

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

KVANTITATIVNÍ PCR DETEKCE NEPOVOLENÉHO PŘIBARVENÍ VÍNA BEZINKAMI (*Sambucus nigra*)

JIŘÍ DRÁBEK, MICHAELA JALŮVKOVÁ a IVO FRÉBORT

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc
drabek@prfholnt.upol.cz

Došlo 22.5.06, přijato 31.8.06.

Klíčová slova: víno, přírodní barvivo, detekce, kvantitativní PCR, bez černý, *Sambucus nigra*

Úvod

Víno jako kontrolovaná komodita

Víno je jedinečný ušlechtilý nápoj, který je pro svou charakteristickou chuť, barvu a vůni spotřebitelsky velmi žádaný. Pro svou popularitu se již odedávna stává cílem napodobování a falšování. Proto i dnes je víno kontrolované ze zákona – jako révové víno se označuje jen víno vyrobené výhradně z hroznů révy vinné rodu *Vitis L.*; ostatní nápoje mohou být nanejvýše vínu podobné. Podle zákona 321/2004 Sb. je při výrobě révového vína zakázáno používat výrobní postupy nebo látky, které umožňují zmnožovat víno (např. přidáváním vody) a nebo ovlivňovat jeho základní vlastnosti.

Vlivy na barvu červeného vína

Mezi základní vlastnosti vína patří barva. Barva je počátek seznámení s vínem, první podráždění smyslů z tria: color, odor, sapor. Platí to obzvláště pro vína červená, i když ani u barvy špičkového bílého vína dnes nevystačíme jen s číroostí a absencí nečistot. Intenzita zbarvení červeného vína závisí na odrůdě, fenolické zralosti révy, ale také na technologickém postupu při zpracování hroznů. Tradiční macerace, kdy je mošt v dlouhodobém kontaktu s pecičkami a slupkami hroznů, uvolňuje více flavonoidů než modernější karbonická macerace nebo termovinifikace. Barva vína záleží také na pH, stupni zasyření a obsahu ethanolu v moštu.

Přírodní barva červeného vína

Přirozená barva červeného vína je způsobená anthokyaniny, patřícími do velké skupiny polyfenolických látek, souhrnně nazývaných flavonoidy. Anthokyaniny mají dvě složky: barevnou část nazývanou aglykon nebo také anthokyanidin a část cukernou, která je navázána glykosidickou vazbou na hydroxylové skupiny 3, 5 nebo 7 aglykonu. Cukerná část může být acylována kyselinou kumarovou, kávovou, ferulovou, sinapovou, hydroxybenzoovou, jablečnou, šťavelovou, maleinovou, jantarovou nebo octovou. V modrých hroznech odrůd *Vitis vinifera* nalézáme především 3-monoglukosidy a 3,5-diglukosidy aglykonů malvidinu a v menší míře petunidinu, peonidinu, delphinidinu, kyanidinu, pelargonidinu. Syntetizují se od fáze zaměkání hroznů (véraison) a přispívají k chuti vína, i když nepřímo – váží třísloviny a tím regulují trpkost.

Během zrání vína fenolické látky podléhají zásadním chemickým změnám – polymerují s taniny, kondenzují s cukry, acylují se, navzájem asociují a pigmentují^{1,2} – což se projeví i ve změně barvy, která může dosáhnout svůj vrchol – např. oranžovohnědý nádech u portského – a pak degradovat.

Přibarvení červeného vína

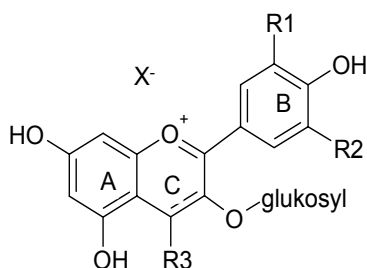
V podmínkách na severní hranici rozšíření pěstování révy vinné (což je i případ České republiky) je relativní nedostatek slunečního svitu, což při nedostatečné úpravě vinifikačního postupu vede ke světlejšímu, méně odpovídajícímu zbarvení červeného vína. Místo syntetických barviv mohou nepoctiví vinaři použít přírodní barviva, absorbujících viditelné elektromagnetické záření v takovém rozsahu, že to způsobuje červené vnímání barvy (pro výčet přírodních barviv viz Čopíková a spol.)³. Z dlouhé řady přírodních neanthokyanových barviv jen málo splňuje podmínku relativní dostupnosti, nízkých nákladů (ve srovnání s cenou kvalitních hroznů), vysokého absorpčního koeficientu ($>10\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$), netoxicity, stálosti vůči oxidaci a (foto)chemickým změnám v kyselém prostředí, rozpustnosti v 10% až 15% roztoku ethanolu ve vodě a absence nežádoucího pachu.

