

# **METODIKA PRO DIAGNOSTIKU PŘÍTOMNOSTI BRUSINKY A KLIKVY VE ZPRACOVANÝCH PRODUKTECH POMOCÍ MOLEKULÁRNÍCH SSR MARKERŮ**

Ladislav Kučera, Jaroslava Ovesná



**METODIKA PRO PRAXI**



© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, 2017

Metodika byla vypracována pracovníky týmu Molekulární genetiky VÚRV, v.v.i.  
Vznikla za finanční podpory MZe ČR a je výstupem řešení projektu: NAZV QJ 1530272  
a výzkumného záměru MZE RO0417

Autoři: Ing. Ladislav Kučera, CSc. (50%)

Doc. RNDr. Jaroslava Ovesná, CSc. (50%)

Kontakt na autory: ovesna@vurv.cz

kuceral@vurv.cz

Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně

Náklad: 20 ks

Vyšlo v roce: 2017

Vydáno bez jazykové úpravy

Autor fotografií: Ing. Ladislav Kučera, CSc.

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, 2017

ISBN 978-80-7427-245-5

## **Metodika pro diagnostiku přítomnosti brusinky a klikvy ve zpracovaných produktech pomocí molekulárních SSR markerů**

Předmětem metodiky je postup pro diagnostiku přítomnosti brusinky (*Vaccinium vitis-ideae* L.) a klikvy (*Vaccinum macrocarpon* L.) ve zpracovaných produktech, například v čajích, nebo v ovocných složkách řady dalších potravinářských výrobků (džemy, rosoly, protlaky). Metodika vychází z faktu, že primární struktura DNA je typická pro každý rostlinný druh. Byly proto využity molekulární DNA markery, které charakterizují daný rostlinný druh délkovou variabilitou mikrosatelitů (SSR- Single Sequence Repeats). Metodika popisuje extrakci DNA z předpokládané matrice, dále sekvence a použití vybraných SSR markerů a postup vyhodnocení analytických dat. Metodu lze použít v běžně vybavené molekulárně-genetické laboratoři. Metoda je použitelná pro charakterizaci DNA izolované z jakékoliv části rostliny, plodů a z nich odvozených potravin či potravních doplňků. Popisuje postup a potřebné vybavení pro provedení analýzy. Doporučuje způsob hodnocení výsledků.

### **Method for differentiating cranberries and cranberries in processed products**

The subject of the methodology is a procedure for diagnosing the presence of lingonberries (*Vaccinium vitis-ideae* L.) and cranberries (*Vaccinum macrocarpon* L.) in processed products such as tea or fruit ingredients of many food products (jams, jelly, purree, tea). The methodology exploits DNA sequences that are typical for each plant species. Thus, molecular DNA markers that characterize the plant species by SSRs (single sequence repeats) are used. The methodology describes the extraction of DNA from the assumed matrix, the use of selected SSR markers and the analytical data evaluation procedure. The method can be used in any solid equipped molecular-genetic laboratory. The method is applicable for the characterization of DNA isolated from any part of the plant, fruit, and derived food or food supplements. Method describes the procedure and necessary equipment to perform the analysis. Protocol recommends how to evaluate the results.

Oponenti: prof. Ing. Karterína Demnerová, CSc., VŠCHT Praha

Mgr. Lenka Bartošová, PhD., SZPI Brno

Státní zemědělská a potravinářská inspekce Brno vydala 7.12.2017 Osvědčení č.4/2017 a metodika byla schválena odborem vědy, výzkumu a vzdělávání MZe dne 27.12.2017. Ministerstvo zemědělství doporučuje tuto metodiku pro využití v praxi.

# Obsah

|              |                                                                            |    |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>I.</b>    | <b>Cíl metodiky</b>                                                        | 4  |
| <b>II.</b>   | <b>Vlastní popis metodiky</b>                                              | 4  |
| 1.           | Úvod                                                                       | 4  |
| 2.           | Délkový polymorfismus mikrosatelitů                                        | 5  |
| 3.           | Základní schéma analýzy                                                    | 6  |
| 5.           | Příprava analytického vzorku                                               | 7  |
| 6.           | Izolace DNA                                                                | 7  |
|              | A) IZOLACE DNA Z CELÝCH A ROZDRČENÝCH SUŠENÝCH PLODŮ                       | 8  |
|              | B) IZOLACE DNA Z MATRIC OBSAHUJÍCÍ CUKRY (např. džemy, džusy)              | 9  |
| 7.           | Kontrola kvality DNA                                                       | 9  |
| 8.           | Amplifikace cílových sekvencí – mikrosatelitů                              | 11 |
| 9.           | Separace fragmentů                                                         | 12 |
| 10.          | Vyhodnocení analýzy                                                        | 13 |
| 11.          | Potřebné technické vybavení a činidla                                      | 14 |
| <b>III.</b>  | <b>Zhodnocení finanční, časové a kapacitní náročnosti</b>                  | 16 |
| <b>IV.</b>   | <b>Přednosti metody a možnosti rutinního využití</b>                       | 17 |
| <b>V.</b>    | <b>Popis uplatnění metodiky</b>                                            | 17 |
| <b>VI.</b>   | <b>Ekonomické přínosy</b>                                                  | 17 |
| <b>VII.</b>  | <b>Použitá a další doporučená literatura</b>                               | 18 |
| <b>VIII.</b> | <b>Seznam publikací, které předcházely metodice, nebo jsou publikovány</b> | 20 |

## I. Cíl metodiky

Cílem předložené metodiky je představit pro uživatele postup, kterým lze diagnostikovat přítomnost brusnice brusinky (*Vaccinium vitis-ideae* L.) a klikvy velkoplodé (*Vaccinium macrocarpon* L.) ve zpracovaných produktech a to s využitím znalostí o polymorfismu DNA. Postup lze použít pro kontrolu vstupních surovin v potravinářských výrobních provozech nebo pro kontrolu pravosti výrobků na trhu (druhovéděklarace) dozorovými orgány státní správy. Uživatel je seznámen s principy metody, laboratorním postupem i hodnocením výsledků.

