signálu vytvořeného za daných podmínek PCR reakce ( $\Delta R_n = R_n - \text{pozadí}$ )



Obr. 7: Křivka tání DNA odrůd máků (Aplaus, Opál, Maraton, Buddha, Postomi, Major).



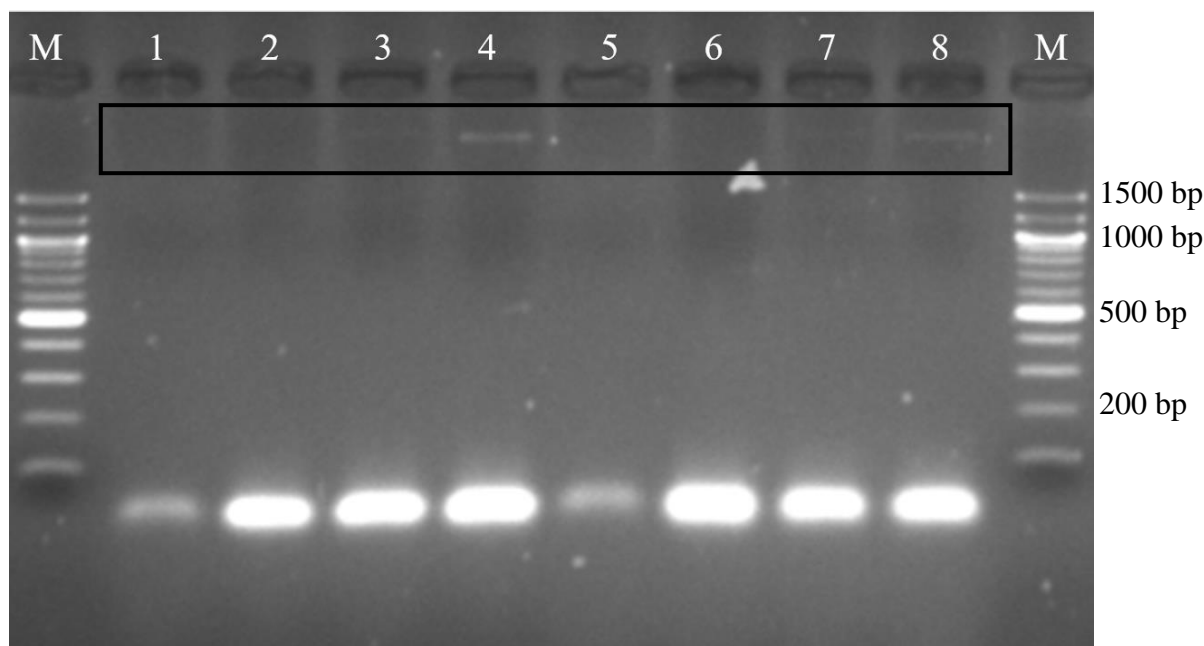
Obr. 8: Křivka tání DNA. Žluté křivky – odrůdy máků (Aplaus, Opál), červené křivky – olejniný (řepka, kukuřice, sója, hořčice).

### 4.3 LAMP

Složení reakční směsi pro metodu LAMP je uvedena v Tab. 12. Využity byly primery F3, B3, FIP a BIP, které jsou navrženy přímo pro LAMP, stejně tak jako použitá polymeráza Bst 2.0 DNA Polymerase. Metoda LAMP neposkytla produkty podle očekávání. Vznikaly pouze slabé produkty delší než 1500 bp, což je viditelné např. na elektroforeogramu na Obr. 9, kde byl získán pouze jeden produkt a k tomu silné nespecifické produkty (menší než 100 bp). U metody LAMP byl očekáván vznik několika produktů, což můžeme vidět na Obr. 10, kde je znázorněn příklad očekávaného gelu při použití této metody.