Přímočařejším a bezpečnějším postupem je použít přírodní anthokyaniny, i když ani ty se podle vyhlášky 304/2004 Sb., části 4 „Barviva“ v bodě 3 do vína nemohou přidávat. Přírodní anthokyaniny extrahované z červeného zelí nebo jiných zdrojů (tab. I) jsou komerčně dostupné pod označením E163, ale je nasnadě i přímé přidání bezinek (*Sambucus nigra*) nebo bezinkové šťávy do rmutu nebo vína.

Bez černý je v Evropě hojně rozšířený. Historicky se bezinky používaly nejen proti chřipce a k barvení vlasů starověkých Římanek, ale i k přibarvení vín Claret nebo

Tabulka I
Přírodní anthokyaniny

| Anthokyanidin | Zdroj | Substituenty na B a C kruhu (-R1, -R2, -R3) |
|--------------------------------|---|---|
| Kyanidin | růže (<i>Rosa</i>), plody třešně (<i>Cerasus avium</i>), brusinky (<i>Rhodococcum vitis-idaea</i>), chrpa modrák (<i>Cyanus sequetum</i>), zelí červené (<i>Brassica oleracea</i>) | OH, H, H |
| Pelargonidin | pelargonie (<i>Pelargonium</i>) | H, H, H |
| Peonidin | pivoňka (<i>Paeonia officinalis</i>) | OCH ₃ , H, H |
| Malvidin | prvosienka (<i>Primula</i>), sléz lesní (<i>Malva sylvestris</i>) | OCH ₃ , OCH ₃ , H |
| Kvercetin | jablonoň (<i>Malus domestica</i>), švestka (<i>Prunus domestica</i>), jinan, broskvoň (<i>Prunus persica</i>), meruňka (<i>Prunus armeniaca</i>), třešeň pračí (<i>Cerasus avium</i>) | OH, H, O |
| Myrtilin, glukosid delfinidinu | violka (<i>Viola tricolor</i>) | OH, OH, H |
| Sambubiosid | bez černý (<i>Sambucus nigra</i>) | OH, H, H |



Obr. 1. Obecné schéma anthokyaninů; substituenty R1, R2 a R3 nejběžnějších barevných aglykonů uvádí tabulka I

Bordeaux. V Portugalsku bylo jednu dobu přibarvování portského bezinkami tak časté, že vedlo k zákazu pěstování bezu.

Anthokyaniny v bezu černém patří mezi kyanidinglykosidy, řadíme zde 3-sambubiosid-3-glukosid, 3-sambubiosid-5-glukosid a 3,5-diglukosid. Množství těchto pigmentů se pohybuje v rozmezí 2 až 10 mg g⁻¹ čerstvých plodů⁴.

Detekce přibarvení červeného vína

V minulosti se k detekci potravinářských barviv používaly papírové, tenkovrstvé nebo kolonové chromatografické metody⁴, v současnosti se používá převážně metoda HPLC^{4,5}, často spřažená s hmotnostní spektrometrií⁶ nebo také s kapilární elektroforézou⁷, popř. s její zónovou modifikací CZE (cit.⁸). Tyto metody detekce anthokyaninů dosahují citlivosti kolem 0,1–1 mg l⁻¹ (cit.⁷).

Cíl práce

Dosavadní chromatografická detekce dobarvení vína anthokyaniny bezu černého je ztížena faktem, že relativní poměr révových anthokyaninů ve víně je dynamická veličina^{9,10} a přidávané bezinkové anthokyaniny jsou stejné chemické povahy, jako původní barvivo červeného vína. V této práci si klademe za cíl prozkoumat alternativní postup detekce bezinek v červeném víně – detekci pomocí kvantitativní PCR (qPCR). Předpokládáme, že takový postup by mohl sloužit jako komplementární, popřípadě potvrzovací metoda k metodám chromatografickým.

