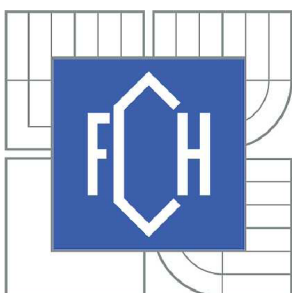


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VLIV ZPRACOVÁNÍ POTRAVINOVÝCH SUROVIN NA DEGRADACI DNA A JEJÍ AMPLIFIKACI V PCR

INFLUENCE OF FOOD PROCESSING ON DNA DEGRADATION AND ITS AMPLIFICATION IN
PCR

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

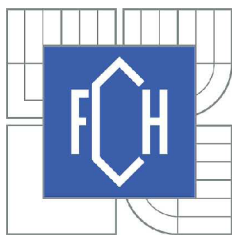
MARTINA GAŇOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. BOHUSLAV RITTICH, CSc.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0867/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Martina Gaňová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901R021)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.	
Konzultanti:	doc. RNDr. Alena Španová, CSc.	

Název bakalářské práce:

Vliv zpracování potravinových surovin na degradaci DNA a její amplifikaci v PCR

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracujte literární přehled k dané problematice
2. Popište použité experimentální metody
3. Vyhodnoťte získané výsledky

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Martina Gaňová
Student(ka)

doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Práca sa zaoberá degradáciou DNA pri spracovaní potravín, či už chemickými, fyzikálnymi alebo mechanickými metódami. Do akej miery je štruktúra nukleovej kyseliny porušená a ako to ovplyvňuje následnú analýzu a získanú kvalitu DNA, čo sú podstatne dôležité faktory, ktoré vypovedajú o zložení a kvalite poskytovaných surovín na trhu. Cieľom bolo overiť vplyv varu a času na degradáciu DNA a jej amplifikáciu v PCR.

ABSTRACT

This work deals with the degradation of DNA during food processing by chemical, physical or mechanical methods. The degree of damage of structure of nucleic acids and how it affects the subsequent analysis and quality of obtained DNA, which are significant factors that tell us about the composition and quality of the raw materials on the market. The aim was to analyze the effect of boiling and the time on the degradation of DNA and its amplification in PCR.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

potravínové výrobky, spracovanie potravín, degradácia DNA, izolácia DNA, kvantifikácia DNA, PCR

KEYWORDS

food products, food processing, degradation of DNA, DNA isolation, quantification of DNA, PCR

GAŇOVÁ, M. *Vliv zpracování potravinových surovin na degradaci DNA a její amplifikaci v PCR*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 37 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.

PREHLÁSENIE

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

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Moje poďakovanie patrí vedúcemu bakalárskej práce doc. Ing. Bohuslavovi Rittichovi, CSc. za jeho konzultácie a odborné rady pri tvorbe práce. Ďalej chcem poďakovať doc. RNDr. Alene Španovej, CSc. za jej vedenie a čas pri riešení bakalárskej práce, ďakujem kolegom z laboratória na inžinierskom štúdiu za ich pomoc a rady pri meraní k bakalárskej práce a svojej rodine ďakujem za ich cennú podporu.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČASŤ	8
2.1	Výskyt nukleových kyselín v potravinách	8
2.1.1	Stabilita nukleových kyselín	8
2.2	Degradácia DNA pri spracovaní surovín	8
2.3	Metódy spracovania potravín	9
2.3.1	Teplota	10
2.3.2	Vplyv pH	10
2.3.3	Fermentácia	10
2.3.4	Mechanická úprava	11
2.3.5	Enzymatická degradácia	11
2.3.6	Extrakcia oleja a rafinovanie	12
2.3.7	Ďalšie procesy	12
2.4	Metódy analýzy DNA	12
2.4.1	Extrakcia DNA	12
2.4.2	Agarózová gélová elektroforéza	13
2.4.3	UV spektrofotometria a fluorescenčná spektrofotometria	13
2.4.4	Hodnotenie kvality izolovanej DNA	13
2.5	Konvenčná PCR	14
2.6	PCR v reálnom čase (Real-Time PCR)	15
2.6.1	Inhibítory PCR	16
2.7	Vplyv spracovaných surovín na amplifikáciu v PCR	17
2.8	Identifikácia a kvantifikácia DNA v mliečnych produktoch	17
2.9	Identifikácia zložiek spracovaných potravín	18
3	CIEĽ PRÁCE	19
4	EXPERIMENTÁNA ČASŤ	20
4.1	Materiál	20
4.1.1	Výrobok a mikroorganizmus	20
4.1.2	Magnetické častice	20
4.2	Chemikálie	20
4.3	PCR komponenty	21
4.4	Roztoky	21
4.4.1	Roztoky pre lýzu buniek	21
4.4.2	Roztoky pre izoláciu DNA pomocou magnetických častíc	21
4.4.3	Roztoky pre fenolovú extrakciu DNA	21
4.4.4	Roztoky pre gélová elektroforézu	22
4.5	Pomôcky a prístroje	22
5	METÓDY	22
5.1	Príprava hrubých lyzátov buniek z tekutého mliečneho výrobku	22
5.2	Extrakcia bakteriálnej DNA fenolom	23
5.3	Zrážanie DNA etanolom	23
5.4	Izolácia DNA pomocou magnetických mikročastíc z hrubého lyzátu buniek z mliečneho výrobku	23
5.5	Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty bakteriálnej DNA	24
5.6	Príprava zmesi pre PCR	24
5.7	Program pre PCR	25
5.8	Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR bakteriálnej DNA	25
6	VÝSLEDKY	26
6.1	Izolácia DNA	26
6.2	Stanovenie koncentrácie a čistoty DNA	26

6.3	Gélová elektroforéza bakteriálnej DNA.....	27
6.4	Amplifikácia DNA v polymerázovej reťazovej reakcii s primérmí špecifickými pre doménu <i>Bacteria</i>	27
6.5	Dôkaz prítomnosti DNA bakterií rodu <i>Lactobacillus</i> s primérmí LbLMA1-rev, R16-1 ..	29
6.6	Dôkaz prítomnosti DNA bakterií rodu <i>Lactobacillus</i> s primérmí F all lac, R all lac...	30
7	DISKUSIA.....	32
7.1	Izolácia DNA z výrobku	32
7.2	Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty izolovanej DNA	32
7.3	Gélová elektroforéza bakteriálnej DNA.....	32
7.4	PCR špecifická pre doménu <i>Bacteria</i>	32
7.5	PCR špecifická pre rod <i>Lactobacillus</i> s primérmí LbLMA1-rev, R16-1	33
7.6	PCR špecifická pre rod <i>Lactobacillus</i> s primérmí F all lac, R all lac	33
8	ZÁVER	34
9	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	35
10	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV	37

1 ÚVOD

Identifikácia a detekcia špecifickej cieľovej DNA sekvencie môže poskytnúť základ pre jednoznačnú autentifikáciu surovín. Detekcia cieľových DNA dovoľuje rozoznať množstvo rôznych zložiek potravy, ako napríklad rozlíšiť druhovú identifikáciu rýb, detekciu geneticky modifikovaných organizmov v potravinách, rozlíšiť odrody pšenice a ryže ako tiež rozoznať falšovanie potravín a nápojov. Navyše, sú tu ďalšie odvetvia, ktoré len nedávno začali využívať výhody techník založených na analýze DNA, ako napríklad druhová identifikácia rôznych živočíšnych tkanív alebo identifikácia rôznych bakteriálnych druhov napr. v probiotických výrobkoch. [1]

Laboratória zapojené do analýzy živočíšnych produktov sa skôr spoliehali na imunochemické postupy, ktoré si zvyčajne vyžadovali produkciu špecifických antisér ku každému cieľovému organizmu. Spracovanie produktov mohlo viesť k parciálnej alebo kompletnej strate epitopov normálne prítomných v natívnej štruktúre proteínu. Naopak, polymerázová reťazová reakcia umožňuje rýchlu amplifikáciu nepatrných množstiev zvyšných DNA fragmentov, a teda má vysoký potenciál pre analýzu potravín. [1]

Výskyt patogenných baktérií, alergénov a úmyselné falšovanie potravín alebo ich nesprávne popisovanie (ako napríklad nedostatok informácií o obsahu a množstve alergénov a geneticky modifikovaných organizmov), môžu uviesť do omylu spotrebiteľa. [2] Preto je dôležitá kontrola kontrolnými laboratóriami, v ktorých sa používajú odpovedajúce analytické metódy. Metóda kvantitatívnej PCR (qPCR) sa ukázala ako správna voľba pre rutinnú detekciu a kvantifikáciu. [3] Konečný výsledok ovplyvňuje nielen výber extrakčnej metódy pri izolácii DNA, ale tiež technika použitá pri vyhodnotení DNA degradácie, vrátane PCR. Počet cyklov, dĺžka amplikónu, prítomnosť inhibítorov PCR a množstvo DNA použitej na PCR ovplyvní detekčný a kvantifikačný limit. [4]

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Výskyt nukleových kyselín v potravinách

Rastlinné a živočíšne potraviny obsahujú DNA a RNA, nukleotidy a voľné nukleové bázy. Ich celkový obsah v potravinách je rozličný podľa zdroja závisiaceho na množstve buniek a teda i nukleových kyselín v bunkách. Živočíšne svalové tkanivo pozostáva z vysokého obsahu DNA a RNA, hoci je menšie ako vo vnútornostiach, ktoré tiež obsahujú vysoké množstvo bunkových jadier. Rastlinné úložné tkanivá, ako zrná alebo zemiaky, s menším obsahom bunkových jadier, obsahujú menej DNA a RNA. Najvyšší obsah nukleových kyselín sa dá nájsť v baktériách, kvasinkách a hubách, pretože rýchlo rastú do vysokej hustoty. Preto, príjem DNA a RNA v strave závisí na pôvode stravy a ďalej na spôsoboch spracovania. Príjem v potrave sa líši medzi jednotlivcami, ale typicky je v rozsahu 0,1-1 g/osoba/deň. [5]

2.1.1 Stabilita nukleových kyselín

Ako nositeľka genetickej informácie makromolekula DNA preukazuje pomerne vysokú chemickú stabilitu.