## II. Vlastní popis metodiky

### 1. Úvod

Potraviny se falšují odedávna a falšování potravin souvisí s jejich prodejem (Čížková et al. 2010). Obvykle se zaměňují dražší složky za levnější. Jedním z příkladů je záměna brusnice brusinky (*Vaccinium vitis-ideae* L.) za klikvu velkoplodou (*Vaccinium macrocarpon* L.). Klikva velkoplodá se obvykle pěstuje průmyslově a vyrábí se z ní řada potravních doplňků, džemy, rosoly, džusy. V ČR jsou často nesprávně označovány jako brusinky. Směsi obou druhů byly nalezeny v džemech označované jako brusinkové. Navíc složení plodů obou druhů je odlišné a byly zjištěny odlišné účinky na zdraví člověka vzhledem k odlišnému obsahu zdraví prospěšných látek (Li et al., 2004, Rimando et al. 2006). Proto je nezbytné zavést metodu kontroly pro odlišení obou druhů.

Pro jednoznačnou identifikaci obou druhů jsme vyvinuli postup založený na analýze DNA s využitím délkového polymorfismu krátkých opakujících se sekvencí (SSR- Single Sequence Repeats), které jsou součástí každého genomu. Délková variabilita SSR odráží i genetické rozdíly mezi druhy.

Analýza genetické diverzity rostlin obecně vyžaduje metody, které jsou spolehlivé a reprodukovatelné. Tyto vlastnosti splňují DNA markéry. Existuje několik typů DNA markérů většinou založených na amplifikaci vybraných úseků DNA (RAPD, SSR, AFLP, EST\_SSR), hybridizaci DNA sekvencí (Southernova hybridizace), sekvenování (podle Sangera, NGS). (Lo et al. 2018.). Markerovací systémy se odlišují v obsahu a množství informací, počtu výsledných polymorfismů, stupni automatizace, pracnosti, opakovatelnosti a výši finančních nákladů (Čurná a Žaludová 2007). Jednotlivé aspekty byly zváženy a po jejich vyhodnocení byla

zvolena, s přihlédnutím k vlastním experimentálním výsledkům, metoda využívající délkového polymorfismu krátkých opakujících se sekvencí tzv. mikrosatelitů (SSR z angl.. single sequence repeats).

Metodika je výsledkem výzkumu, nově umožňuje odlišit oba druhy v rámci rodu *Vaccinium* L. a to z čerstvých, sušených i ze zpracovaných plodů. Nově byl sestaven soubor SSR primerů, který umožňuje rozlišení obou druhů ve směsích. V návaznosti na verifikovaný postup izolace DNA z matric zpracovaných produktů (Sovová et al., *submitted*) byl validován protokol pro jejich využití (Mitrová et al. 2017, *in press*).

## 2. Délkový polymorfismus mikrosatelitů

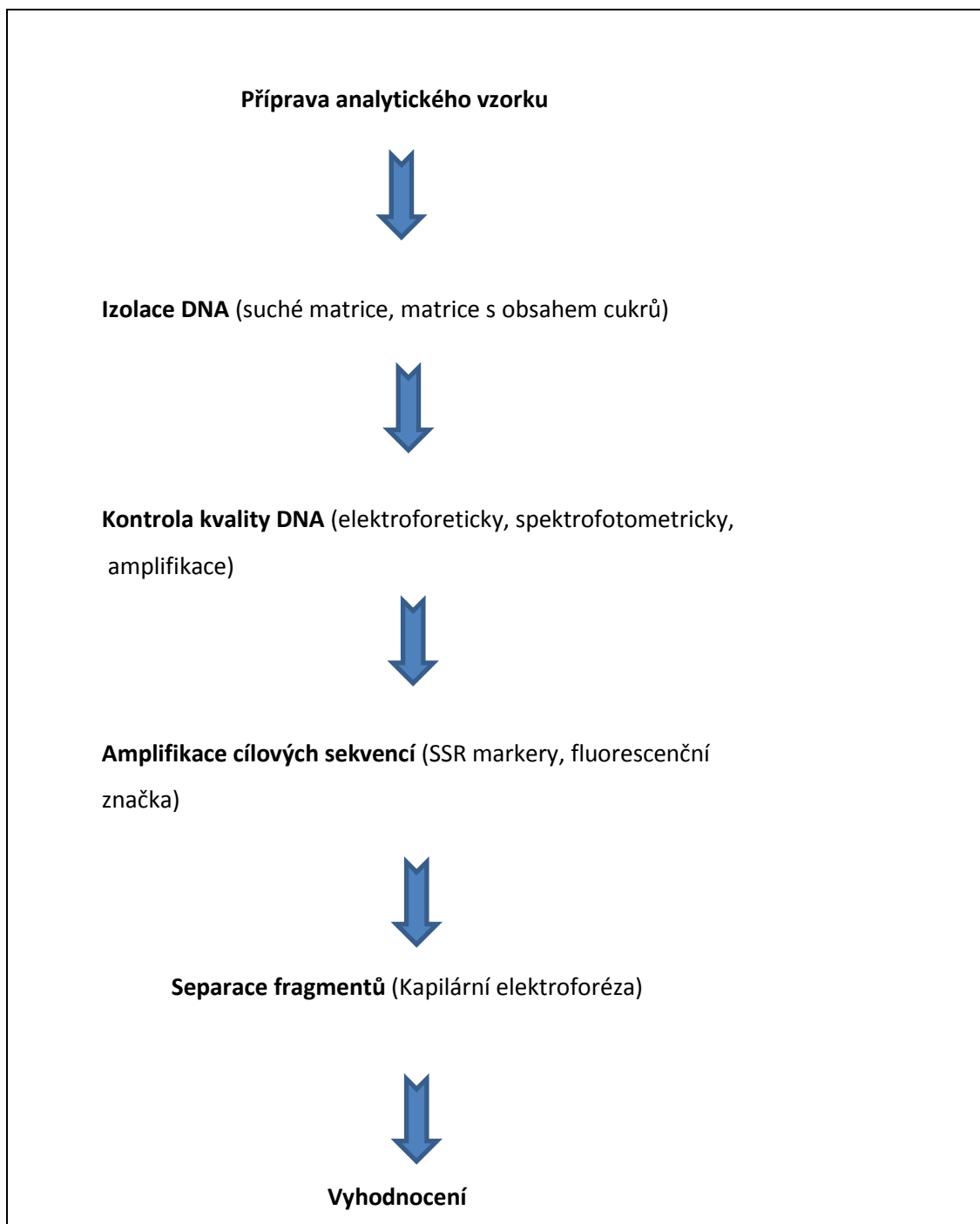
Mikrosatelity jsou oblasti opakujících se sekvencí DNA, ve kterých se určité motivy (v délce od 2 do 13 párů bází) opakují, typicky 5-50 krát. Genomy eukaryontů, zejména rostlin, obsahují velké množství takových repetitivních DNA sekvencí (Morgante, 1993; Kejnovsky 2009; Li, 2006). Mikrosatelity se vyskytují v genomu na tisících místech a dobře odrážejí genetickou odlišnost (Brinkmann et al. 1998). Tyto sekvence mají nejvýznamnější dopad na velikost genomu (Cermak, 2008). Jejich délkový polymorfismus lze využít pro analýzu genetické diverzity a jednoznačné určení druhové příslušnosti.