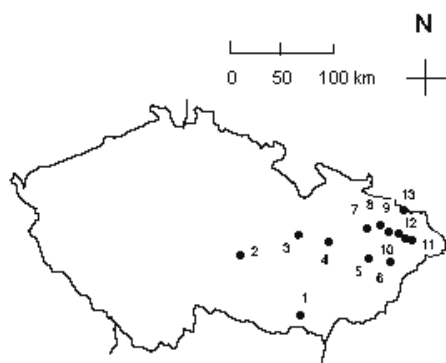
Experimentální část

Sběr vzorků

Mladé zdravé listy bezu černého byly sbírány na podzim 2004 na 56 stanovištích na Moravě (obr. 2), bezinky pak na jediném stanovišti v Olomouci.

Izolace DNA z listů bezu černého

Ze zdravého listu bylo víčkem 1,5 ml zkumavky vyříznuto 6 kroužků, ke kterým byl přidán 1 ml extrakčního roztoku (CTAB 2 %, TrisCl 50 mM pH 8, EDTA 50 mM pH 8,0 NaCl 1,1 M, LiCl 0,4 M, Tween 20 0,5 %, Triton X-100 0,5 %, PVP10 2 % (cit.^{11,12})). Špičkou pipety byla rozdrčena listová tkáň a zkumavka byla krátce zamíchána na vortexu. Vzorek byl inkubován 15 min při 80 °C a po ochlazení na pokojovou teplotu dvakrát extrahován 0,5 ml chloroformu (centrifugace 3 min 10 000×g a přenesení horní fáze). Poté byla horní fáze vysrážena jedním objemem isopropanolu, promyta 70% ethanolem, resuspendována ve 200 μl sterilní TrisCl – EDTA, pH 8 a skladována v mrazničce do dalšího použití. Koncentrace DNA



Obr. 2. Stanoviště sběru listů bezu černého (*Sambucus nigra*);

1. Hroznová Lhota (Jihomoravský kraj) – 2 ks, 2. Krásněves (Kraj Vysočina) – 2 ks, 3. Olomouc (Olomoucký kraj) – 9 ks, 4. Milenov (Olomoucký kraj) – 4 ks, 5. Bystrice pod Hostýnem (Zlínský kraj) – 5 ks, 6. Valašské Meziříčí (Zlínský kraj) – 4 ks, 7. Nový Jičín (Moravskoslezský kraj) – 4 ks, 8. Koprivnice (Moravskoslezský kraj) – 13 ks, 9. Příbor (Moravskoslezský kraj) – 2 ks, 10. Hukvaldy (Moravskoslezský kraj) – 1 ks, 11. Rožnov pod Radhoštěm (Moravskoslezský kraj) – 4 ks, 12. Zákopčín (Zlínský kraj) – 5 ks, 13. Český Těšín (Moravskoslezský kraj) – 1 ks

byla měřena fluorescenčně s barvivem PicoGreen (kalibrovaným spektrofotometricky) a kvalita DNA byla vyhodnocena elektroforézou na 2% agarózovém gelu po obarvení ethidium bromidem.