Neenzymatická hydrolýza nukleových kyselín prebieha spontánne, ale nie veľmi rýchlo. Rozkladu v roztoku je RNA viac prístupná ako DNA, pretože prítomnosť C2-hydroxylovej skupiny ribózy, fosfodiesterové väzby RNA molekúl sú náchylné na hydrolýzu, najmä v prítomnosti dvojmocných katiónov. Miera hydrolýzy väzieb medzi bázou a sacharidom ribonukleozidov je omnoho menšia ako u deoxyribonukleozidov. Avšak oproti odolnosti fosfodiesterových väzieb (získaná odstránením 2'-OH skupiny cukru) je N-glykozylová väzba nestabilná. Za podmienok nízkeho pH depurinácia kostry nukleovej kyseliny je prvým krokom degradácie DNA nasledovaná hydrolýzou príľahlých 3',5-fosfodiesterových väzieb, čím vzniká skracovanie DNA reťazcov. Táto reakcia je urýchľovaná pri vyššej reakčnej teplote. Navyše prirodzená nestabilita glykozylových väzieb, zvyšky DNA báz sú náchylné na hydrolytickú deamináciu. Cytosín a jeho homológ 5-metylcytosín sú hlavné ciele tejto reakcie.

Nehydrolytické reakcie môžu viesť k mutagénnemu poškodeniu a sú významné pre funkčnú integritu DNA. Aeróbne rastúce bunky sú vystavené aktívnemu kyslíku počas metabolizmu, čo môže spôsobiť endogénne poškodenie DNA. Mutagénnym poškodením sa vytvorí hydroxylový radikál 8-hydroxyguanín, ktorý sa prednostne páruje s A ako s C. Okrem kyslíku, živé bunky obsahujú niekoľko ďalších malých reaktívnych molekúl, ktoré môžu spôsobiť poškodenie DNA a vystupujú ako endogénne genotoxíny. [5]

2.2 Degradácia DNA pri spracovaní surovín

Dvojzávitnica nukleových kyselín je nestabilná a pri teplote medzi 60-90 °C alebo pri alkalickom pH (>12) sa topí a vytvára sa z nej jednovláknová DNA. Po znížení teploty či pH, vodíkové väzby môžu byť obnovené. Počiatočné topenie dvojláknovej štruktúry môže byť nasledované fragmentáciou vyznačujúcou sa odstránením bočných valencií a stratou pôvodnej konformácie. Kyslé pH depurinuje DNA a vedie k štiepeniu reťazcov. UV svetlo vyvoláva tvorbu pirimidínových dimérov. Fragmentácia môže byť tiež spôsobená mechanickým spracovaním (strižné sily), enzymatickým spracovaním (nukleázy), chemickou hydrolýzou a ionizujúcim žiarením. [5]

Podmienky pri spracovaní potravín sú dôležitým faktorom, ktorý priamo vplýva na degradáciu DNA. Napríklad pri mechanickom strese, vysokej teplote, rozličnom pH, enzymatickej aktivite môže dôjsť k hydrolýze, oxidácii alebo deaminácii DNA. Technologická

úprava potravín zvyšuje homogenitu potravín, avšak znehodnocuje prítomnú DNA vo vzorke, čím redukuje citlivosť analýzy, detekčný a kvantifikačný výsledok metódy PCR. Tým sa zhoršuje použiteľnosť PCR pre detekciu a kvantifikáciu napr. geneticky modifikovaných organizmov. [4]

Údaje o interakciách zložiek potravín s DNA maticou sú až doteraz známe a zverejnené len v obmedzenom počte, ukázalo sa ale, že ovplyvňujú degradáciu DNA. Interakcia zložiek potravín s nukleovou kyselinou môže mať za následok zvýšenú degradáciu alebo ochranu DNA. Napríklad bola sledovaná enzymatická degradácia klobásky a boli pozorované ochranné účinky matrice mäsa na DNA. Okrem toho adsorpcia DNA na častice v pôde má za následok menšiu náchylnosť k degradácii než v roztoku. Taktiež boli identifikované polyamíny ako je spermin, ktoré vykazujú ochranné účinky na DNA proti žiareniu. [6]

2.3 Metódy spracovania potravín

Existujú rôzne techniky spracovania pre rastlinné a živočíšne suroviny, ktorými chcú výrobcovia dosiahnuť správne vlastnosti výrobkov ako je kvalita, trvanlivosť, farba, čistota, odstránenie mikrobiologickej aktivity a mnoho iných. Príslušné metódy sú hlavne založené na fyzikálnych, chemických a biologických postupoch. Ďalej sa budem zaoberať najčastejšími faktormi, ktoré majú vplyv na citlivosť DNA pri spracovaní potravín. Faktory potravinárskeho reťazca uvedené v Tabuľke 1, najčastejšie ovplyvňujú degradáciu DNA. [7]

Tabuľka 1: Faktory ovplyvňujúce celistvosť DNA molekúl v prostredí a v potravinách [7]

Faktor (pôsobenie)	Význam v potravinách	Miesto pôsobenia na DNA
Strižné sily	premenlivé podľa obtiažnosti spracovania potravín	cukor-fosfátová kostra (zlomy dvojlákiev)
Enzýmy	DNázy, vysoké množstvo v potravinách pochádzajúce z rastlinných alebo živočíšnych tkanív	cukor-fosfátová kostra, nukleotidy (modifikácia, hydrolýza)
pH	väčšina potravín má neutrálne pH alebo slabo kyslé- slabý efekt, pri spracovaní sa pH mení 1-12 - silný efekt	väzby medzi bázou a cukrom pri nízkom pH (hydrolýza) s druhotným efektom na cukor-fosfátovú kostru (zlom reťazcov), bázy (deaminácia)
Teplota	ak sú potraviny podrobené teplotnému procesu (> 80°C) - silný efekt	denaturácia DNA, hydrolyzačné a deaminačné reakcie
Vodná aktivita	nízka v sušených potravinách; vysoká pri vysokej vodnej aktivite	všetky reakcie vedú k poškodeniu
Chemické činidlá (napr. reaktívny kyslík, dusitaný, alkylačné činidlá)	čiastočne vysoké, keď SO ₂ je použitý ako aditívne činidlo alebo pri skladovaní na vzduchu	nukleotidy (chemické modifikácie, strata báz)
Ochranné interakcie	v určitých potravinových maticiach veľmi dôležité, rôzne vplyvy prostredníctvom adsorpcie DNA na častice, interakcia s polyamínmi...	ochrana proti rozličným poškodzujúcim faktorom zahrňujúce strižné sily, enzýmy, teplo...

2.3.1 Teplota

Je známe, že zvýšenou teplotou dochádza k denaturácií, teda k vratnému rozrušeniu sekundárnej štruktúry vlákna DNA. Teplota nad 100 °C významne ovplyvňuje vlákna DNA a dochádza k ireverzibilnej strate sekundárnej štruktúry. Táto deštrukcia je sprevádzaná depurináciou alebo deamináciou. DNA je zdegradovaná na menšie fragmenty, čím sa zredukuje citlivosť PCR. Avšak teplota použitá pri procesoch ako je konzervovanie alebo autoklávovanie pri 121 °C po dobu 15 minút nezničí celú DNA, ktorá zostáva dostupná pre PCR. K procesom, ktorými dochádza k degradácií DNA prostredníctvom teploty patrí varenie, pečenie, sušenie, praženie, vyprážanie a autoklávovanie. [4]

Pečenie a varenie hovädzieho, bravčového a kuracieho mäsa má za následok zníženie detekcie počtu kópií špecifických génov. Záleží na dobe a stupni zahrievania, čo ovplyvňuje výsledok následnej analýzy. Cieľová DNA hovädzích a bravčových vzoriek pečených pri 200 °C >30 min a >50 min nemohla byť použitá v PCR, zatiaľ čo pre kuracie mäso pečené 50 min mohla byť izolovaná DNA amplifikovateľná a kvantifikovateľná prostredníctvom qPCR. Ďalej napríklad boli mäsové produkty varené od 10 – 240 min, tento proces spôsobil postupný pokles amplifikácie (zníženie hodnoty Ct) DNA paralelne s prírastkom počas doby varenia. Napríklad, varením hovädziny, bravčoviny a hydiny 240 min na 99 °C, sa znížila hodnota Ct na 0,21 %, 0,41 % a 0,67 %. To, že 374 bp amplikony hovädzieho mäsa pečené >30 min na 200 °C nemohli byť amplifikované, zatiaľ čo 290 bp amplikony bravčového pečené 50 min boli amplifikované v PCR v reálnom čase, naznačuje, že zahrievanie ovplyvňuje fragmentáciu a nakoniec amplifikáciu DNA. [8]