Pro charakterizaci délkového polymorfismu mikrosatelitů DNA v genomu příslušného druhu (SSR lokus) se obvykle využívá amplifikace (namnožení úseků DNA) příslušné sekvence během polymerázové řetězové reakce (PCR) s využitím unikátních oligonukleotidů (primerů). Sekvence primerů odpovídá sekvencím DNA, které ohraničují mikrosatelitní oblast. Dostatečně purifikovaná DNA z analyzovaného organismu, nebo potravinářské matrice, je opakovaně denaturována, aby došlo k separaci obou řetězců DNA. Reakční směs se v rámci teplotních cyklů vždy po denaturaci ochladí, přičemž dojde k připojení primerů a s využitím *Taq* polymerázy se cílový úsek sekvence DNA kopíruje ve fázi označované jako prodloužení řetězce. Takto je možné získat dostatečné množství amplikonů (kopií sekvence nukleotidů) pro jednotlivé SSR lokusy, které jsou následně separovány podle své délky a vizualizovány. Vizualizace se provádí více způsoby, v současné době je nejvýznamnější a nejrozšířenější vizualizace po separaci fragmentů opatřených fluorescenční značkou v kapilární elektroforéze.

Využití základního principu metody – amplifikace mikrosatelitních oblastí bylo potvrzeno u více rostlinných druhů (Rajeev et al. 2005). U každého druhu je třeba nalézt vhodné mikrosatelitní oblasti a ověřit jejich druhovou specifitu. Validace pak spočívá

v opakovaných analýzách identických materiálů k ověření robustnosti a opakovatelnosti metody.

### 3. Základní schéma analýzy



## 5. Příprava analytického vzorku

Laboratorní vzorek potravin, nebo produktů či surovin, je vzorek určený k laboratorním zkouškám, určený k zaslání do smluvní laboratoře. Není předmětem této metodiky uvádět způsob vzorkování a přípravy laboratorního vzorku. Laboratorní vzorek, musí být pro zkoušky do laboratoře předán tak, aby nedošlo k případnému ovlivnění výsledků zkoušek nevhodným zacházením se vzorkem při skladování a dopravě.

Z laboratorního vzorku je v laboratoři po homogenizaci a dělení připraven analytický vzorek, jehož hmotnost je minimálně 100 – 200 mg.

## 6. Izolace DNA

Pro izolaci kvalitní DNA je možné použít suché plody celé nebo mleté, čaje obsahující brusinky, zpracované plody, které jsou součástí ovocných složek potravin, například v džusech nebo rosolech či džemech. Suchý materiál je uchováván v PE zipových sáčkích, nebo je zabalen do alobalu a uchováván při teplotě -20°C, nebo je ihned v laboratoři zpracován (je z něj izolována DNA). Vzorky surovin, nebo produktů podléhajících zkáze musí být ihned zmrazeny nebo ihned zpracovány. Pro izolaci nukleových kyselin všeobecně je k dispozici několik metod, kde je prvním krokem narušení buněk rostlinného pletiva. Aby tato fáze proběhla úspěšně, je třeba pletivo homogenizovat. To není třeba u džemů, rosolů nebo protlaků. Pro rozrušení buněk rostlinného pletiva musí být použita nějaká forma mechanické síly, např. drcení matrice zmrazené tekutým dusíkem v třecí misce.

Pro uvolnění DNA z buněk se obecně používají lytické pufrы, které obsahují detergenty (SDS – dodecylsulfát sodný, CTAB cetyltrimetylamonium bromid). Následné použití chloroformu s isoamylalkoholem odstraní polysacharidy, proteiny a v organickém rozpouštědle solubilizující se látky. Směs lytického pufru a chloroformu je odstředěna a na rozhraní mezi fázemi se vytváří bílý prstenec precipitovaných proteinů a dalších složek. Horní vodná fáze obsahuje nukleové kyseliny.

Z vodného roztoku je DNA precipitována přidáním koncentrovaného vymraženého etanolu v přítomnosti solí. Ty je potřeba vymýt 75% etanolem. Čistá DNA je po vysušení rozpuštěná ve vodě nebo v TA pufru. Doporučuje se odstranit RNázy.

Z matric, které obsahují cukry, se tyto musí z matrice odmyt před zahájením samotné izolace DNA ze vzorku.

Pracovní postup analýzy DNA (složení roztoků, reagentie a činidla, přístrojové vybavení je uvedeno v části 10).