Izolace DNA z bezinek

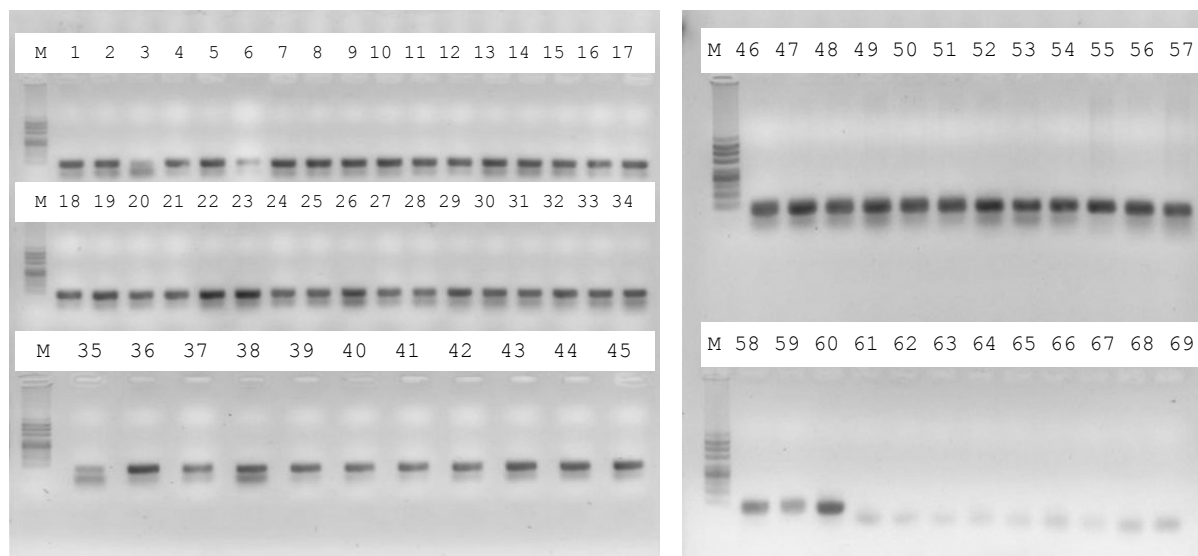
Pět zmražených plodů bezu – bezinek ($\pm 0,5$ g) bylo rozdrceno pipetovací špičkou ve zkumavce. Tekutá část byla odpipetována za přídavku 10 μ l lineárního polyakrylamidu¹³. Obě části byly lyzovány komerčním pufrém DNAzol (Invitrogen) obsahujícím guanidin isothiokyanát (GuSCN) (cit.¹⁴) a extrahovány chloroformem podle firmního návodu.

Izolace DNA z vína přibarveného bezinkami

Zmražené bezinky byly rozdrceny tloučkem v porcelánové misce. K 20 ml vína Veltlínské zelené (Igristoe CZ) bylo přidáno 3,7 g rozdrcených bezinek (nebo 3,3 ml bezinkové šťávy) a 10 μ l lineárního polyakrylamidu. Pevné částice byly vysráženy 20 ml isopropanolu. DNA ze sedimentu byla extrahována GuSCN a dvakrát chloroformem, potom vysrážena isopropanolem. Po přečištění 80% ethanolem byl precipitát rozpuštěn ve 100 μ l 10 mM TrisCl-EDTA pH 8.

Design PCR primerů

Primery byly navrženy pro vnitřní přepisovanou sekvenci (Internal Transcribed Sequence, ITS) v rRNA podle sekvence U88204 z databáze GenBank pomocí programu Primer3 (cit.¹⁵). Primer ve směru transkripce měl sekvenci 5'-AAA CCT GCA CAG CAG AAT GAC-3', primer proti směru transkripce sekvenci 5'-CGC TCT TCA GTA AAA ATT CCT TG-3'.



Obr. 3. Testování specifčnosti PCR: detekce na agarozové elektroforéze; M: délkový standard (proužek nejbližší amplikonu odpovídá 200 bp); č.1–60: amplikony DNA bezu černého ze stanovišť podle obr. 2; č.61–69: negativní kontroly, 61 – virus výrustkové mozaiky hrachu, 62 – *Saccharomyces cerevisiae*, 63 – bakteriofág lambda, 64 – *Vitis vinifera* odrůda Zweigeltrebe, 65 – *Vitis vinifera* odrůda Svatovavřínecké, 66 – *Vitis vinifera* odrůda Frankovka, 67 – *Vitis vinifera* odrůda Pinot noir, 68 – *Vitis vinifera* odrůda Portugalské modré, 69 – amplifikace bez templátu

Před syntézou byly sekvence primerů překontrolovány programem BLAST (cit.¹⁶), zda-li se nemohou teoreticky vázat i na templátovou DNA jiných organismů a poskytnout tak nespecifické amplikony.

Testování specificity PCR *in vitro*

Polymerázová řetězová reakce proběhla v cykléru Biometra Gradient, v pufru TopBio Taq s těmito komponentami: 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 1,67 mU μl⁻¹ Taq, 0,2 mg μl⁻¹ BSA, 1 μM primerů (sekvence viz výše), 0,1 % Triton X-100. Parametry cykléru byly: 95 °C 5 min, (96 °C 10 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s)×45. Do reakčního roztoku bylo přidáno po 5 ng DNA z 56 stanovišť bezu černého (60 vzorků) a 9 negativních kontrol (virová, révo- vá, kvasinková DNA a voda, viz obr. 3).