2.3.2 Vplyv pH

Potraviny majú svoje charakteristické pH a zmenou ich optimálneho pH dochádza k porušeniu štruktúry DNA. Efekt pH je čiastočne obmedzený jadrovou membránou, ktorá chráni DNA proti rozštiepeniu. Stanovenie templátovej DNA po predĺženej inkubácii v roztoku pri nízkom pH ukázalo, že po počiatkovej lýze bunky a predbežnej deštrukcii DNA, enzýmy zodpovedné za degradáciu (endonukleázy) sú zničené rýchlejšie ako samotná DNA a nedochádza k ďalšiemu štiepeniu. Nízke (kyslé) pH spôsobuje depurináciu DNA a vedie k následnému zlomu a rozpleteniu vlákna. Na druhej strane pri vyššom (alkalickom) pH je stabilita DNA relatívne dobrá. [4]

Počas silážovania kukurice sa prirodzene znižuje hodnota pH. Pri produkcii krmiva bolo preukázané, že DNA bola degradovaná počas silážovania *Bt-176* kukurice (pH 3,9 – 4,1) a fragmenty o veľkosti 1 914 bp po 106-tich dňoch nebolo možné detegovať. [9] Avšak, rozrušenie DNA počas silážovania nemôže byť prisudzované iba postupnej redukcii pH, ale tiež činnosti rastlinných endonukleáz a/alebo exogénnych nukleáz mikroflóry. [4]

Bolo preukázané, že väčšia degradácia DNA sa prejaví, ak bude použitá kombinácia viacerých metód spracovania. Napríklad 1 225 bp dlhé DNA fragmenty z kukurice *Bt-176* neboli amplifikované po 30-tich minútach inkubácie v roztoku o pH 4 a teplote 65 °C. [2]

2.3.3 Fermentácia

Silná deštrukcia DNA bola pozorovaná aj v prípade fermentačných procesov, čo sa vysvetľuje štiepením vlákna DNA enzýmom DNázou, pochádzajúcou z mikroorganizmov. [4]

Pri zisťovaní transgénnych súčastí v miso (fermentovaný výrobok zo sóje), bol zistený postupný pokles transgénnych zložiek až do 120. dňa fermentácie a od tohto bodu 35S promótor nemohol byť detegovaný. Pri dokončení fermentácie miso, čo je okolo 5-6 mesiacov, väčšina DNA vlákien bola degradovaných na 200 bp alebo kratšie, ale 95 bp amplikónmi môže byť úspešne zistená v miso použitím konvenčnej PCR a hniezdovej PCR. Rovnaké problémy v získavaní pozitívnych PCR výsledkov boli pozorované pri produkcii sufu, fermentovaný tofu produkt. Aby bola amplifikácia možná, musela byť použitá hniezdová PCR. Okrem toho, v kvasených sójových produktoch natto (kvasené sójové bôby) počas fermentačných procesov bola degradovaná genómová DNA. [4]

2.3.4 Mechanická úprava

Pri narábaní so surovými materiálmi, strižné sily môžu byť jedny z prvých faktorov spôsobujúce DNA fragmentáciu. Pri mechanickom spracovaní sa používajú postupy ako mletie, miešanie, rezanie, lisovanie. Tieto procesy sa taktiež vyskytujú pri extrakcii a purifikácii, napríklad pri centrifugácii, nasávaní, filtrácii, pipetovaní, plnení vialiek a spôsobujú zreteľnú degradáciu DNA. [4]

Počas silážovania nedochádza len k degradácii vďaka už zmienenej zmene pH, ale aj vďaka mechanickému spracovaniu, ako je sekание celých kukuričných rastlín. Predpokladá sa, že počas sekania je DNA uvoľnená a stáva sa ľahko dostupnou pre nukleázy. Navyše znižovanie pH, ako výsledok fermentácie a produkcie kyseliny mliečnej urýchľuje proces degradácie. Detekcia transgéennej *Bt*-kukurice pomocou PCR s tvorbou amplikónov o veľkosti 1 914 bp bola možná počas prvých piatich dní silážovania. [9]

Najdôležitejším krokom vo výrobe čokolády je proces konšovania, kedy je čokoláda zahriata na niekoľko hodín v nádobách, v ktorých zároveň prebieha rozotieranie (hnetenie) čokolády pri teplote 55 – 105 °C. Kakaová hmota, ktorá je použitá na lisovanie je často získaná z alkalizovanej kakaovej drviny. Detekcia rastlinnej DNA pomocou PCR ukázala priamu spojitosť s dĺžkou amplifikovaných fragmentov a významnou degradáciou DNA počas produkcie čokolády, čo môže mať vplyv na stanovenie sójového lecitínu. [10]

2.3.5 Enzymatická degradácia

Tento typ fragmentácie bol pozorovaný pri silážovaní, kysnutí cesta, skladovaní potravín dokonca pri rezaní rastlinných tkanív, pri ktorom sa narušia bunkové steny a membrány, dôjde k uvoľneniu DNA a enzýmov z bunky, čo ovplyvní degradáciu nukleovej kyseliny [4]. Na druhej strane, bolo dokázané, že aj pri vysokej koncentrácii DNázyI, niektoré DNA fragmenty zostávajú nerozložené enzýmami. Zdá sa, že spracovanie surovín s vysokým obsahom enzýmov redukuje hydrolýzu DNA, pravdepodobne inhibíciou enzymovej aktivity pri vysokej koncentrácii DNázyI. [3]

Ďalším príkladom je eliminácia nukleových kyselín počas výroby cukru, keď prítomnosť DNA bola analyzovaná pomocou PCR v medziproduktov a konečných produktoch. Hybridizácia cieľovej sekvencie priniesla pozitívne výsledky vo vzorkách získaných zo šťavy, ale nie z uhličitanových usadenín (kalov), zriedených a koncentrovaných štiav alebo bieleho cukru získaného z transgéennej cukrovej repy. Tieto výsledky odhalili vážnu degradáciu nukleových kyselín už v prvom kroku spracovania. Poškodenie DNA bolo pripísané enzymovej aktivite endonukleáz cukrovej repy, ako tiež nevratnej adsorpcií na usadeninu, zrážaniu, hydrolýze kvôli vysokej teplote počas odparovania a tiež v dôsledku vylúčenia DNA počas kryštalizácie sacharózy. [4]

2.3.6 Extrakcia oleja a rafinovanie

Počas rafinovania vysoká teplota, kyslé pH a adsorpcia redukujú obsah DNA v oleji. V niektorých prípadoch bolo preukázané, že pri prečistení je odstránená DNA z olejovej fázy, čo znemožňuje jej amplifikáciu (identifikáciu). [4]

Efekt rafinovania olejov na deštrukciu DNA bol študovaný na oleji získaného zo sóje, z repky a z kukurice. V repkovom oleji lisovanom za studena, boli stanovené fragmenty PCR veľké až 350 bp. Dokázalo sa tiež, že pokiaľ je surový sójový olej centrifugovaný pri 14 000 g po dobu 15 minút úroveň DNA je zredukovaná, ale môže byť stále preukázaná. U vzoriek odobraných v rôznych fázach pri rafinovaní sójového oleja, bolo preukázané, že najmä pri odslizovaní oleja je odstránená DNA z olejovej fázy a amplifikácia v rafinovanom oleji je tak nemožná. [4]

2.3.7 Ďalšie procesy

Medzi ďalšie procesy, pri ktorých bola pozorovaná fragmentácia nukleových kyselín patrí ožiarenie a ultrazvuk. Žiarenie vplyva na potraviny počas ich skladovania, ako aj pri technologickom spracovaní. Poškodenie DNA rastie s rastúcimi dávkami ožiarenia, napriek tomu je stále možná detekcia GMO. Pri vystavení vzorky ultrazvuku je DNA degradovaná, ale amplifikácia je stále možná v PCR v reálnom čase, dokonca aj po ôsmich hodinách. Efektívnosť degradácie ultrazvukom sa teda znižuje s časom. [4]

Ožiareníím geneticky modifikovaných sójových bôbov až 1 000 Gy, vzrástla deštrukcia DNA s rastúcimi dávkami radiácie, ale geneticky modifikované organizmy boli rozpoznané vďaka 35S promotoru vzoriek sójových bôbov. Vyššie dávky ožiarenia ako 10, 25 a 50 kGy boli použité na produkty vyrábané zo zemiakov. DNA bola zrejme degradovaná pri 10 kGy, pretože amplifikácia 325 bp fragmentov zlyhala pre niektoré vzorky. [4]

2.4 Metódy analýzy DNA

Na vyhodnotenie vplyvu technologických podmienok používaných pri spracovaní potravín na degradáciu DNA sú najčastejšie používané molekulárne biologické metódy: konvenčná PCR a PCR v reálnom čase, niekedy je využívaná hniezdová PCR a kvantitatívno-kompetitívna polymerázová reťazová reakcia. [4] Hlavná nevýhoda metód kvantifikácie DNA v rôznych druhoch potravín vyplýva z variability koncentrácie DNA, čo závisí na druhu a type tkaniva prítomného vo vzorke. Pokiaľ ide o mäsitý produkt, tak rovnaké množstvo hovädzej a bravčovej chudej svaloviny nemusí obsahovať rovnaký počet buniek a teda aj kópií cieľovej DNA. [3]