#### A) IZOLACE DNA Z CELÝCH A ROZDRČENÝCH SUŠENÝCH PLODŮ

|                                                                                                                                                                                          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| • navážit 100 – 200 mg homogenizovaného vzorku do 2 ml mikrozkušavky                                                                                                                     |
| • přidat 400 µl sterilované deionizované vody, ihned po přidání jednotlivé vzorky jemně promíchat sterilní kličkou a ponechat 5 min. rehydratovat                                        |
| • přidat 1,3 ml přehřátého na 65°C CTAB extrakčního pufru a vortexovat                                                                                                                   |
| • přidat 10 µl RNázy A a opatrně promíchat. Inkubovat 30 min. při teplotě 65°C v blokové lázni za stálého opatrného míchání (nebo každých 10 min. promíchat převrácením mikrozkušavky)   |
| • přidat 10 µl roztoku proteinázy K, jemně promíchat a nechat inkubovat 30 min. při teplotě 65°C za stálého opatrného míchání (nebo každých 10 min. promíchat převrácením mikrozkušavky) |
| • centrifugace v odstředivce 10 min. při 12000 ot./min.                                                                                                                                  |
| • přenést po cca 600 µl supernatantu do 2 nových 2 ml mikrozkušavek, přidat stejný objem směsi chloroform : isoamylalkohol = 24 : 1 a cca. 1 minutu silně třepat                         |
| • centrifugace v odstředivce 15 min. při 12000 ot./min. Přenést horní (vodní) fázi do nové 2ml mikrozkušavky                                                                             |
| • přidat 2 objemy CTAB precipitačního pufru                                                                                                                                              |
| • inkubace 60 min. při laboratorní teplotě bez jakéhokoli míchání                                                                                                                        |
| • centrifugace v odstředivce 15 min. při 12000 ot./min.                                                                                                                                  |
| • pipetou odstranit supernatant (popř. opatrně vylít) – pelet nemusí být viditelný                                                                                                       |
| • rozpustit vysráženou DNA přidáním 450 µl roztoku NaCl a opatrně pipetou promíchat (nebo převrácením mikrozkušavky)                                                                     |
| • přidat 450 µl směsi chloroform : isoamylalkohol = 24 : 1 a cca. 1 min. důkladně míchat (třepat rukou)                                                                                  |
| • centrifugace v odstředivce 20 min. při 12000 ot./min.                                                                                                                                  |
| • přenést horní vodní fázi do nové 1,5 ml mikrozkušavky                                                                                                                                  |
| • přidat 0,6 objemu isopropan-2-olu, jemně promíchat převrácením mikrozkušavky a nechat inkubovat 20 min. při laboratorní teplotě                                                        |

|                                                                                                                                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| • centrifugace v odstředivce 15 min. při 12000 ot./min.                                                                                               |
| • odstranit supernatant                                                                                                                               |
| • přidat 500 µl roztoku ethanolu a několikrát převrácením mikrozkušavky promíchat (toto je nejdůležitější krok dokončující kompletní odstranění CTAB) |
| • centrifugace v odstředivce 10 min. při 12000 ot./min.                                                                                               |
| • odstranit supernatant opatrným vylitím mikrozkušavky                                                                                                |
| • vysušit pelet DNA při laboratorní teplotě (cca.30min.) a znovu rozpouštět ve 100 µl TE pro PCR při teplotě 4°C min. 24hodin                         |

#### B) IZOLACE DNA Z MATRIC OBSAHUJÍCÍ CUKRY (např. džemy, džusy)

|                                                                                                                                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| • 10g džemu protřepat v 50 ml zkumavce s 30 ml destilované vody                                                                                       |
| • 10 minut zahřívat ve vodní lázni na 38°C, za občasného míchání                                                                                      |
| • Centrifugovat 5 minut v centrifuze (4500 rpm).                                                                                                      |
| • Supernatant dekantovat                                                                                                                              |
| • Postup je třeba opakovat 3x                                                                                                                         |
| • Sediment rozetřít v třecí misce v tekutém dusíku a použít pro izolaci DNA podle protokolu.                                                          |
| • DNA se izoluje pomocí DNAeasy plant isolation kit (Quiagen, Germany, kat. č. 69104) nebo jakýmkoliv ekvivalentním postupem na bázi gelové filtrace. |

#### 7. Kontrola kvality DNA

Kvalita izolované DNA, která je pro další analýzy klíčová, se stanovuje separací na agarózovém gelu (fragmentace a hrubý odhad kvantity) a spektrofotometricky (kvantita, kvalita, zastoupení interferujících látek).

Pracovní postup kontroly kvality DNA (složení roztoků, reagentie a činidla, přístrojové vybavení je uvedeno v části 10).

Podle počtu vzorků se připraví navážka agarózy. Pro objem 70ml 1xTAE je navážka agarózy 0,56 g a objem přidaného ethidium bromidu 0,7µl.

|                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• na analytických vahách se naváží na váženec potřebné množství agarózy</li> </ul>                                                                                                                                                                  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• navážená agaróza se převede do Erlenmayerovy baňky a zalije se potřebným objemem 1 x TAE pufru a v mikrovlnné troubě se roztok přivede k varu</li> </ul>                                                                                          |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• baňka se postaví na elektromagnetickou míchačku a vloží se do ní míchadélko. Když teplota roztoku v baňce klesne na cca 60°C, přidá se k roztoku agarózy požadovaný objem ethidium bromidu a roztok se nechá ještě cca 1 minutu míchat</li> </ul> |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• roztok agarózy se nalije do formy na gel ve které je hřebínek a nechá se vychladnout</li> </ul>                                                                                                                                                   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• po vychladnutí a ztuhnutí gelu se opatrně vyjme hřebínek, v gelu zůstanou jamky pro nanášení vzorků</li> </ul>                                                                                                                                    |

Vzorky se na připravený gel nanesou podle následujícího pracovního postupu:

|                                                                                                                                                                                                                                                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• z roztoku izolované DNA se odebere 1 µl, k ní se přidá 7 µl sterilní deionizované vody a 3 µl 6 x Loading Dye Solution</li> </ul>                                                                               |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• připravený elektroforetický gel se vloží do elektroforetické vany a převrství se (cca 5 mm) 1 x TAE pufrem</li> </ul>                                                                                           |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• do první a poslední dráhy se nanese 6 µl délkového standardu DNA Ladder HIND III a do dalších drah se nanáší vždy 11 µl každého vzorku</li> </ul>                                                               |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• elektroforéza probíhá cca 60 – 90 minut při 30 V</li> </ul>                                                                                                                                                     |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• po ukončení elektroforézy se gel vizualizuje pomocí UV záření ve fotodokumentačním zařízení. Srovnáním pozice DNA s pozicí délkového standardu je pak určena délka produktu a stupeň jeho degradace.</li> </ul> |

#### Spektrofotometrické měření koncentrace extrahované DNA

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Koncentrace DNA vzorku je měřena spektrofotometrem. Optimální koncentrace pro stanovení je 50 ng/µl. Vyšší koncentrace DNA se ředí TE pufrem.</li> </ul>                                                                                                                                       |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Čistota izolované DNA z hlediska kontaminace bílkovinami se získá změřením poměru absorbancí při vlnových délkách 260 a 280 nm (<math>A_{260}/A_{280}</math>), při které mají absorpční maximum bílkoviny. Hodnota tohoto poměru je optimální, pokud se pohybuje v rozmezí 1,7-1,9.</li> </ul> |

Vzorky DNA jsou naředěny H<sub>2</sub>O na pracovní koncentraci 50 ng/μl a použity pro další analýzy.