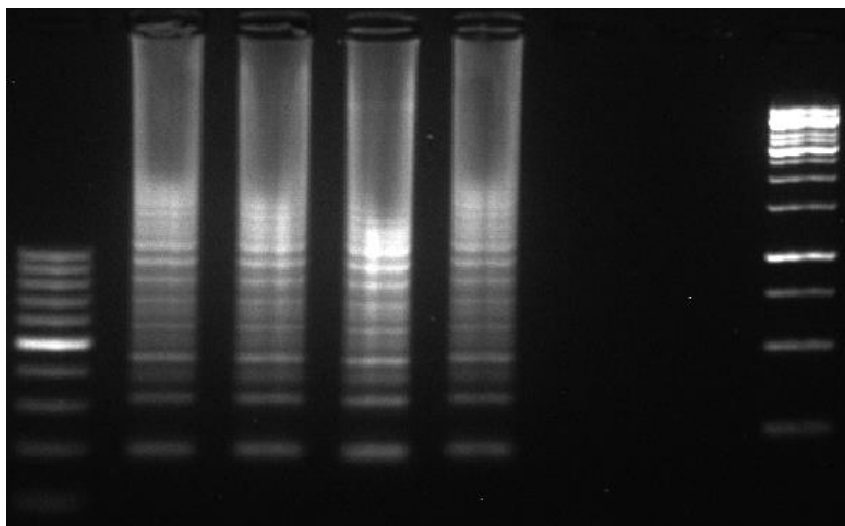
V reakci byl využit indikátor hydroxynaftol modrý (HNB) pro kolorimetrické stanovení úspěšnosti reakce, u kterého se předpokládá, že by neměl narušit reakci. HNB funguje v závislosti na koncentraci iontů  $Mg^{2+}$ . Ve směsi reagují hořčnaté ionty s uvolňovaným pyrofosfátem a vzniká difosforečnan dihořčnatý ( $Mg_2P_2O_7$ ), který za přítomnosti HNB, mění barvu z fialové na světle modrou, což značí úspěšnou reakci. Byly vytvořeny 3 mastermixy s odlišným množstvím HNB (plné množství, poloviční množství a bez HNB), ale ani v jednom případě k žádné barevné změně nedošlo.

Důvod neúspěchu reakce by mohly být nevyhovující primery, které se ukázaly být neúspěšné i u PCR. V budoucnu by bylo vhodné navrhnout nové primery pro LAMP a v dalším postupu vyzkoušet jinou polymerázu. Také by bylo vhodné upravit teplotu a délku cyklu v závislosti na vybrané polymeráze, popř. se soustředit i na koncentraci  $Mg^{2+}$ .



Obr. 9: Elektroforeogram znázorňující velikost fragmentů DNA po LAMPu s primery F3, B3, FIP a BIP při použití Bst polymerázy (specifické produkty jsou označeny v rámečku). Vlevo (dráha 1–4) byl využit mastermix s plným množstvím HNB, vpravo (dráha 5–8) byl využit mastermix bez HNB. Dráhy: M – Marker 100 bp; 1,5 – NT bez polymerázy; 2,6 – NT; 3,7 – mák modrý (IBK Trade); 4,8 – Opál.





Obr. 10: Očekávaný elektroforeogram LAMPu (převzato z lit<sup>62</sup>).

## 4.4 DNA barcoding

Kvalita všech vzorků z PCR byla ověřena horizontální agarózovou elektroforézou. Ukázka výsledků gelu je zobrazena na Obr. 4 a Obr. 5. Vzorky, u kterých vznikl specifický produkt a u kterých byla beztemplátová kontrola čistá, byly přečištěny pomocí ethanolu, přečišťovacího kitu Monarch DNA Gel Extraction Kit či GenElute PCR Clean-Up Kit. Úspěšnost přečištění byla poté ověřena na spektrofotometru podle koncentrace a poměru absorbancí  $A_{260}/A_{280}$  a  $A_{260}/A_{230}$ . Vzorky s dostatečnou koncentrací a čistotou pro sekvenování (podle návodu od firmy SEQme) byly připraveny pro sekvenaci. Výsledky vybraných vzorků ze spektrofotometru jsou zobrazeny v Tab. 14 a Tab. 15.

Ke každému vzorku byly získány dvě sekvence; jedna sekvence byla ze vzorku s forward primerem a druhá byla ze vzorku s reverse primerem. Bylo i několik výjimek u vzorků, u kterých nebyly jednoznačné výsledky ze spektrofotometrie (př. nízká koncentrace). U těchto vzorků byl poslán na sekvenaci pouze vzorek s forward či reverse primerem na zkoušku. Bioinformatická analýza, následně popsána, byla provedena Ing. Eliškou Čermákovou. Sekvence vzorku s reverse primerem byla obrácena a pomocí softwaru MEGA X či BioEdit byla každá báze vyměněna za bázi komplementární. Tím se zjednodušilo porovnávání sekvencí. V tomto formátu by měly být obě sekvence stejné. Poté byly všechny získané sekvence pomocí softwaru Mega X a/nebo BioEdit seřazeny pod sebou. Sekvence různých odrůd máku a druhů rostlin byly porovnány se sekvencí odrůdy máku Aplaus.