2.4.1 Extrakcia DNA

Dôležitým krokom k získaniu DNA vhodnej kvality a čistoty je extrakčná metóda. Prvou úlohou je príprava vzorky, ktorá zahŕňa jej homogenizáciu, čím získame reprezentatívnu vzorku. Vzorky sa rozlišujú na homogénne a heterogénne. Pre heterogénne potravinové produkty zaručiť dostatočnou homogenizáciou správnu reprezentatívnu vzorku je čiastočne kritické, pretože výrobky obsahujú niekoľko ingrediencií s rozličnými vlastnosťami. Následne sa vyberie najvhodnejšia metóda pre získanie DNA. Mnoho metód pre analýzu GMO v potravinách rastlinného pôvodu sa zakladá na zrážaní DNA použitím cetyltrimetylammónia bromidu (CTAB). Ďalšie metódy sú založené na izolácii DNA živicom, magnetickými časticami, balenými sklenenými vláknami a mnoho iných. Jednotlivé postupy sa odlišujú a je veľmi dôležité zvážiť pre akú metódu sa rozhodneme, obzvlášť pri analýze vysoko

spracovávaných potravín, kde je rôzny stupeň degradácie DNA a tiež prítomnosť inhibítorov PCR. Príslušná metóda DNA izolácie môže byť vyhodnotená najčastejšie agarózovou gélovou elektroforézou, UV spektrofotometriou, meraním fluorescencie a rôznymi polymerázovými reťazovými reakciami.

Extrakčná účinnosť je ovplyvnená distribúciou rôzne veľkých častíc z bunkových fragmentov, prítomnosťou chemikálií vo vzorke, fyzikálno-chemickými zmenami počas spracovania, ako aj samotnou technológiou spracovania, enzýmovou hydrolýzou a dĺžkou DNA, ktorá má byť extrahovaná. [4]

2.4.2 Agarózová gélová elektroforéza

Princíp metódy je založený na putovaní záporne nabitých fragmentov DNA v elektrickom poli. DNA je možné na géle detegovať napr. pomocou interkalačného farbiva ethidium bromid. Agarózová gélová elektroforéza je vhodná pre porovnanie degradácie v spracovaných a v surových vzorkách, vo vzorkách odobraných počas spracovania alebo na porovnanie množstva DNA z rôznych extrakčných metód. Ak k analýze použijeme vzorku, v ktorej nie je DNA degradovaná, napríklad u nespracovaných potravín, bude pozorovaná vysokomolekulárna DNA ako diskretný pás (band), u spracovaných surovín s degradovanou DNA je DNA vizualizovaná ako šmuha fragmentov o menšej molekulovej hmotnosti DNA. Pre intaktnosť DNA môžu byť použité nasledujúce údaje: vysoká (>20 kbp alebo nespracovaná), stredná (20-0,5 kbp), nízka (500-100 bp), veľmi nízka (<100 bp) molekulová váha DNA. Výsledok sa vyhodnocuje z obrázka gélovej elektroforézy, teda je ovplyvnený subjektívnym názorom analytika. [4]

2.4.3 UV spektrofotometria a fluorescenčná spektrofotometria

Obidve metódy je možné použiť pre stanovenie koncentrácie izolovanej DNA v roztoku. Viac využívaným postupom je UV spektrofotometria, najmä pokiaľ ide o vyhodnotenie extrakčných metód. Spektrofotometrická analýza využíva UV adsorpciu pri vlnovej dĺžke 260 nm. Výsledok ukazuje celkový obsah nukleových kyselín, ale je ovplyvnený čistotou vzorky a množstvom prítomnej DNA. K analýze je obvykle potreba 2,5 - 5,0 µg DNA. Táto metóda však nerozlišuje medzi DNA a RNA a neukazuje fragmentáciu DNA. Z tohto dôvodu je ako alternatíva k UV používaná fluorescenčná spektrofotometria, ktorá dokáže kvantifikovať DNA na základe interakcie fluorescenčných farbív, ako sú PicoGreen, Hoechst farbivá a SYBRGreen s DNA. Tieto farbivá sa výlučne viažu len na dvojvláknovú DNA, z čoho vyplýva, že jednovláknová DNA alebo RNA nie je touto analýzou stanoviteľná. Výsledky sú však závislé na percente A a T, pH a na prítomnosti nečistôt ako sú soli alebo organické rozpúšťadlá. [4]

2.4.4 Hodnotenie kvality izolovanej DNA

Správna účinnosť metódy polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) závisí hlavne na kvalite DNA izolovanej z potravín, či už spracovaných alebo nespracovaných (surových), rastlinného alebo živočíšneho pôvodu. Kvalita DNA je určená stupňom poškodenia, čo je podstatne ovplyvnené technologickým spracovaním vzorky a podľa toho usudzujeme akú konkrétnu extrakčnú metódu použijeme.

Čistotu DNA (čo má priamy dopad na amplifikáciu) ovplyvňujú najrôznejšie kontaminanty v potravinových matriciach. Kontaminanty môžu pochádzať zo skúmaného materiálu, ako

napríklad proteíny, polysacharidy, tuky. Tiež to môžu byť chemikálie použité počas extrakcie – fenol, chloroform, etanol. Z tohto dôvodu si vyberáme taký extrakčný proces, ktorý eliminuje potenciálne inhibítory a prítomné nežiaduce látky. [4] Čistota extrahovanej DNA môže byť hodnotená spektrofotometrickým meraním pri rôznych vlnových dĺžkach, pokiaľ je adsorpčný pomer $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ medzi 1,8 - 2,0 a A_{260}/A_{230} viac ako 1,7 extrahovaná DNA je v kvalite vhodnej pre PCR. [11] Kvantita DNA by mala byť v rozsahu 20 pg až 200 ng. V prípade, že je amplifikácia neúčinná, množstvo templátovej DNA v PCR sa môže zvýšiť, avšak ak je na začiatku PCR metódy použitej príliš mnoho DNA, efektívnosť PCR môže byť zredukovaná. [4]

2.5 Konvenčná PCR

Polymerázová reťazová reakcia sa stala jednou z najviac využívaných techník v molekulárnej biológii.

PCR pozostáva z troch cyklicky sa opakujúcich krokov:

- **Denaturácia:** Zvýšením reakčnej teploty na 95 °C sa porušia vodíkové väzby medzi komplementárnymi bázami nukleových kyselín, teda dvojvláknové DNA (dsDNA) sa rozpletú a vznikajú jednovláknové DNA (ssDNA).
- **Hybridizácia:** Priméry sa pripoja k templátu (ssDNA). Teplota tohto kroku sa zníži asi o 5 °C pod teplotu topenia priméru naviazaného na cieľovú DNA, zvyčajne je to 45-65°C.
- **Syntéza nového reťazca DNA:** Teplota je zvýšená na 72 °C, čo predstavuje teplotné optimum pre aktivitu DNA-polymerázy, ktorá syntetizuje nové vlákno DNA komplementárne k pôvodnej molekule [12].

Zložky vyžadované pre reakčnú zmes PCR:

- Templát DNA (matrica) – slúži ako matrica pre syntézu nových komplementárných reťazcov DNA. Účinnosť amplifikácie je ovplyvnená kvalitou matricovej DNA.
- Priméry – synteticky pripravené oligonukleotidy. Templátová DNA obsahuje cieľové miesta pre väzbu primérov, ktoré musia byť komplementárne. Vzájomne by priméry nemali byť komplementárne, aby nedochádzalo k vzniku dimérov primérov.
- DNA polymeráza – syntetizuje nové reťazce vybraných úsekov dvojreťazcovej DNA v smere 5'⇒3'. V súčasnej dobe sa využívajú termostabilné polymerázy izolované z termofilných mikroorganizmov ako je baktéria *Thermus aquaticus*, príslušná polymeráza tejto baktérie sa nazýva *Taq* DNA polymeráza.
- dNTP (2'-deoxynukleozid-5'-trifosfát) – základné stavebné zložky pre tvorbu nového vlákna DNA. Radíme sem dATP, dCTP, dGTP, dTTP.
- Mg²⁺ ióny – sú potrebné ako kofaktory pre aktivitu DNA polymerázy. Vytvárajú komplexy s dNTP, primérmí a DNA templátmi, preto je nutné optimalizovať koncentráciu Mg²⁺ iónov v reakčnej zmesi.
- Voda pre PCR – doplní reakčnú zmes na požadovaný objem.

- Pufor prePCR – zabezpečí správny priebeh reakcie, pretože vytvára optimálne prostredie pre DNA polymerázu.