Testování citlivosti PCR *in vitro*

Citlivost PCR byla testována v reálném čase v optickém kanálu FAM (gain 9,3) cykléru Rotor-Gene 3000 (Corbett Research) ve stejné reakční směsi a při stejných parametrech jako při testování specificity, ovšem s přidávkem 0,005% fluorescenčního DNA interkalátoru SYBR® Green I (cit.¹⁷). Při analýze byl využit firemní software Rotor-Gene 6.0.23 s těmito hodnotami nastavení: prahová hodnota 0,41, levá prahová hodnota 1, začátek standardní normalizace prvním cyklem, nepřítomnost korekce šumu a prahu reakční účinnosti, lehký digitální filtr a 10% prahová hodnota pro negativní kontrolu bez templátu. Měřením fluorescence v průběhu PCR u řady s rozdílnými koncentracemi DNA jsme sestrojili křivku závislosti růstu fluorescence na počtu cyklů PCR a extrapolací zjistili počáteční koncentraci templátové DNA

v testovaných vzorcích. Po PCR jsme otestovali teplotu tání amplikonu (stoupání od 72 °C na 99 °C při rychlosti 0,1 °C s⁻¹ při kontinuálním měření ve FAM kanálu).

Výsledky a diskuse

Isolovali jsme: a) DNA bezu černého (*Sambucus nigra*) z listů, získaných z 13 moravských obcí (56 stanovišť, 60 vzorků) s fluorimetricky zjištěným výtěžkem 66,3 ± 52,5 ng DNA kroužek listu⁻¹, b) DNA bezu černého z bezinek (69 ± 13 μg DNA g⁻¹) a bezinkové šťávy (41 ± 19 μg DNA g⁻¹).

Při zkoumání uměle přibarveného vína jsme nenalezli významný rozdíl ve výtěžku DNA *Sambucus nigra* z vína uměle přibarveného bezinkami (fluorimetricky 2,78 ± 0,138 μg DNA g⁻¹ bezinek, pomocí qPCR 1,97 ± 0,75 μg DNA g⁻¹ bezinek) a bezinkovou šťávou (fluorimetricky 2,81 ± 1,328 μg DNA g⁻¹ bezinkové šťávy, pomocí qPCR 1,24 ± 0,67 μg DNA g⁻¹ bezinkové šťávy), takže je naše metoda použitelná na obě alternativy falšování.

Navrhli jsme PCR primery, specifické pro ITS sekvenci *Sambucus nigra*, které poskytují amplikon o délce 160 bp. Zatímco primer po směru transkripce má širší specificitu (při hodnotě očekávání náhodné shody s danou databází E=0,01 jej bylo možno přiložit k sekvencím mnohých dvouděložných rostlin), primer proti směru transkripce je specifický jen pro rod *Sambucus* (tab. II).

Do vína se může potenciálně dostat DNA organismů, které se přirozeně na hroznech vyskytují už ve vinohradu (*Kloeckera apiculata*, *Candida stellata*, *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Nadsonia*, *Pichia*, *Oidium*, *Vitius vitifolii*/

Tabulka II

Výsledek BLAST analýzy pro zpětný primer s hodnotou očekávání náhodné shody s danou databází E nižší než 0,001

| Označení sekvence v databázi GenBank | Druh |
|---|--------------------------------|
| gi 33299973 gb AY236171.1 gi 33087025 gb AY265158.1 gi 1850577 gb U88207.1 SRU88207 | <i>Sambucus racemosa</i> |
| gi 2226018 gb U88558.1 U88558 | <i>Sambucus sieboldiana</i> |
| gi 1850576 gb U88206.1 SPU88206 | <i>Sambucus pubens</i> |
| gi 1850575 gb U88205.1 SPU88205 | <i>Sambucus peruviana</i> |
| gi 1850574 gb U88204.1 SNU88204 | <i>Sambucus nigra</i> |
| gi 1850573 gb U88203.1 SMU88203 | <i>Sambucus melanocarpa</i> |
| gi 1850572 gb U88202.1 SMU88202 | <i>Sambucus maderensis</i> |
| gi 1850569 gb U88199.1 SCU88199 gi 33087024 gb AY265157.1 | <i>Sambucus canadensis</i> |
| gi 1850568 gb U88198.1 SCU88198 | <i>Sambucus callicarpa</i> |
| gi 1850567 gb U88197.1 SCU88197 | <i>Sambucus caerulea</i> |
| gi 1850566 gb U88196.1 SAU88196 | <i>Sambucus australis</i> |
| gi 1825461 gb U41382.1 SGU41382 | <i>Sambucus gaudichaudiana</i> |