#### 8. Amplifikace cílových sekvencí – mikrosatelitů

Cílová sekvence (SSR) se amplifikuje ze specifického lokusu genomu analyzovaného materiálu pomocí fluorescenčně značených primerů (viz. Tab. 3) a *Taq* polymerázy v cyklické reakci (PCR). Obvykle se připraví reakční směs sestávající z tzv. mastermixu a cílové DNA.

Mastermix pro SSR reakci je připraven z chemikálií, které jsou uvedeny níže. Celkově je připraveno množství, které odpovídá předpokládanému počtu analyzovaných vzorků. Při výpočtu příslušných objemů je potřeba počítat také s malou rezervou na ztráty při pipetování. Po smíchání všech složek je mastermix distribuován v objemu **14μl** do tenkostěnných mikrozkušavek a do každé z nich je posléze přidán 1 μl roztoku genomické DNA izolované z analytického vzorku příslušné matrice (koncentrace 50 ng /μl). Sekvence primerů a očekávaná délka produktů jsou uvedeny v tabulce 3.

**Tabulka 1:** Popis složení reakční směsi pro amplifikaci SSR lokusů pro rozlišení brusnice brusinky a klikvy velkoplodé

| Komponenty reakční směsi  | Objem komponent (15μl) |
|---------------------------|------------------------|
| H <sub>2</sub> O          | 9,7                    |
| Pufr (Biotools)           | 1.5                    |
| MgCl <sub>2</sub> (15 mM) | 0.6                    |
| dNTPs (2.5mM)             | 1                      |
| Primer F (5μM)            | 0,5                    |
| Primer R (5μM)            | 0,5                    |
| Poly. 5U/μl               | 0.2                    |
| DNA (50 ng)               | 1                      |

Mikrozkušavky jsou centrifugovány a umístěny do termocykleru Veriti™ Thermal Cycler nebo jakéhokoliv ekvivalentního. PCR reakce se sestává z několika kroků a opakuje se 35x (viz Tabulka 2):

**Tabulka 2.:** Teplotní profil PCR reakce

| krok                 | Teplota (°C) | Čas (s)                                   |
|----------------------|--------------|-------------------------------------------|
| Iniciální denaturace | 95           | 300                                       |
| Cyklus:              |              |                                           |
| - Denaturace         | 95           | 30                                        |
| - Nasedání primerů   | 60           | 30s                                       |
| - Elongace řetězce   | 72           | 40                                        |
| Opakuje se 35x       |              |                                           |
| Ukončení přepisu     | 72           | 300                                       |
| Uchování             | 10<br>-20    | v cyklu přes noc<br>do dalšího zpracování |

**Tabulka č.3:** Přehled analyzovaných SSR lokusů, sekvence primerů specifických pro jednotlivé lokusy, délka amplifikovaného fragmentu (D) u brusnice brusinky D<sub>b</sub> a klikvy D<sub>k</sub>

| Název SSR lokusu | Sekvence primerů (5'-3')                                | D <sub>b</sub> (pb) | D <sub>k</sub> (pb) |
|------------------|---------------------------------------------------------|---------------------|---------------------|
| CA23             | F: FAM*-GAGAGGGTTTCGAGGAGGAG<br>R: AGAAACGGGACTGTGAGACG | 164                 | 155                 |
| CA169            | F: FAM-GTGATTAGTGGAGGGTTTTGC<br>R: ATCGAAGCGAAGGTCAAAGA | 116                 | 113                 |

\* - použitý fluorogen (FAM: 6-karboxyfluorescein)

## 9. Separace fragmentů

Pro rozlišení obou druhů jsou analyzovány PCR produkty celkem dvou mikrosatelitních lokusů. Produkty amplifikace jsou separovány pro stanovení jejich délky elektroforeticky metodou kapilární elektroforézy na přístroji ABI PRISM 3130 (ThermoFisher, Applied Biosystems USA) nebo jakýmkoliv ekvivalentním přístrojem.

Vzorky se před analýzou denaturují inkubací 7 minut při teplotě 94 °C a následně rychlým zchlazením na teplotu 4°C v prostředí formamidu (Viz Tab. 4). Denaturace se provádí v plastové destičce s 96 jamkami pro Genetický analyzátor. Jako interní velikostní standard se používá LIZ 500. Vzorky pro analýzu jsou připravovány do jamek destiček (určených pro použití v přístroji ABI PRISM 3130), uzavřeny víčky a centrifugovány.

**Tabulka 4:** Složení denaturačního roztoku pro denuraci vzorku před provedením kapilární elektroforézy

| složka       | Objem (μl) |
|--------------|------------|
| formamid     | 10,0       |
| LIZ500       | 1          |
| PCR produkty | 0,4        |