Báze se nejvíce lišily na začátku a na konci sekvence. To je způsobeno tím, že nějaký čas trvá, než polymeráza začne správně fungovat. Na konci sekvence dochází také k častějším chybám při čtení.

Primer *rbcl* dokázal pomocí sekvenace úspěšně odlišit odrůdy máku od druhů jiných rostlin, ale rozdíl mezi odrůdami máku již nebyl tak jednoznačný. Sekvence různých druhů rostlin se lišily od odrůdy Aplaus mnohem více než jiné odrůdy máku (Tab. 15). Obr. 11 znázorňuje ukázkou „zarovnaných“ sekvencí. Každá báze má svou vlastní barvu. Báze, které jsou bílé, nebyly během sekvenace přečteny. Do budoucna budou sekvenace zopakovány k získání kompletní sekvence.

Pomocí primeru ITS2 bylo možné rozlišit odrůdy máku od jiných druhů rostlin přesněji než pomocí primeru rbcL. Z Tab. 16 je patrné, že hořčice se od odrůdy máku Aplaus liší o celých 126 bází, což je dvojnásobný rozdíl oproti sekvenované hořčici s rbcL primery. Z výsledků je patrné, že se odrůda máku Aplaus liší o 18 bází od odrůdy Maraton. V případě odrůd Postomi a Buddha je rozdíl v bázích malý. Ukázka výsledků z programu Mega X je zobrazena na Obr. 12.

Z výsledků je patrné, že se sekvenace ukázala jako vhodný způsob pro autentizaci máku setého. Je ale potřeba se této metodě věnovat dále. Z důvodu nedostatku času nebylo možné zopakovat u některých odrůd sekvenování, které by sekvenci potvrdilo, popř. doplnilo nepřechtené báze. Podle výsledků vidíme, že primer ITS2 dokázal nalézt více odlišných bází než primer rbcL, což bylo předpokládáno. Rozdíl v bázích mezi jednotlivými odrůdami máku ale stále nebyl dostačující. Do budoucna by bylo užitečné vyzkoušet také primery na jiné geny, které by lépe odlišily odrůdy máku setého mezi sebou, anebo, v kombinaci s primery ITS2, poskytly dostatečné množství bodových polymorfismů<sup>xix</sup> pro jejich odlišení.

Tab. 15: Vybrané vzorky pro sekvenaci s rbcL primery.

Název	Koncentrace [ng/μl]	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>	Počet bází, které se liší od sekvence máku Aplaus
Aplaus	29	3,222	0,360	0
Opál	24,5	3,062	0,032	10
Postomi	14	1,750	0,141	3
Major	26	1,529	0,275	3
Maraton	7,5	1,875	0,179	2
Hořčice	12,5	0,694	0,044	60
Slunečnice	13	1,174	0,108	41
Hrách	19	1,900	-	64

Tab. 16: Vybrané vzorky pro sekvenaci s ITS2 primery.

Název	Koncentrace [ng/μl]	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>	Počet bází, které se liší od sekvence máku Aplaus
Aplaus	57,5	1,673	0,146	0
Maraton	28	1,588	0,050	18
Buddha	617	1,791	2,050	2
Postomi	12	1,846	0,247	6
Hrách	12,5	1,786	-	91
Hořčice	15	1,875	0,417	126

<sup>xix</sup> odlišnost jednoho nukleotidu v sekvenci DNA, která se vyskytuje v určité pozici genomu jednoho druhu



## 5 ZÁVĚR

Cílem mé práce bylo navrhnout a ověřit metodiku analýzy DNA k autentizaci máku setého. V posledních letech dochází kvůli nepoctivým obchodníkům, kteří nahrazují modrý mák falzifikáty, k ohrožení dobrého jména českého modrého máku. Je tedy velmi důležité najít metodu, která by byla schopná rychle a efektivně falzifikáty odhalit.