Konvenčná PCR je citlivá, umožňujúca za optimalizovaných podmienok detegovať jedinú cieľovú molekulu DNA na reakciu v typickom objeme 25-50 µl. Takáto neobyčajná citlivosť PCR metódy môže však viesť k detekcií náhodných kontaminantov. [11] Čas analýzy je ale príliš dlhý, systém nie je automatizovaný a riziko kontaminácie je vyššie. Navyše je to analýza nasledovaná agarózovou gélovou elektroforézou amplikónov, takže množstvo DNA v amplikónoch nemusí odpovedať počiatkovej koncentrácii cieľových molekúl DNA. [4]

2.6 PCR v reálnom čase (Real-Time PCR)

Metóda polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase (real-time polymerase chain reaction, RT-PCR) nazývaná tiež kvantifikačná PCR (quantitative polymerase chain reaction, qPCR). RT-PCR dovoľuje používateľovi v reálnom čase monitorovať produkciu amplikónov a kvantifikovať vzorky v skoršom stupni analýzy. Kvantifikácia v skoršom štádiu je viac presná ako analýza po ukončení amplifikácie (endpoint analýza), prirodzene spojená s analýzou na agarózovom géle. Dáta v reálnom čase sú dosiahnuté fluorescenčnými molekulami, ktoré umožňujú koreláciu medzi intenzitou fluorescencie a koncentráciou PCR produktu. [8]

V prípade RT-PCR komponenty pre tento druh PCR sú zhodné s konvenčnou PCR. Môže byť pridaná ďalšia zložka do reakcie, takzvaná sonda. Je to krátky úsek jednovláknovej DNA, obvykle 30 báz dlhý, komplementárny k cieľovej oblasti medzi dvoma primermi. Fluórochróm, chemicky spojený s prôbou je kľúčový bod pre tento druh analýzy: počas každého cyklu amplifikácie je emitovaný fluorescenčný signál, ktorý je meraný inštrumentálne. Takýto signál je úmerný množstvu DNA práve v tom čase, umožňujúci operátorovi sledovať reakčnú kinetiku. [13]

Citlivosť analýzy môže byť ovplyvnená výberom, koncentráciou reakčných zložiek a použitou chémiou, keďže emitovaný fluorescenčný signál sa meria. Je známych niekoľko typov: farbivo SYBR Green I, hybridizačná sonda FRET („*fluorescence resonance energy transfer*“), hydrolytické sondy, ako TaqMan, molekulárne majáky a Scorpion próby. [4] Najčastejšie využívanou technológiou je TaqMan. [14] Odhaduje sa, že na spoľahlivú detekciu je potrebných desať cieľových kópií, keďže aspoň 40 cieľových kópií sa vyžaduje pre presnú kvantifikáciu tohto cieľa použitím qPCR. [4]

qPCR je vhodná pre vyhodnotenie degradácie DNA v spracovaných surovinách, ako tiež účinnosti extrakčnej metódy, pretože testy sú zamerané na cieľové molekuly v rozmedzí 80-150 bp. Hlavnou výhodou je vysoká citlivosť, špecifita, reprodukovateľnosť získaných výsledkov, možnosť kvantifikácie kópií génov, menej prácna a nevyžaduje si už žiadne manipulácie po skončení PCR [4]. Bolo zistené, že na rozdiel od konvenčnej PCR, pomocou qPCR sme schopní rozlíšiť a zmerať dokonca stopové množstvo DNA rozdielnych zvieracích druhov v potravinách. Takéto stanovenie druhu a kvantifikácia môže byť ovplyvnená trvaním tepelného spracovania výrobku, teplotou a veľkosťou DNA fragmentu, ktorý má byť amplifikovaný. [8] Vo veľmi prečistených matriciach/potravinách, v mnohých prípadoch je celkový počet DNA kópií príliš malý, občas blízky samotnému limitu detekcie. Bolo poukázané na to, že, v mnohých matriciach je DNA degradovaná a dĺžka fragmentov je tak krátka, že nemôžu byť amplifikované a zistené dokonca, keď sa použijú krátke amplikóny (napr. 70 bp). Následne by DNA teda mala byť extrahovaná z veľkého množstva (kilogramy v mnohých prípadoch) vzorky matrice, aby bola zaistená rozumná kvantifikácia. [13]

Taktiež extrakčná metóda môže mať výrazný efekt na účinok qPCR. Zakladá sa to na predpoklade, že krátke fragmenty DNA sa nezrážajú tak jednoducho ako dlhé fragmenty. To má za následok, že malé DNA fragmenty nemusia byť extrahované s rovnakou účinnosťou ako veľké templátové molekuly, najmä extrakčnými technikami, v ktorých je stratégia založená na zrážaní DNA. [8]

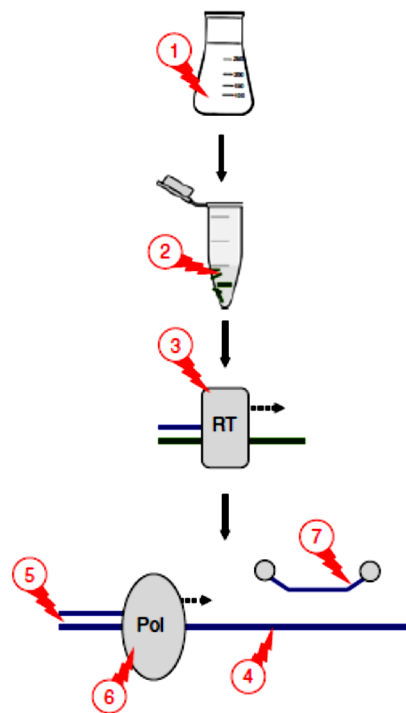
2.6.1 Inhibítory PCR

Priebeh PCR môže byť negatívne ovplyvnený (inhibovaný) látkami, ktoré môžu byť prítomné v analyzovanej vzorke. Tento problém spravidla nastáva pri analýze reálnych vzoriek. Najčastejšie sú inhibítory súčasťou skúmaných vzoriek alebo sú zavedené počas práce so vzorkami alebo počas extrakcie nukleovej kyseliny. Hlavným dôsledkom čiastočnej alebo až úplnej inhibície PCR je zníženie citlivosti, poprípade navodenie falošne negatívnych výsledkov. [15]

Inhibítory PCR sú veľmi heterogénna skupina chemických látok. Mechanizmus pôsobenia inhibítorov PCR môže byť rôzny a inhibítory môžu zasahovať v rôznych krokoch PCR analýzy, ako je možné vidieť na Obrázku 1. PCR komponenty, obzvlášť DNA môžu interferovať s polymérnymi povrchmi. Nukleázy môžu degradovať DNA alebo RNA, polysacharidy môžu redukovať objem pri resuspendovaní vyzrážanej RNA, reverzná transkripcia môže byť inhibovaná napríklad priamou interakciou enzýmu s melanínom. Hybridizácia primérov s DNA templátmi môže byť narušená určitými inhibítormi PCR, tento efekt je spôsobený kompetitívnym viazaním inhibítora do templátu. Preto vhodným výberom templátu s vyšším bodom topenia môžeme predísť takémuto problému. Pre PCR v reálnom čase interferencia s fluorescenčnými próbami alebo zvýšenie pozadia fluorescence je ďalším možným mechanizmom reakcie inhibítorov znižujúcich citlivosť reakcie. [15]

V potravinách bolo identifikovaných mnoho odlišných inhibítorov PCR ako tuky, glykogén, minerály, enzýmy. V mliečnych výrobkoch je inhibícia hlavne závislá na koncentrácií vápnika, zatiaľ čo obsah tuku vyzerá, že má len malý vplyv na účinnosť amplifikácie. Navyše, plazmín, prirodzene sa vyskytujúci v mlieku bol identifikovaný ako inhibítor, ktorý degraduje Taq polymerázu. Rastliny obsahujú látky ako polysacharidy, polyfenoly, pektín a xylán, ktoré môžu byť extrahované spolu s nukleovou kyselinou a následne môžu brzdiť PCR. Avšak pre väčšinu polysacharidov (dextrán, inulín, pektín alebo škrob) nebol zistený inhibičný efekt. [15]

Doteraz bola navrhnutá rada metód pre odstránenie inhibítorov alebo pre redukciiu ich efektu. Spravidla, efekt inhibítorov môže byť redukovaný vhodným výberom metódy pre spracovanie vzorky a extrakciu nukleovej kyseliny, voľbou viac odolnej DNA polymerázy alebo použitím špecifických PCR aditív. [16] Jedna z efektívnych stratégií je napríklad fenol-chloroformová extrakcia pre odstránenie inhibičných proteínov a lipidov. Táto metóda je však práca, časovo náročná a nemožno ju automatizovať (čo je nevýhodné pri analýze veľkého množstva vzoriek). Potvrdilo sa, že tieto metódy sú viac vhodné ako gélová filtrácia, úprava s proteinázou K alebo tepelná úprava. Pri použití magnetických častíc oxidu kremičitého (a aj iných typov magnetických mikročastíc) pre izoláciu nukleovej kyseliny sa preukázalo, že dokážu účinne odstrániť širokú škálu inhibítorov PCR. Avšak, účinnosť je vo veľkej miere závislá na použitej matici. [15]



Obrázok 1: Miesto pôsobenia PCR inhibítorov počas prípravy vzorky a PCR: nukleové kyseliny môžu interferovať s povrchom nádoby (1), látky môžu reagovať s nukleovými kyselinami (2), ďalšie látky inhibujú reverznú transkripciu (3) a degradujú alebo modifikujú templátovú DNA (4), hybridizácia primérov s templátom môže byť zabrzdená (5) alebo DNA polymeráza je degradovaná, inhibovaná alebo zmenená (6), látky môžu interferovať s väzbou sondy alebo s fluóroformi.