Daktulosphaira vitifoliae, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Penicillium*, *Plasmopara*, *Uncinula*) a DNA organismů, podílejících se na vinifikaci (*S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. uvarum* při kvašení, *Quercus bulba* a *Quercus robur* při barikování, *Huso huso* z vyziny, *Galus gallus f. domestica* z bílku nebo *Bos primigenius f. taurus* z kaseinu při číření). Přirozenou cestou se DNA dvouděložných rostlin mezi hrozny při přípravě vína nedostane, proto můžeme teoretickou specifitost našich primerů považovat za dostačující. Navíc i jediný primer z páru může zabezpečit specifitu PCR reakce při dostatečně stringentní teplotě nasedání primeru. Výsledky *in silico* BLAST analýzy jsme testovali *in vitro* na naší testovací sadě vzorků. Všechny vzorky rodu *Sambucus*, které byly sbírány bez odborného taxonomického dohledu a nemusely proto nutně být druhu *Sambucus nigra*, byly úspěšně amplifikovány, což potvrzuje robustnost metody. Zároveň žádná z negativních kontrol nebyla amplifikována (obr. 3).

Pomocí kvantitativní PCR s interkalátorem SYBR-Green I, kalibrované spektrofotometricky, jsme byli schopni detegovat 60 pg bezové DNA na PCR reakci, což odpovídá dvojnásobku diploidního bezového genomu (2C = 30,5 pg) nebo 1/3000 bezinky¹⁸. Citlivost je takto vysoká, protože cílová sekvence ITS1 se nachází v bezovém genomu ve stovkách, ne-li v tisících kopiích¹⁹. Specifitost namnožení cílové sekvence byla dále ověřena shodou experimentálně zjištěné teploty tání amplikonu (86,5 ± 0,5 °C) s teoretickou hodnotou (87 °C), vypočtené programem OligoCalculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligo.html>, přístup online 24.7.2006).

Pro zjištění, nakolik naše citlivost koresponduje s množstvím bezinkové DNA v přibarvovaném víně, jsme provedli simulační pokus „přeměny“ bílého vína na červené. Potřebovali jsme více než 1000 bezinek (107 g), aby se barva Veltlínského zeleného vína (Igristoe CZ; 0,7 l) přiblížila barvě Svatovavříneckého. Tyto pokusy jsme provedli jen zrakovým srovnáním přibarvovaného bílého vína pro získání orientační hodnoty cílové citlivosti detekční metody. O větší přesnost jsme se nesnažili, protože ani přesné stanovení XYZ tristimulu podle kolorimetrického standardu Commission Internationale de l'Éclairage²⁰ nepostihuje subjektivní faktor vnímání barvy. Jiný simulační pokus Bridleho⁴ dosáhl znatelného vylepšení barvy červeného vína přidáním 280 bezinek (30 g) do 700 ml láhve vína. Dosažená citlivost qPCR je proto dostačující a plně srovnatelná se současnými chromatografickými metodami^{4,7}. Navíc naše metoda testuje DNA místo anthokyaninů a může proto sloužit jako nezávislá kontrola chromatografických výsledků.

Pro ověření použitelnosti metody na reálných vzorcích jsme testovali přítomnost bezové DNA v podezřelém sudovém víně. Výsledky byly negativní (data neuvedena). Je možné, že toto víno bylo přibarveno synteticky, a proto rozšiřujeme soubor vzorků k testování.

Závěr

Vyvinuli jsme qPCR metodu detekce nepovoleného přibarvení červeného vína bezinkami druhů rodu *Sambucus* s limitem citlivosti odpovídajícím dvojnásobku bezového genomu. Naše metoda je dostatečně citlivá pro praktické využití a zároveň postavená na jiném principu než současné chromatografické metody²¹, a proto může sloužit i pro kontrolní účely České obchodní inspekce. Naše namátkové testování levných červených vín však bylo negativní. Je možné, že nepoctiví vinaři přibarvují spíše syntetickou trestí (dříve se používal kancerogenní a hemolytický azorubin a briliantní modř²²), než netoxickými bezinkami.

Práce byla provedena za přispění grantu IK04104 MŠMT.