V rámci této práce byla provedena izolace DNA různých odrůd máku a různých druhů rostlin a byly vyzkoušeny celkem čtyři metody analýzy DNA. Analyzovány byly nejen vzorky máku, ale také vzorky odlišných rostlin. Bylo zjištěno, že pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR) je možné odlišit odrůdy máku od jiných druhů rostlin, ale není možné již odlišit odrůdy máku mezi sebou. Jako úspěšnější metoda se ukázal být DNA barcoding. Pomocí sekvenování je možné odlišit druhy rostlin podle rozdílných bází, což dává možnost k přesnému určení falzifikátu. S využitím primerů ITS2 i rbcL je možné odlišit odrůdy máku od jiných druhů rostlin velmi jednoznačně. Mezi jednotlivými odrůdami máku ale rozdíly tak jednoznačné nejsou. Primer ITS2 se sice ukázal být přesnější než primer rbcL, ale k vylepšení metody autentizace máku setého by bylo vhodné vyzkoušet ještě další páry primerů.

Z důvodu obsáhlosti této práce nebylo možné se více DNA barcodingu věnovat. Podle výsledků má ale tato metoda velký potenciál falzifikáty snadno odhalit a bude tedy předmětem dalšího studia.

## 6 SEZNAM ZKRATEK

A – absorbance

A – adenin

B3 – přední primer vnitřní

BIP – přední primer vnější

bp – pár bází

C – cytosin

C<sub>t</sub> – cyklus prahu

CTAB – cetrimoniumbromid

DMC-U – množství enzymatické aktivity, které katalyzuje štěpení 1 µl ekvivalentní peptidové vazby z dimethyl kaseinu za minutu při 25 °C a pH 7,5

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dNTP – deoxyribonukleotid trifosfát

dsDNA – dvouvláknová DNA

DTT – dithiotreitol

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

F3 – přední primer vnější

FIP – přední primer vnitřní

FPBT – Fakulta potravinářské a biochemické technologie

G – guanin

HNB – hydroxynaftol modrý

ITS2 – internal transcribed spacer

LAMP – izotermická amplifikace zprostředkovaná smyčkou

NFW – voda zbavená nukleáz

OSN – Organizace spojených národů

PCR – polymerázová řetězová reakce

qPCR – kvantitativní PCR

rbcL – gen ribulóza-bisfosfát karboxylázy

RNA – ribonukleonová kyselina

RNasa – enzym ribonukleáza

RT-PCR – real time PCR

RT-qPCR – real time kvantitativní PCR

SDS – dodecylsírán sodný

T – thymin

Taq polymeráza – polymeráza izolována z bakterie *Thermus aquaticus*

TBE – Tris-borát-EDTA

U – mezinárodní jednotka enzymové aktivity

ÚBM – Ústav biochemie a mikrobiologie

UV – ultrafialové záření

VŠCHT – Vysoká škola chemicko-technologická

## 7 BIBLIOGRAFIE

<sup>1</sup> KUČTOVÁ, P., M. HÁJKOVÁ, J. HAVEL, J. KAZDA, E. PLACHKÁ a P. DVOŘÁK. Pěstitelská technologie máku pro ekologické zemědělství. Praha: ČZU, 2013, 2. ISBN 978-80-213-2429-9.

<sup>2</sup> Obecné informace o máku. *Ceskyomodrymak.cz* [online]. Český modrý mák [cit. 2018-12-02]. Dostupné z: <http://ceskyomodrymak.cz/mak/obecne-informace/>

<sup>3</sup> PRAJAPATI S., S. BAJPAI, D. SINGH, R. LUTHRA, M. M. GUPTA a S. KUMAR. Alkaloid profiles of the Indian land races of the opium poppy *Papaver somniferum*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2000, **49**, 183–188.

<sup>4</sup> The Opium Alkaloids. *Unodc.org* [online]. United Nations Office on Drugs and Crime, 1953 [cit. 2019-03-03]. Dostupné z: [https://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/bulletin/bulletin\\_1953-01-01\\_3\\_page005.html](https://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/bulletin/bulletin_1953-01-01_3_page005.html)

<sup>5</sup> BARANYK, P. a kol. Olejniny. *Profi Press*. Praha, 2010. ISBN: 978-80-86726-38-0.

<sup>6</sup> MEOS, A., L. SAKS a A. RAAL. Content of alkaloids in ornamental *Papaver somniferum* L. cultivars growing in Estonia. Institute of Pharmacy, University of Tartu, Nooruse 1, 50411 Tartu, Estonia: Estonian Academy of Sciences, 2017, **66**(1), 34–39.

<sup>7</sup> Zákon č. 167/1998 Sb., o návykových látkách a změně některých dalších zákonů.