2.7 Vplyv spracovaných surovín na amplifikáciu v PCR

PCR je využívaná ako hlavný analytický nástroj na štúdium degradácie DNA pre geneticky modifikované potraviny. Zvyčajne sa používa ako test kvality, súdiac podľa toho, či je označený, cieľový gén prítomný alebo nie. [4]

Na posúdenie efektu degradácie DNA v spracovaných surovinách sa najčastejšie využívajú rozličné testy PCR, ktorými je možné amplifikovať rovnaký gén, ale výsledkom bude, že amplikóny budú mať rozličnú dĺžku. Do úvahy je treba brať aj ten fakt, že dlhšie fragmenty nukleových kyselín sú náchylnejšie na degradáciu ako kratšie fragmenty a rozhodujúca je tiež voľba cieľových génov. Použitím viacnásobných kópií cieľových DNA dosiahneme citlivejšie testy, ale má to vplyv na kvantitu DNA, práve vďaka zmenám v počte kópií cieľových DNA. Preto by sa mala dať prednosť detekciám jednokópiových génov. Faktory, ktoré vplyvajú na citlivosť jednotlivých PCR analýz sú: sekvencia primérov, koncentrácia a typ reagentov, počet cyklov PCR, už zmienená dĺžka amplikónu a množstvo DNA. [4]

2.8 Identifikácia a kvantifikácia DNA v mliečnych produktoch

Identifikácia mlieka pomocou amplifikácie DNA je založená na prítomnosti cicavčích somatických buniek v mlieku. Niekoľko postupov využívajúcich PCR bolo navrhnutých pre druhovú identifikáciu v mlieku, v syre a jogurte s využitím primérov navrhnutých pre amplifikáciu množstva mitochondriálnych génov: cytochróm b, oblasť D slučky, 12S

ribozomálnych RNA génov, cytochromoxidáza II, cytochromoxidáza I a jadrové kódujúce gény. [17]

Ďalšou možnosťou, pri ktorej sa využíva kvantifikácia pomocou PCR, je kvantifikácia baktérií mliečneho kvasenia v produktoch fermentovaného mlieka. Napriek vývoju selektívnych kultivačných médií, identifikácia a výpočet BMK v mliečnych produktoch použitím postupov závislých na kultivácii je stále problematické. K dosiahnutiu rýchlej identifikácie a kvantifikácie baktérií mliečneho kvasenia v komplexných mikrobiologických ekosystémoch bez ich predchádzajúcej izolácie sú vhodné metódy PCR. [18]

2.9 Identifikácia zložiek spracovaných potravín

Bezpečnosť potravín, kvalita a zloženie sa stali predmetom zvyšujúceho sa verejného záujmu, napríklad aj preto, lebo množstvo ľudí je stále viac alergických na špecifické molekuly vyskytujúce sa v potravinách ako mäso, mlieko alebo syry. Presná detekcia a kvantifikácia zložiek potravy sa vyžaduje pre presadzovanie správnych postupov označovania potravín, zabráneniu kontaminácie potravín, chybnému popisu a ich falšovaniu, hlavne z ekonomických dôvodov. Dokázať presvedčivo, že došlo k falšovaniu alebo ku kontaminácii vyžaduje detekciu a kvantifikáciu zložiek potravín, čo môže byť náročné, pretože nahradzované zložky sú často biochemicky veľmi podobné a potravinové matrice sú extrémne komplexné a variabilné.

Metódy založené na identifikácii lipidov, proteínov a DNA boli zavedené pre potravinovú identifikáciu. Analýza lipidov je použiteľná iba pre hrubé meranie živočíšnych tukov. Metódy na báze bielkovín ako vysoko účinná kvapalinová chromatografia alebo izoelektrická fokusácia sú účelné hlavne pre nespracované produkty a neumožňujú druhovú identifikáciu. Rôzne metódy využívajúce DNA zahrňujúce najčastejšie amplifikáciu polymerázovou reťazovou reakciou boli úspešne prispôbosené pre detekciu nahradzovania potravinových zložiek.

3 CIEĽ PRÁCE

Teoretická časť je zameraná na štúdium degradácie DNA, vplyv spracovania potravinových produktov a jej vplyvu na amplifikáciu DNA.

Praktická časť je zameraná na izoláciu DNA z tepelne spracovaného mliečneho výrobku pomocou fenolovej extrakcie a dvoch typov magnetických nosičov a na jej amplifikáciu pomocou PCR.

4 EXPERIMENTÁNA ČASŤ

4.1 Materiál

4.1.1 Výrobok a mikroorganizmus

Pre izoláciu DNA bol použitý mliečny výrobok BIO jogurtové mlieko s príchuťou granátové jablko, s kultúrou BiFi. Výrobcom je Hollandia, Karlovy Vary, s.r.o.. Jogurtové mlieko s kultúrou BiFi obsahovalo mliečnu kultúru, *Bifidobacterium* BB12 a *Lactobacillus acidophilus* LA5 ($10^6 \cdot g^{-1}$). Kontrolná DNA bola izolovaná z bakteriálneho kmeňa *Lactobacillus paracasei* LOCK 0919, ktorý bol získaný od Doc. RNDr. A. Španovej, CSc.

4.1.2 Magnetické častice

K izolácii DNA boli použité magnetické nosiče Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal (Dyna, Nórsko) s koncentráciou $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a magnetické nosiče P(HEMA-co-GMA) pokryté karboxylovými skupinami s koncentráciou $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, pripravené Ing. D. Horákom, CSc na Ústave makromolekulárnej chémie Akadémie vied ČR v Prahe. Charakteristiky použitých častíc sú uvedené v Tabuľke 2.

Tabuľka 2: Charakteristika magnetických častíc

Častice	Fe [%]	Dn [μm]	Dw [μm]	PDI	-COOH ($\text{mM} \cdot \text{g}^{-1}$)
P(HEMA-co-GMA)	10,02	2,23	2,42	1,81	0,76
Dynabeads® DNA DIRECT™	20	4,5	-	-	-

4.2 Chemikálie

- Agaróza pre elektroforézu (Serva, Heidelberg, SRN)
- DNA štandard (100 bp rebríček) Malamité (Malamité, Moravské Prusy, ČR)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma, St. Louis, USA)
- Etanol, 96% (Penta, Chrudim, ČR)
- Etídiumbromid (Sigma, St. Louis, USA)
- Fenol (Sigma, St. Louis, USA)
- Chlorid sodný (Sigma, St. Louis, USA)
- Chloroform (Lachema, Brno, ČR)
- Izoamylalkohol (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina etyléndiamíntetraoctová (EDTA) (Sigma, St. Louis, USA)
- Lyzozým p. a. (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- Ľadová kyselina octová (Penta, Chrudim, ČR)
- Nanášací pufo Yellow load (Top-Bio, Praha, ČR)
- Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)
- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- Polyetylén glykol (PEG) 6 000 (Sigma, St. Louis, USA)
- PPP master-mix (Top-Bio, Praha, ČR)
- Proteináza K p. a. (Sigma, St. Louis, USA)
- Tris-HCl (Penta, Chrudim, ČR)
- Zmes dNTP, 10 mM (Top-Bio, Praha, ČR)

4.3 PCR komponenty

- Voda pre PCR
- Oligonukleotidové priméry
F_eub, R_eub [19], LbLMA1-rev, R16-1 [20], F all lac, R all lac [19]
Sekvencie primérov sú uvedené v Tabuľke 5 (viz ďalej).
- PPP master-mix
Zloženie: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8, 40 mM (NH₄)₂SO₄, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl₂, 400 μM dATP, 400 μM dCTP, 400 μM dGTP, 400 μM dTTP, 100 U·ml⁻¹ Taq Purple DNA polymerázy, stabilizátory a aditíva.

4.4 Roztoky

Roztoky boli pripravené podľa skript Španovej a Ritticha. [21]

4.4.1 Roztoky pre lýzu buniek

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

4.4.2 Roztoky pre izoláciu DNA pomocou magnetických častíc

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

4.4.3 Roztoky pre fenolovú extrakciu DNA

- Fenol
Destilovaný fenol nasýtený v TE pufre, pH 7,8.
- CIZ

- Zmes chloroformu a izoamylalkoholu v pomere 24:1.
- 3 M octan sodný
408,1 g trihydrátu octanu sodného sa rozpustilo v objeme 800 ml destilovanej vody, roztok sa doplnil na objem 1 000 ml destilovanou vodou, rozdelil sa do alikvotných podielov a sterilizoval sa v autokláve (121 °C/20min).
- 96% etanol

4.4.4 Roztoky pre gélová elektroforézu

- 0,5× Tris-borát-EDTA (TBE) pufoer
54 g Tris-bázy a 27,5 g kyseliny boritej sa rozpustilo v 600 ml destilovanej vody, pridalo sa 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a doplnilo sa na objem 1 l destilovanou vodou. Pred použitím sa roztok nariedil 10×, aby výsledná koncentrácia bola 0,5× TBE.
- Roztok etídiumbromidu
100 µl roztoku etídiumbromidu sa (0,5 µg·ml⁻¹) sa zriedil 500 ml destilovanej vody.
- DNA štandard Malamité
100 bp rebríček obsahujúci DNA fragmenty o veľkosti 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1 000, 1 200 bp.
- Nanášací pufoer Yellow load
6× koncentrovaný, roztok s vysokou hustotou a s obsahom farbiva Oranž G.