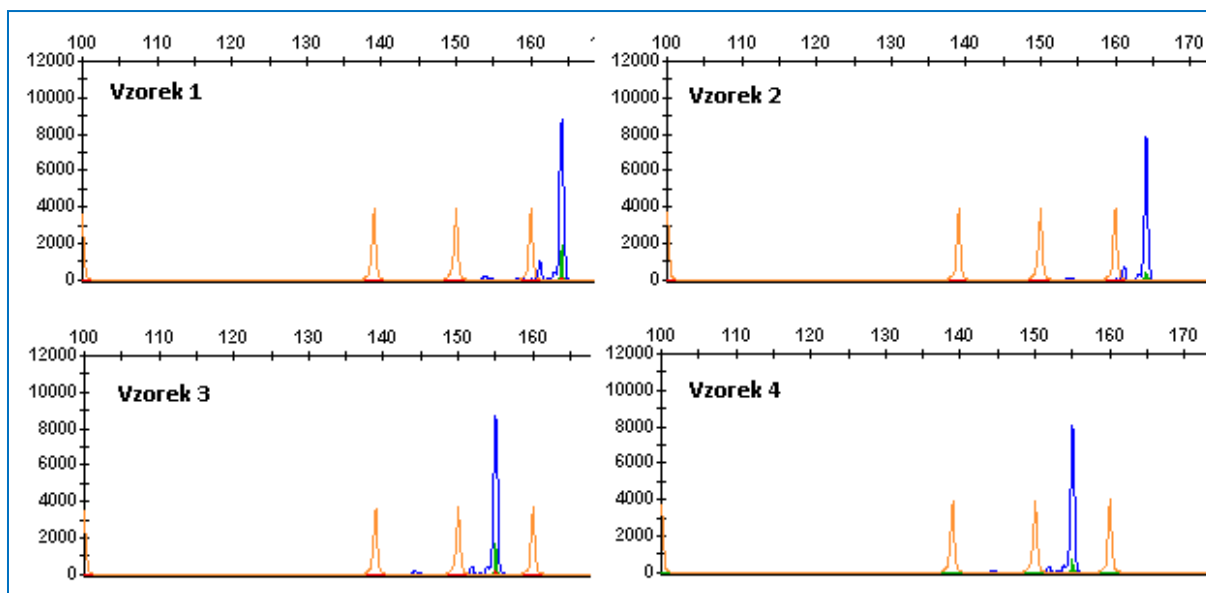
#### Analyza PCR produktů v přístroji ABI PRISM 3130

Přístroj je pro fragmentační analýzu připraven podle návodu výrobce, jeho popis není předmětem této metodiky. Kapilára je naplněna odpovídajícím polymerem dle návodu výrobce a přístroj je nastaven na analýzu fragmentů. Záznamy se zapisují v paměti řídicího počítače.

#### 10. Vyhodnocení analýzy

Profily SSR markerů, resp. délky amplifikovaných úseků v počtu bází, se zaznamenávají během analýzy v PC. Po analýze se zkontroluje kvalita signálů (min. výška stanovena pro individuální lokusy podle popisu výrobce separačního zařízení). Po kontrole se vyhodnocují profily pomocí specializovaného programu GeneMapper v 3.7. nebo ekvivalentním programem. Výsledkem analýzy jsou údaje o velikosti jednotlivých fragmentů (amplifikovaných sekvencí SSR) udávané v párech bází. Posuzuje se shoda s délkou amplifikovaných sekvencí SSR markerů charakteristických pro brusinku a klikvu. Vzorky DNA izolované z listů osmi odrůd brusinky brusnice a klikvy velkoplodé pěstovaných v ČR, se využívají jako referenční standardy. Příklad nezpracovaného profilu elektroforetogramu SSR markerů dvou genotypů brusnice brusinky a dvou genotypů klikvy velkoplodé jsou ukázány na obrázek 1.

**Obrázek 1:** Profil elektroforetogramu po separaci amplikonů specifických pro brusnici brusinku (vzorek 1 a vzorek 2) a klikvy velkoplodé (vzorek 3 a vzorek 4) při použití SSR markéru Ca53. Osa X uvádí délku fragmentu v pb a osa Y intenzitu signálu („výšku píku“). Amplikony jsou znázorněny modrou barvou. Červenou je vyznačen délkový standard (LIZ).



## 11. Potřebné technické vybavení a činidla

Analytická váha

Fotodokumentační zařízení

Elektromagnetické míchadlo

Eppendorf Thermomixer

Erlenmayerova baňka, 500 ml

Ethidium bromid

Hřebínek do elektroforetické vany a forma na gel pro elfo

Centrifuga s otáčkami min. 11000 otáček/min

Chladnička

Laboratorní parní sterilizátor

Magnetická míchačka

Mikropipety

Mikrovlnná trouba

Mrazicí box (-20°C, -80°C)

Odměrný válec, 500 ml

Ochranné gumové rukavice bez pudru

PCR destičky vč. víček či folie

pH-metr

Skleněné háčky na zachycení DNA

Stolní minicentrifuga

Spektrofotometr

Špičky na automatické pipety

Termocykler pro PCR Veriti™ Thermal Cycler

Třecí misky a tloučky

Váženky  
Vortex  
Zařízení na horizontální elektroforézu  
Zdroj k elektroforézám

0,2 ml sterilní zkumavky  
1,5 a 2 ml sterilní zkumavky  
6 x Loading Dye Solution

Přístroj na kapilární elektroforézu ABI3130 (Applied Biosystems) a program na vyhodnocení dat GeneMapper

Pro izolaci a amplifikaci DNA jsou potřebné následující roztoky a chemikálie:

- Agaróza
- tekutý dusík

#### ❖ CTAB EXTRAČNÍ PUFR:

10 g CTAB  
41g NaCl  
7,875 g Tris- HCl  
3,75 g Na<sub>2</sub>EDTA  
vše se doplní do objemu 500 ml H<sub>2</sub>O, pH roztoku se upraví na 8

#### ❖ CTAB PRECIPITAČNÍ PUFR:

2,5 g CTAB  
1,25 g NaCl  
vše se doplní do objemu 500 ml H<sub>2</sub>O, pH roztoku se upraví na 8

- 1,2 M NaCl:  
7 g NaCl se rozpustí v 100 ml deionizované vody
- 20 mg/ml Proteinase K:  
20 mg Proteinase K se rozpustí v 1 ml sterilní deionizované vody
- 10 mg/ml RNase A:  
10 mg RNase A se rozpustí v 1 ml sterilní deionizované vody

#### ❖ TE PUFR:

10 mM Tris 2,5 ml      1 M roztoku o pH 8,0  
1 mM EDTA 0,5 ml      0,5 M roztok o pH 8,0  
H<sub>2</sub>O                      do 250 ml

- směs chloroform: isoamylalkohol (24:1)
- 99 % roztok isopropanolu - vymražený
- 70 % roztok etanolu

#### ❖ 1 x TAE PUFR

|                                    |               |
|------------------------------------|---------------|
| TRIS báze (s) 4,8 g                | 0,48% roztoku |
| ledová CH <sub>3</sub> COOH 1,5 ml | 0,5M          |
| EDTA (pH = 8,0) 2,0 ml             | 1mM roztok    |
| H <sub>2</sub> O                   | do 1000ml     |