LITERATURA

1. Drábek J., Bednář P.: Vin. Obzor 6, 280 (2004).
2. Boulton R.: Am. J. Enol. Vitic. 52, 67 (2001).
3. Čopíková J., Uher M., Lapčík O., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy 99, 802 (2005).
4. Bridle P., GarciaViguera C.: Food Chem. 55, 111 (1996).
5. Miyamoto F., Saeki M., Kamijo M., Kanda H., Nakaoka T., Nishijima M., Ito Y., Takeshita R.: Eisei Kagaku-Jpn. J. Toxicol. Environ. Health 37, 542 (1991).
6. Chandra A., Rana J., Li Y.: J. Agric. Food Chem. 49, 3515 (2001).
7. Garcia-Beneytez E., Cabello F., Revilla E.: J. Agric. Food Chem. 51, 5622 (2003).
8. Bednář P., Papoušková B., Muller L., Barták P., Stávek J., Pavloušek P., Lemr K.: J. Sep. Sci. 28, 1291 (2005).
9. Ishikawa F., Oishi M., Kimura K., Yasui A., Saito K.: J. Food. Hyg. Soc. Jpn. 45, 150 (2004).
10. Mazzuca P., Ferranti P., Picariello G., Chianese L., Addeo F.: J. Mass Spectrom. 40, 83 (2005).
11. Castellarin S. D., Di Gaspero G., Marconi R., Nonis A., Peterlunger E., Paillard S., Adam-Blondon A. F., Testolin R.: BMC. Genomics 7, 12 (2006).
12. Puchooa D.: Afr. J. Biotechnol. 3, 253 (2004).
13. Lefort F., Douglas G. C.: Ann. Forest Sci. 56, 259 (1999).
14. Gaillard C., Strauss F.: Nucleic Acids Res. 18, 378 (1990).
15. Chomczynski P., Mackey K., Drews R., Wilfinger W.: Biotechniques 22, 550 (1997).
16. Rozen S., Skaletsky H.: Methods Mol. Biol. 132, 365 (2000).
17. Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J.: J. Mol. Biol. 215, 403 (1990).

18. Rasmussen R., Morrison T., Herrmann M., Wittwer C.: *Biochemica* 2, 8 (1998).
19. Bennett M. D., Leitch I. J.: *Ann. Bot. (Lond)* 95, 45 (2005).
20. Prokopowich C. D., Gregory T. R., Crease T. J.: *Genome* 46, 48 (2003).
21. Stávek J.: *Vin. Obzor* 4, 178 (2006).
22. Nakajima J., Tanaka I., Seo S., Yamazaki M., Saito K.: *J. Biomed. Biotechnol.* 241 (2004).
23. De Villiers A., Alberts F., Lynen F., Crouch A., Sandra P.: *Chromatographia* 58, 393 (2003).

J. Drábek, M. Jalůvková, and I. Frébort (*Faculty of Science, Palacký University Olomouc*): **Quantitative PCR Determination of Elderberries (*Sambucus nigra*), an Illegal Additive to Wine**

Low colour in red wine decreases its price on the market. Therefore, illegal winemakers adulterate wine by adding elderberries (*Sambucus nigra*), a natural colouring additive. Elderberries contain anthocyanines which also occur in red wine. Given the dynamic nature of the anthocyanine content in wine, it is sometimes difficult to distinguish wine and elderberry anthocyanines by chromatographic methods. We describe a sensitive quantitative PCR method of determination of elderberries based on amplification of internal transcribed sequence. Our method addresses a different target than traditional chromatography, DNA instead of anthocyanines, and hence can serve as a complementary method.

VŠCHT Praha přijme technika/laboranta/ku na Ústav organické chemie.

Požadovaný profil vhodného uchazeče:

- středoškolské vzdělání chemického směru,
- praxe v oboru výhodou.

Nabízíme:

- samostatnou práci na špičkovém pracovišti,
- příležitost k profesnímu rozvoji,
- pracoviště v blízkosti metra,
- pružnou pracovní dobu,
- příspěvek na stravování, návštěvu kulturních a sportovních zařízení, rekreaci, penzijní připojištění.

Nástup: 1. 9. 2007

Kontakt: Jana Kosařová, tel. 220444164, jana.kosarova@vscht.cz
prof. Ing. Pavel Lhoták, CSc., tel. 220445055, pavel.lhotak@vscht.cz