4.5 Pomôcky a prístroje

- Analytické váhy OHAUS Pioneer (Ohaus, New Jersey, USA)
- Centrifúga MINI Spin 13 400 min⁻¹ (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
- Digitálny fotoaparát Sony Cyber-shot DSC-HX5V (SONY, Japonsko)
- Elektroforetická vaňa Owl D2 Wild Gel System (Thermo Scientific Owl Separation System, USA)
- Laboratorné váhy OHAUS CS 200 (Ohaus, New Jersey, USA)
- Magnetický separátor Dynal (Oslo, Nórsko)
- Mikrovlnná rúra PROLINE SM117 (SENCOR, ČR)
- Mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Varšava, Poľsko)
- Thermal cycler DNA Engine (BIO-RAD Lab., USA)
- MiniInkubátor Labnet (Labnet international, USA)
- NanoPhotometer (Implen, München, Nemecko)
- Transilluminátor TVR- 3121 (Spectroline, Albany USA)
- Zdroj elektrického napätia pre elektroforézu Enduro 300 V (Labnet, New Jersey, USA)
- Bežné laboratórne sklo, laboratórne pomôcky a umelohmotný materiál

5 METÓDY

Nasledujúce postupy boli prevedené podľa skript Španovej a Rittich (2010) [21].

5.1 Príprava hrubých lyzátov buniek z tekutého mliečneho výrobku

- 4-krát bol odobraný 1 ml z tekutého mliečneho výrobku-BIO jogurtové mlieko do 1,5 ml Eppendorfových skúmaviek, suspenzia buniek bola centrifugovaná pri 13 400 ot·min⁻¹ po dobu 5 minút.
- Supernatant bol opatrne zliaty, sediment bol premytý v 1 ml sterilnej vody a centrifugovaný pri 13 400 ot·min⁻¹ po dobu 5 minút. Tento krok sa ešte raz zopakoval.

- K získanému sedimentu bolo pridané 1 ml lyzačného roztoku B, suspenzia sa dokonale premiešala a nechala sa inkubovať 30 minút pri laboratórnej teplote.
- Vzorky boli povarené vo vodnom kúpeli a to 15, 30 a 60 minút, pri teplote varu vody 100 °C.
- Následne sa pridalo 100 µl detergentu 10% SDS a 5 µl proteinázy K 100 mg·ml⁻¹, roztoky boli premiešané a nechané k inkubácii v termostate pri 55 °C do druhého dňa.

5.2 Extrakcia bakteriálnej DNA fenolom

- K 500 µl hrubého lyzátu buniek sa pridal rovnaký objem fenolu, zmes sa kývavým pohybom miešala po dobu 4 minút a následne sa centrifugovala pri 14 500 ot·min⁻¹, 5 minút.
- 500 µl vodnej fázy s DNA bolo odobraných do sterilnej Eppendorfovej skúmavky, ďalej bolo k zmesi pridané 700 µl CIZ roztoku a opäť kývavým pohybom miešané po dobu 4 minút.
- Zmes bola centrifugovaná pri 14 500 ot·min⁻¹, 5 minút, horná vodná fáza s DNA sa odobrala do novej, čistej skúmavky a prečistená zrážaním etanolom.

5.3 Zrážanie DNA etanolom

- K 400 µl objemu vzorky DNA, bolo pridané 20 µl 3 M octanu sodného a vzorka DNA sa premiešala.
- Následne sa pridalo 1 ml etanolu (96 %, -20 °C), zmes bola premiešaná a DNA sa zrážala pri -20 °C po dobu 15 minút.
- Vzorka sa zcentrifugovala pri 14 500 ot·min⁻¹ po dobu 15 minút, supernatant bol opatrne zliaty a sediment DNA sa sušil v exikátore 10 minút. Suchá vzorka DNA sa rozpustila v 100 µl TE pufru a bola uschovaná pri teplote 4 °C pre spektrofotometrické stanovenie koncentrácie DNA.

5.4 Izolácia DNA pomocou magnetických mikročastíc z hrubého lyzátu buniek z mliečneho výrobku

- Do sterilných Eppendorfových skúmaviek bola namiešaná separačná zmes podľa Tabuľky 3 a bolo dodržané presné poradie jednotlivých zložiek. Použité boli dva druhy magnetických nosičov: Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal o koncentracii 10 mg·ml⁻¹, P(HEMA-co-GMA) s koncentraciou 2 mg·ml⁻¹.

Tabuľka 3: Zloženie separačnej zmesi

Krok	Zložka	Objem [µl]
1	Sterilná voda	100
2	5 M NaCl	400
3	DNA (lyzáat buniek)	100
4	40% PEG 6000	200
5	Magnetický nosič	100
Celkom		900

- Po zmiešaní všetkých komponent sa zmes inkubovala 15 minút pri laboratórnej teplote, následne sa zmes umiestnila do magnetického separátora a magnetické častice sa separovali 15 minút pri laboratórnej teplote.

- Supernatant sa odobral a do Eppendorfovej skúmavky sa pridalo 500 µl 70 % etanolu, vzorka sa premiešala a magnetické častice sa separovali 2 minúty na magnetickom separátore. Etanol bol odobraný a magnetické častice s naviazanou DNA boli opäť premyté 500 µl 70 % etanolom.
- Zvyšný etanol sa nechal odparovať pri laboratórnej teplote a izolovaná DNA naviazaná na magnetické častice sa eluovala do 100 µl TE tlmivého roztoku pri laboratórnej teplote do druhého dňa.
- Častice boli odseparované pomocou separátora 2 minúty pri laboratórnej teplote a eluát obsahujúci DNA sa odobral do čistých mikroskúmaviek. Takto pripravená DNA bola použitá pre spektrofotometrické stanovenie koncentrácie DNA.

5.5 Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty bakteriálnej DNA

- Bola meraná absorbancia roztoku DNA v TE pufré na nanospektrofotometre oproti čistému TE tlmivému roztoku.
- Bol použitý Lid faktor 5.
- 4 µl z objemu vzorky DNA bolo nadávkované na kyvetu spektrofotometeru a bola meraná absorbancia pri vlnovej dĺžke 230, 260, 280, 310 nm. Zo získaných hodnôt A_{260nm} bola určená koncentrácia.

5.6 Príprava zmesi pre PCR

- Pre PCR boli použité priméry špecifické pre doménu *Bacteria* (F_eub, R_eub, veľkosť produktu PCR 466 bp [19]), pre rod *Lactobacillus* (LbLMA1-rev, R16-1, veľkosť produktu PCR 250 bp [20]) a F all lac, R all lac, veľkosť produktu PCR 96 bp [19].
- Jednotlivé zložky sa zmiešali v nasledujúcom poradí a objemoch podľa Tabuľky 4.

Tabuľka 4: Príprava zmesi pre špecifické PCR

Komponenta	Objem [µl]
Voda pre PCR	9,5
Master mix	12,5
Primer 1	1,0
Primer 2	1,0
Matrica DNA	1,0
Celkom	25,0

Tabuľka 5: Použité priméry

Špecifická PCR	Primér	Sekvencia 5' - 3'	Veľkosť produktu PCR (bp)	Citácia
Doména <i>Bacteria</i>	F_eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466	[19]
	R_eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT		
Rod <i>Lactobacillus</i>	LbLMA 1	CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC	250	[20]
	R 16-1	CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA		
Rod <i>Lactobacillus</i>	F all lac	TGG ATG CCT TGG CAC TAG GA	92	[19]
	R all lac	AAA TCT CCG GAT CAA AGC TTA CTT AT		

- Ako matrice DNA boli: 1 μl DNA z mliečného výrobku, izolované pomocou dvoch rôznych magnetických častíc a DNA izolovaná fenolovou extrakciou, vždy s koncentráciou 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.
- Rovnakým postupom bola pripravená aj negatívna kontrola, ale matrica DNA bola nahradená 1 μl vody pre PCR.
- Taktiež pozitívna kontrola bola pripravená zhodným postupom, kde ako matrica DNA bola DNA *Lactobacillus paracasei* LOCK 0919 (10 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$).

5.7 Program pre PCR

- Pre všetky špecifické PCR bol použitý jeden teplotný program.
- Zmes pre PCR sa pred prvým cyklom zahriala na teplotu 95 °C po dobu 5 minút.
- Následne PCR prebiehala v 30 cykloch za podmienok uvedených v Tabuľke 6.

Tabuľka 6: Podmienky pre špecifické PCR

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]
Denaturácia DNA	95	30
Hybridizácia primérov	55	30
Syntéza reťazca DNA	72	60

- V poslednom cykle sa doba syntézy reťazca DNA predĺžila na 10 minút pri teplote 72 °C.
- Produkty PCR boli analyzované pomocou 1,5% gélu agarózovej elektroforézy.