<sup>8</sup> AMAYA, N. The World's Leading Poppy Seed Producing Countries. *Wordatlas.com* [online]. worldatlas, 2018 [cit. 2018-12-02]. Dostupné z: <https://www.worldatlas.com/articles/the-world-s-leading-poppy-seed-producing-countries.html>

<sup>9</sup> BEČKA, D., L. BEČKOVÁ, I. CAPOUCHOVÁ, P. DVOŘÁK, J. HABERLE, K. HAMOUZ, M. HÁJKOVÁ, H. HONSOVÁ, M. HÝBL, D. JANOVSÁ, M. KÁŠ, P. KONVALINA, P. KUČTOVÁ, J. MOUDRÝ, Z. ŠTĚRBA, J. TOMÁŠEK, J. URBAN. Pěstování vybraných plodin v ekologickém zemědělství. Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích, 2014, 229–266. ISBN 978-80-87510-32-2.

<sup>10</sup> Vyhláška č. 399/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro škrob a výrobky ze škrobu, luštěniny a olejnatá semena, ve znění vyhlášky č. 418/2000 Sb.

<sup>11</sup> Cecharovní norma ochrání mák vypěstovaný v ČR. *Agrární komora České republiky, Ministerstvo zemědělství*. Dostupné z: <https://www.czu.cz/dl/77490?lang=cs>

<sup>12</sup> Doporučení Komise ze dne 10. září 2014, o správné praxi pro předcházení a snižování výskytu opiových alkaloidů v máku a makových produktech (2014/662/EU).

- 
- <sup>13</sup> KUBÍK, M., P. CUHRA. Mák a opiáty – zkušenosti SZPI s kontrolou máku. *Výživa a Potraviny*. 2015, 78–79.
- <sup>14</sup> ELKINS, Kelly M. Forensic DNA Biology: A Laboratory Manual. *Elsevier*. 2012. ISBN 978-0-12-394585-3.
- <sup>15</sup> LAIRD, P. W., A. ZIJDEVELD, K. LINDERS, M. A. RUDNICKI, R. JAENISH a A. BERNIS. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Research*. UK: Oxford University Press, 1991, **19**(15), 4293.
- <sup>16</sup> ERLICH, H. A. PCR Technology. *Palgrave Macmillan*. Londýn: 1989. ISBN 978-0-333-48948-2.
- <sup>17</sup> LERNER, K. L. a B.W. LERNER. World of forensic science. *Detroit: Thomson/Gale*. 2006. ISBN 1414402961.
- <sup>18</sup> MOYO, M., S. O. AMOO, M. W. BAIRU, J. F. FINNIE, J. VAN STADEN. Optimising DNA isolation for medicinal plants. *South African Journal of Botany*. 2008, **74**, 771–775.
- <sup>19</sup> EISENSTEIN, B. I. The Polymerase Chain Reaction — A New Method of Using Molecular Genetics for Medical Diagnosis. *Medical Intelligence*. The New England Journal of Medicine, 1990, 178–183. DOI: 10.1056/NEJM199001183220307.
- <sup>20</sup> KASAI, K., Y. NAKAMURA a R. WHITE. Amplification of a Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) Locus (pMCT118) by the Polymerase Chain Reaction (PCR) and Its Application to Forensic Science. *Journal of Forensic Science*. 1990, **35**(5), 1196–2000. ISSN 0022-1198.
- <sup>21</sup> LOCKLEY, A. K. a R. G. BARDSLEY. DNA-based methods for food authentication. *Science Direct*. 2000, **11**(2), 67–77. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)00049-2](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)00049-2).
- <sup>22</sup> OVESNÁ, J., J. HODEK. Metody extrakce DNA z čerstvého plodu papáji a z kandované Papáji. *Výzkumný ústav rostlinné výroby*. Praha 6: 2010. ISBN 978-80-7427-063-5.
- <sup>23</sup> SEDLÁČEK, Z. *Izolace DNA a identifikaci nepatogenních druhů klostridií izolovaných ze sýrů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, 2012. Diplomová práce. Vedoucí práce Doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.
- <sup>24</sup> The Nobel Prize in Chemistry 1993. *Nobelprize.org* [online]. The Royal Swedish Academy of Science [cit. 2019-09-08]. Dostupné z: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1993/summary/>
- <sup>25</sup> VALONES, M. A. A., R. L. GUIMARÃES, L. A. CAVALCANTI BRANDÃO, P. R. ELEUTÉRIO DE SOUZA, S. C. S. CROVELA. Principles and Application of Polymerase Chain Reaction in medical diagnostic fields: A review. *Brazilian Journal of Microbiology*.