- Velikostní standard  $\lambda$  HindIII (Fermentas), vč. nanášecího pufru
- RNáza A
- Syntetické oligonukleotidy - primery specifické pro daný druh rostliny (viz Tabulka č.1)
- dNTP
- Tth polymeráza vč. pufru a MgCl<sub>2</sub> (Biotools)
- Ultra Pure H<sub>2</sub>O pro PCR
- Formamid
- LIZ500 délkový standard

### III. Zhodnocení finanční, časové a kapacitní náročnosti

Analýza zahrnuje extrakci DNA, PCR reakce a následnou detekci velikosti produktů. Časově a pracovně náročná je extrakce DNA použitím CTAB metody, ale je levnější než extrakce použitím kitu. Zpracování jednoho vzorků včetně izolace DNA se předpokládá během týdne. Paralelně lze zpracovávat max. 24 vzorků. Odborně náročnější část analýzy představuje vyhodnocení výsledků, které zahrnuje identifikaci a vyhodnocení přítomnosti amplikonů programem GeneMapper 3.7 a následné porovnání se vzorníkem referenčních materiálů zaškoleným pracovníkem.

Cena analýzy jednoho vzorku dvěma markery činí 1500 - 5.000,-Kč (podle matrice) včetně izolace DNA a analýzy v přístroji ABI PRISM 3130 a nároků na osobní náklady. Ceny analýz závisejí na kurzu US dolaru a aktuálních cenách chemikálií a počtu analýz v jedné sérii.

Pro zavedení metodiky do praxe je třeba počítat s náklady na verifikaci metody na daném pracovišti. Náklady na izolaci DNA 50 vzorků 5000 Kč, standard pro analýzu 5 000 Kč, náklady na pořízení SSR primerů 24 000 Kč, náklady na analýzu vzorku ve stroji 23 000 Kč a náklady na ostatní materiál. Jejich množství závisí na nutnosti opakování některých analýz při zavádění metody. Náklady na zavedení metody bez započtení osobních nákladů, které se mohou lišit, lze je odhadnout na 60 000 Kč.

#### **IV. Přednosti metody a možnosti rutinního využití**

Předností metody je vysoká specifita a míra reproducibility. SSR markery se ukázaly být přesné a vykazující stejné výsledky při jednotlivých opakováních experimentu, což potvrzují i někteří autoři (Jones et al., 1997), kteří sledovali reprodukovatelnost metod založených na DNA markerech, i naše výsledky (Mitrová et al. 2017, *v tisku*).

Analýza mikrosatelitů se používá rutinně ve forenzní diagnostice (Gilmore et al. 2003; Štambuk et al. 2007), ověřování původu zvířat (Marikar et al. 2014; Saberivand et al. 2011; Tupac-Yupanqui et al. 2010) a je doporučena i pro hodnocení odrůdové pravosti rostlin (Iqbal et al. 2010; Iqbal et al. 2013; McGregor et al. 2000).

Zatím nebylo možné ve zpracovaných materiálech jednoduchým způsobem určit, zda se jedná o produkt z brusinky brusnice nebo klikvy velkoplodé nebo jejich směsi.

Předložená metodika přináší nově validovaný postup upravený pro stanovení druhové deklarace u výrobku, vstupních surovin i produktů na trhu.

#### **V. Popis uplatnění metodiky**

Metodika představuje soubor optimalizovaných metod a postupů, na jejichž základě lze provádět rutinní analýzy surovin a výrobků z brusnice brusinky a klikvy velkoplodé. Výstupem analýzy jsou údaje o velikosti amplifikovaných fragmentů DNA (SSR markerů), které se použijí pro ztotožnění s očekávanou délkou amplifikovaných fragmentů DNA SSR markerů výše uvedených druhů.

Uživatelé této metodiky mohou být orgány státní správy (ÚKZÚZ, SZPI), kontrolní a soukromé laboratoře v ČR. Je možné ji využívat v běžných molekulárně-genetických laboratořích, a to jak v akreditovaném systému, tak pro výzkumné a vývojové účely.

#### **VI. Ekonomické přínosy**

Náklady na zavedení postupů uvedených v metodice v zařízené laboratoři jsou akceptovatelné. Jedná se o náklady na izolaci DNA, na reagenty, enzymy, plasty nebo fluorescenčně značené primery, kapiláry, údržbu software (1500 Kč na reakci a jeden SSR

marker). Náročnější mohou být nároky na verifikaci metody, celkový odhad 1000 Kč na primerový pár a dále náklady na akreditaci metody (poplatky akreditačnímu orgánu). Také je třeba zvážit osobní náklady a další provozní náklady pracoviště.

Uživatel získá ekonomický přínos (1) za komerční provádění analýz laboratořemi (2 - 5000 Kč/vzorek), (2) zpracovatelé confirmaci pravosti u zpracovávaných materiálů a u produktů. V tomto případě se vyhnou postihům ze strany dozorových orgánů, pokud nebude potravinu, potravní doplněk uváděný na trh odpovídat právním předpisům (Zákon o potravinách a tabákových výrobcích č. 110/1997 Sb. § 10, zákon č. 634/1992 Sb., o ochraně spotřebitele § 8.).

## VII. Použitá a další doporučená literatura

Brinkmann B, Junge A, Meyer E, Wiegand P.(1998) Population genetic diversity in relation to microsatellite heterogeneity. Hum Mutat. 11:135–144.

Cermak T., Kubat Z., Hobza R., Koblizkova A., Widmer A., Macas J. (2008): Survey of repetitive sequences in *Silene latifolia* with respect to their distribution on sex chromosomes. Chromosome Res., 16:961–976.

Čížková et al (2012) Trendy v autenticitě potravin a v přístupech k detekci falšování Chem. Listy 106, 903-910

Čurn V. Žaludová (2007). Fingerprinting of Oilseed Rape Cultivars. In: Gupta S. (ed.): Rapeseed Breeding. (Advances in Botanical Research, Volume 45). Elsevier Publ., pp. 155-179.