---

Brasil: Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2009, **40**(1), 1–11. ISSN 1517-8382.

<sup>26</sup> MULLIS, K. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*. 1990, **262**(4), 56–61, 64–5.

<sup>27</sup> ECKERT, K. A. a T. A. KUNKEL. High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 1990, **18**(13), 3739–44.

<sup>28</sup> GARIBYAN, L. a N. AVASHIA. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Invest Dermatol.* National Institutes of health. 2013, **133**(3), 4. DOI: 10.1038/jid.2013.1.

<sup>29</sup> NAJAFOV, A., G. HOXHAIJ. PCR GURU: An ultimate benchtop reference for molecular biologists. *Elsevier*. 2017. ISBN 978-0-12-804231-1.

<sup>30</sup> *Primer Explorer: LAMP primer designing software* [online]. [cit. 2019-09-08]. Dostupné z: <https://primerexplorer.jp/e/>

<sup>31</sup> PRIMROSE, S. B. a R. M. TWYMAN. Principles of gene manipulation and genomics. *Blackwell Publishing*. Malden, MA: 2006, **7**. ISBN 14051354419781405135443.

<sup>32</sup> WHITE, B. A. PCR Protocols: Current methods and applications. *Methods in Molecular Biology*. Human Press Inc. Farmington, CT: University of Connecticut Health Center, 1993, **15**. ISBN 0-89603-244-2.

<sup>33</sup> What is PCR (polymerase chain reaction)?. *Yourgenome.org* [online]. yourgenome, 2016 [cit. 2018-12-03]. Dostupné z: <https://www.yourgenome.org/facts/what-is-pcr-polymerase-chain-reaction>

<sup>34</sup> HOLLAND P. M., R. D. ABRAMSON, R. WATSON, D. H. GELFAND. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'–3'exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*: 1991, **88**, 7276–80.

<sup>35</sup> ŠMARDA, J. D., R. PANTŮČEK, V. RŮŽIČKOVÁ, J. KOPTÍKOVÁ. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005.

<sup>36</sup> GOLDBERG, A. A. A Brief History of PCR and Its Derivatives. *International Labtag* [online]. 2019 [cit. 2020-01-18]. Dostupné z: <http://blog.labtag.com/a-brief-history-of-pcr-and-its-derivatives>

<sup>37</sup> POLLET, J., K. P. F. JANSSEN, K. KNEZ a J. LAMMERTYN. Real-Time Monitoring of Solid-Phase PCR Using Fiber-Optic SPR. *Small*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2011, **7**(8), 1003–1006.



- 
- <sup>38</sup> LIPOV, J., Z. KNEJZLÍK a E. JABLONSKÁ. *Laboratoř analýzy biologických materiálů*. Praha: VŠCHT, 2017. ISBN 978-80-7080-992-1.
- <sup>39</sup> SHUBER, A. P., J. SKOLETSKY, R. STERN, B. L. HANDELIN. Efficient 12-mutation testing in the CFTR gene: a general model for complex mutation analysis. *Human Molecular Genetics*. 1993, **2**, 153–158.
- <sup>40</sup> RITHIDECH, K. N., J. J. DUNN, C. R. GORDON. Combining multiplex and touchdown PCR to screen murine microsatellite polymorphisms. *BioTechniques*. 1997, **23**, 36–45.
- <sup>41</sup> ZIMMERMANN, K., D. SCHOGL, B. PLAIMAUER, J. W. MANNHALTER. Quantitative multiple competitive PCR of HIV-1 DNA in a single reaction tube. *BioTechniques*. 1996, **21**(3), 480–484.
- <sup>42</sup> SHERLOCK, J., V. CIRIGLIANO, M. PETROU, B. TUTSCHEK, M. ADINOLFI. Assessment of diagnostic quantitative fluorescent multiplex polymerase chain reaction assays performed on single cells. *Annals of Human Genetics*. 1998, **62**(1), 9–23.
- <sup>43</sup> ELNIFRO, E., A. ASHSHI, R. COOPER a P. KLAPPER. Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. *Clinical Microbiology reviews*. American Society for Microbiology, 2000, **13**(4), 559–570.
- <sup>44</sup> DNA Sequencing. *Genome.gov* [online]. National Human Genome Research Institute, 2015 [cit. 2018-12-03]. Dostupné z: <https://www.genome.gov/10001177/dna-sequencing-fact-sheet/>
- <sup>45</sup> FRANCA, L. T. C., E. CARRILHO a T. B. L. KIST. A review of DNA sequencing techniques. *Quarterly Reviews of Biophysics*. Cambridge University Press, 2002, **35**(2), 169–200. DOI: 10.1017/S0033583502003797.
- <sup>46</sup> The Nobel Prize in Chemistry 1980. *Nobelprize.org* [online]. The Royal Swedish Academy of Science [cit. 2019-09-08]. Dostupné z: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1980/summary/>
- <sup>47</sup> SANGER, F., S. NICKLEN, A. R. COULSON. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, 1977, **74**(12), 5463–5467.
- <sup>48</sup> BROWN, S. M., ed. *Next-generation DNA sequencing informatics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2013. ISBN 978-1-936113-87-3.
- <sup>49</sup> THANAWIROON, C., K. G. RICE, T. TOIDA a R. J. LINHARDT. Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Sequencing Approach for Highly Sulfated Heparin-derived Oligosaccharides. *Journal of Biological Chemistry*. 2003, **279**(4), 2608–2615. DOI: 10.1074/jbc.m304772200.

- 
- <sup>50</sup> NOTOMI, T., Y. MORI, N. TOMITA a H. KANDA. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology*. The Microbiological Society of Korea. 2015, **53**(1), 1–5. DOI: 10.1007/s12275-015-4656-9.
- <sup>51</sup> ŠVIRÁKOVÁ, E., J. KYZNAR a K. LOUPANCOVÁ. Využití metody LAMP pro rychlou detekci patogenních mikroorganismů v potravinářské a klinické praxi. *Mlékařské listy*. 2017, **28**(5), 31–38.
- <sup>52</sup> HARA-KUDO, Y., M. YOSHINO, T. KOJIMA, M. IKEDO. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of Salmonella. *FEMS Microbiological Letters*, 2005, **253**(1), 155–161.
- <sup>53</sup> NOTOMI, T., H. OKAYAMA, H. MASUBUCHI, T. YONEKAWA, K. WATANABE, N. AMINO a T. HASE. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Resolution*. 2000, **28**(12), 63.
- <sup>54</sup> GOTO, M., E. HONDA, A. OGURA, A. NOMOTO a K. HANAOKI. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques*. Future Science, 2018, **46**(3), 167–172.
- <sup>55</sup> MEHRDAD, H., G. SINGER, P. HERBERT, D. HICKEY. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics*. 2007, **23**(4), 167–172.
- <sup>56</sup> ČEPIČKA, I. Spasí taxonomii využití „čárového kódu“ DNA?. *Vesmír* [online]. 2008, **87**(294), 294–295 [cit. 2019-09-19]. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2008/cislo-5/spasi-taxonomii-vyuziti-bdquocaroveho-koduldquo-dna.html>
- <sup>57</sup> KRESS W., K. WURDACK, E. ZIMMER, L. WEIGT, D. JANZEN. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2005, **102**(23), 8369–8374.
- <sup>58</sup> HERBERT, P., N. CYWINSKA, S. BALL, J. DEWARD. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B – Biological Science*. 2003, **270**(1512), 313–321.
- <sup>59</sup> ERICKSON, D. L. a W. J. KRESS. A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding rbcL Gene Complements the Non-Coding trnH-psbA Spacer Region. *PLoS ONE*. 2007, **2**(6), 508.
- <sup>60</sup> BARBAS, C., D. BURTON, J. SCOTT a G. SILVERMAN. Quantitation of DNA and RNA. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2007. DOI: 10.1101/pdb.ip47.
- <sup>61</sup> MATLOCK, B. Assessment of Nucleic Acid Purity. *Assets.thermofisher.com* [online]. Thermo Fisher Scientific, 2015 [cit. 2020-02-13]. Dostupné z:

---

<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>

<sup>62</sup> FAGGION, S. A., A. R. SALVADOR, K. L. JACOBINO, L. F. B. BORTOLOTTI, M. B. LOPES, M. SILVA, E. V. SANTOS, A. L. FACHIN, S. C. FRANCA, M. MARINS. Loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Ehrlichia canis* DNA in blood samples from dogs. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 2013, **45**(2), 200.