Fajardo, Violeta; Gonzalez, Isabel; Rojas, Maria; et al.(2010) A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species Trends in food science & technology volume: 21 issue: 8 pages: 408-421 published: aug 2010

Gallo M, Ferranti P. (2016) The evolution of analytical chemistry methods in foodomics Journal of Chromatography A , Volume: 1428 Pages: 3-15 Published: JAN 8 2016

Gilmore S., Peakall R., Robertson J. (2003): Short tandem repeat (STR) DNA markers are hypervariable and informative in *Cannabis sativa*: implications for forensic investigations. Forensic Science International, 131: 65-74.

Hájková P., Hrubý J., Pernová E., Čurn V., Žaludová J. (2005). Monitoring pěstebních ploch, přenos a detekce transgenů geneticky modifikované řepky olejky (*Brassica napus* L. var. *napus*). Sborník vědeckých prací VÚP Troubsko 15: 93-100.

Iqbal A., Sadaqat H.A., Khan A.S., Amjad M. (2010): Identification of sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae) hybrids using simple-sequence repeat markers. Genetics and Molecular Research, 10 (1): 102-106.

Iquebal A., Sarika , Arora V., Verma N., Rai A., Kumar D. (2013): First whole genome based microsatellite DNA marker database of tomato for mapping and variety identification. *BMC Plant Biology*, 13:197.

Jones C. J., Edwards K. J., Castaglione S., Winfield M. O., Sala F., van de Wiel C., Bredemeijer G., Vosman B., Matthes M., Daly A., Brettschneider R., Bettini P., Buiatti M., Maestri E., Malcevski A., Marmiroli N., Aert R., Volckaert G., Rueda J., Linacero R., Vazquez A., Karp A. (1997): Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding*, 3: 381–390.

AM; Kalt, W; Magee, JB; et al. (2006). Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in *Vaccinium* berries. *Journal of agricultural and food chemistry* Volume: 52 Issue: 15 Pages: 4713-4719 Published: JUL 28 2004

Kejnovsky E, Hobza R, Kubat Z, Cermak T, Vyskot B (2009) : The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants. *Heredity*, 102:533–541.

Li, Y., Fanli, M. and Yinan, Z. (2006). Study of anthocyanins in fruit of different *vaccinium* genotypes . *Acta Hort.* 715, 589-594. DOI: 10.17660/ActaHortic.2006.715.90

Lo, Yat-Tung; Shaw, Pang-Chui (2018).DNA-based techniques for authentication of processed food and food supplements *FOOD CHEMISTRY* Volume: 240 Pages: 767-774 Published: FEB 1 2018

Mafrá, Isabel; Ferreira, Isabel M. P. L. V. O.; Oliveira, M. Beatriz P. P. (2008) food authentication by pcr-based methods *European food research and technology* Volume: 227 Issue: 3 Pages: 649-665 Published: JUL 2008

Marikar F.M.M.T, Musthafa M.M. (2014): Usefulness of short sequence repeat markers in goat genetic diversity studies on the Asian and African continents. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 38: 606-611.

Marshall P.J., Marchand M.C., Lisieczko Z., Landry B.S. (1994). A simple method to estimate the percentage of hybridity in canola (*Brassica napus*) F1 hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 89: 853-858.

McGregor C.E., Greyling M.M., Warnich L. (2000): The use of Simple Sequence Repeats (SSRs) to identify commercially important potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars in South Africa. *South African Journal of Plant and Soil*, 17, 4.

Morgante, M., Olivieri, A.M. (1993): PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*, 3: 175-182.

Rajeev K. Varshney, Andreas Granera , Mark E.Sorrells (2005). Genic microsatellite markers in plants: features and applications. ( Volume 23, Issue 1, January 2005) *TRENDS in Biotechnology*– Elsevier , Pages 48-55.

Rimando, AM; Kalt, W; Magee, JB; et al. (2004) Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in *Vaccinium* berries . *Journal of agricultural and food chemistry* Volume: 52 Issue: 15 Pages: 4713-4719 Published: JUL 28 2004

Rubert, Josep; Zachariasova, Milena; Hajslova, Jana (2015) Advances in high-resolution mass spectrometry based on metabolomics studies for food - a review. Food additives and contaminants part a-chemistry analysis control exposure & risk assessment volume: 32 issue: 10 special issue: si pages: 1685-1708 published: oct 3 2015

Saberivand A., Javanmard A., Safdari M., (2011): Parentage verification and identity test of Ghezel sheep using microsatellite markers. *African Journal of Biotechnology*, 10(31): 5815-5819.

VP Shah, KK Midha, JWA Findlay, HM Hill et al. (2000) Bioanalytical method validation—a revisit with a decade of progress.(Vol. 17, No. 12) *Pharmaceutical Research*,– Springer

Staub J. E., Serquen F. C., Gupta M. (1996): Genetic Markers, Map Construction, And their application in plant breeding. In: *HortScience*, vol. 31, p. 729-741.

Štambuk S., Sutlovič D., Bakarič P., Petričević S., Anđelinović Š. (2007): Forensic Botany: Potential Usefulness of Microsatellite-based Genotyping of Croatian Olive (*Olea europaea* L.) in Forensic Casework. *Croatian Medical Journal*, 48(4):556–562

Taruscio, TG; Barney, DL; Exon, J. (2004). Content and profile of flavanoid and phenolic acid compounds in conjunction with the antioxidant capacity for a variety of northwest *Vaccinium* berries. *Journal of agricultural and food chemistry* Volume: 52 Issue: 10 Pages: 3169-3176 Published: MAY 19 2004

Tupac-Yupanqui I., Martínez A., Méndez S., Delgado J.V., Gómez M., Dunner S., Cañón J. Schulz U., (2010):The Canarian Camel: A Traditional Dromedary Population. *Diversity*, 2: 561-571.

## **VIII. Seznam publikací, které předcházely metodice, nebo jsou publikovány**

Sovová T., Křížová B., Drábková L., Ovesná J. (2017): Detection of PCR Inhibition in Food and Feed with a Synthetic Plasmid *Czech J. Food Sci.*, 35, (2): 160–164

Mitrová K., Pianta V., Kučera L., Ovesná J., (2017). Využití metody SSR pro stanovení typu brusinky a klikvy, *Úroda*, věd. příloha, 2017, *in press*

Sovová T., Křížová B., Ovesná J., Choosing optimal method for DNA isolation from fruit jams, in review, *Czech J. Food Sci.*, *in press*