5.8 Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR bakteriálnej DNA

- 1,5% agarózový gél bol pripravený rozpustením 1,5 g agarózy v 100 ml TBE pufru a 0,8% agarózový gél bol pripravený rozpustením 0,4 g agarózy v 50 ml TBE tlmivého roztoku, suspenzia sa rozvarila v mikrovlnnej trúbe, nechala vychladnúť na teplotu 60 °C. Takto pripravená suspenzia bola naliata do elektroforetickej vaničky.
- Gély sa nechali 30 minút tuhnúť, následne sa opatrne vybral hrebienok a na 0,8% gél sa naniesli vzorky DNA, ktoré boli pripravené zmiešaním 15 μl DNA s 3 μl nanášacieho tlmivého roztoku. Na 1,5% gél sa naniesli zmesi produktov PCR, pozitívna a negatívna kontrola o objeme 15 μl , DNA štandard o objeme 5 μl .
- Gély sa vložili do elektroforetickej vaničky, prevrstvili TBE tlmivým roztokom do výšky asi 1 cm nad gél a elektroforéza prebiehala pri napätí 80 V po dobu približne 1-2 hodín.
- Po skončení elektroforézy sa gély dofarbili v roztoku etídiumbromidu (30 minút), umiestnili na transiluminátor a vyhodnotili sa v UV svetle pri vlnovej dĺžke $\lambda=305\text{ nm}$.
- Gély bol dokumentované fotograficky.

6 VÝSLEDKY

6.1 Izolácia DNA

Postupom uvedeným v kapitole 5.1 boli pripravené štyri hrubé lyzáty buniek z BIO jogurtového mlieka, ktoré boli rozdelené do štyroch alikvótov a rôznu dobu varené a to 0, 15, 30, 60 minút s cieľom dosiahnuť degradáciu DNA.

Izolácia DNA z pripravených hrubých lyzátoov bola robená metódou fenolovej extrakcie podľa kapitoly 5.2, prítomnosť a relatívna intaktnosť DNA bola overená agarózovou gélovou elektroforézou podľa kapitoly 5.8. Izolácia DNA bola prevedená pomocou magnetických mikročastíc dvoch druhov: Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal o koncentrácií 10 mg·ml⁻¹ a P(HEMA-co-GMA) s koncentráciou 2 mg·ml⁻¹ postupom uvedeným v kapitole 5.4. Spolu tak bolo získaných 12 vzoriek s izolovanou DNA.

6.2 Stanovenie koncentrácie a čistoty DNA

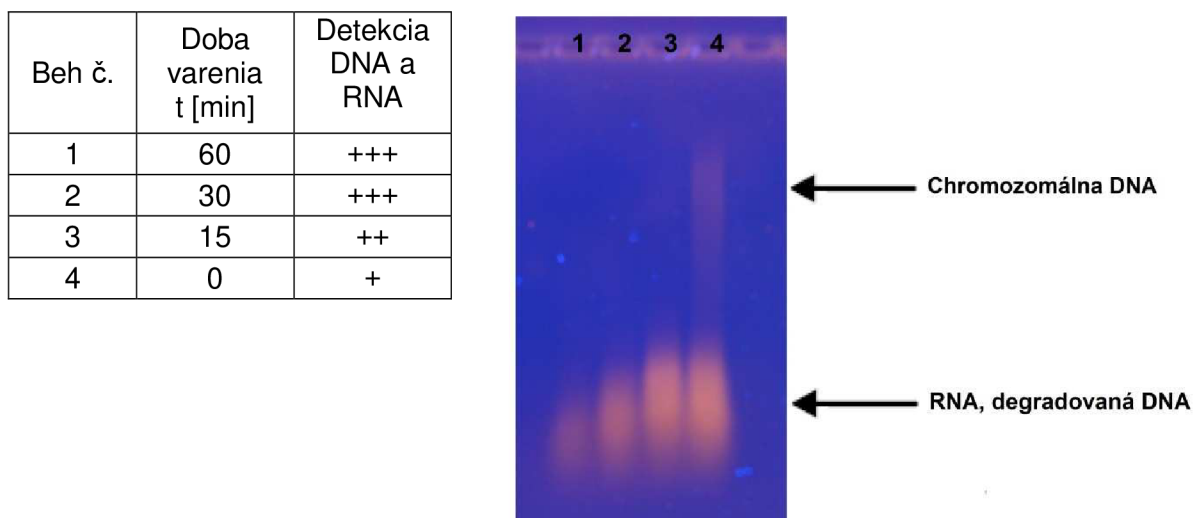
Koncentrácia DNA bola stanovená spektrofotometricky postupom uvedeným v kapitole 5.5, meraním absorpcie v rozmedzí vlnových dĺžok 220–320 nm. Výsledky spektrofotometrického stanovenia koncentrácie a absorpcie pri rôznych vlnových dĺžkach sú uvedené v Tabuľke 7.

Tabuľka 7: Spektrofotometrické stanovenie DNA, ktorá bola izolovaná fenolovou extrakciou a magnetickými časticami

Izolovaná DNA	Doba varenia t [min]	A _{230nm}	A _{260nm}	A _{280nm}	A _{320nm}	c [ng·ml ⁻¹]
Fenolovou extrakciou	0	0,01	0,02	0,01	0,00	40,0
	15	0,00	0,02	0,01	0,00	37,5
	30	0,00	0,01	0,01	0,00	30,0
	60	0,00	0,01	0,01	0,00	22,5
Mag. nosič Dynabeads® DNA DIRECT™	0	0,02	0,01	0,01	0,00	12,5
	15	0,02	0,01	0,01	0,00	10,0
	30	0,06	0,02	0,02	0,01	35,0
	60	0,03	0,01	0,01	0,00	12,5
Mag. nosič P(HEMA-co-GMA)	0	0,09	0,04	0,03	0,02	60,0
	15	0,03	0,03	0,03	0,01	35,0
	30	0,08	0,03	0,03	0,01	40,0
	60	0,05	0,03	0,02	0,01	11,5

6.3 Gélová elektroforéza bakteriálnej DNA

Prítomnosť a relatívna intaktnosť bakteriálnej DNA izolovanej fenolovou extrakciou bola vyhodnotená agarózovou gélovou elektroforézou podľa postupu uvedeným v časti 5.8. Snímka gélu je uvedená na Obrázku 2.



Obrázok 2: Gélová elektroforéza bakteriálnej DNA izolovanej fenolovou extrakciou z povarených lyzátoov buniek.

6.4 Amplifikácia DNA v polymerázovej reťazovej reakcii s priméromi špecifickými pre doménu *Bacteria*

Prítomnosť DNA bola overená metódou polymerázovej reťazovej reakcie so špecifickými priméromi s následnou vizualizáciou pomocou agarózovej gélovej elektroforézy produktov PCR. Postupovalo sa podľa postupov uvedených v kapitolách 5.6 – 5.8. Všetky vzorky boli zriedené na koncentráciu $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

Metódou PCR bola overená prítomnosť bakteriálnej DNA s využitím špecifických primérov pre doménu *Bacteria*: F_eub, R_eub. Veľkosť špecifického amplifikačného produktu PCR bola 466 bp. Vizualizácia produktov PCR je uvedená na Obrázku 3. Pre pozitívnu kontrolu bola využitá matrica DNA z kultúry *Lactobacillus paracasei* LOCK 0919 ($10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$).



Beh	Metóda izolácie DNA	Doba varenia t [min]	Množstvo DNA v PCR zmesi [ng]	Detekcia produktov PCR
1	Fenolovou extrakciou	60	10	++
2		30	10	++
3		15	10	+++
4		0	10	++++
5	Mag. nosič Dynabeads® DNA DIRECT™	60	10	+
6		30	10	++
7		15	10	+++
8		0	10	+
9	Mag. nosič P(HEMA-co-GMA)	60	10	+
10		30	10	+
11		15	10	+
12		0	10	+++
13	DNA štandard	0	10	
14	negatívna kontrola	0	0	-
15	pozitívna kontrola	0	10	++++

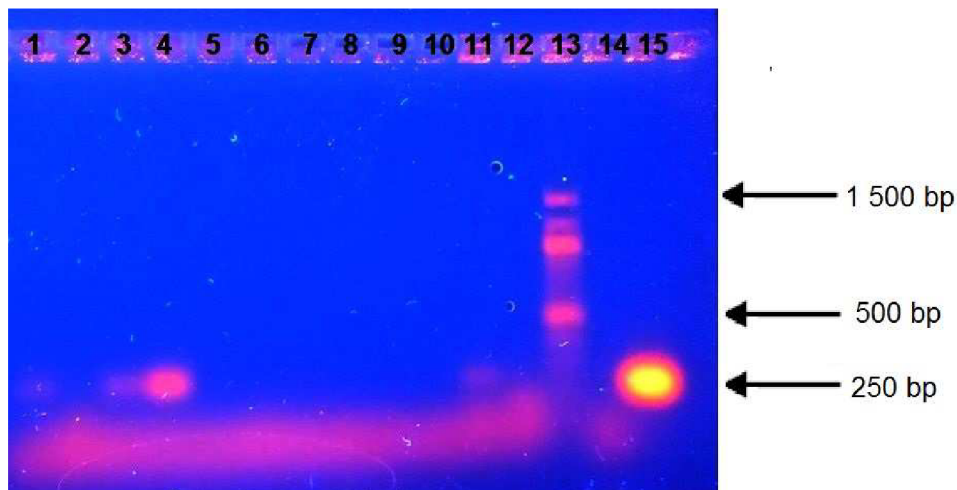
Detekcia produktu PCR:

++++, +++, ++, + produkty PCR o rôznej intenzite
 - nedetegované produkty PCR

Obrázok 3: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR (466 bp), amplifikovaná bola DNA z povarených hrubých lyzátov buniek pomocou primérov špecifických pre doménu *Bacteria*.

6.5 Dôkaz prítomnosti DNA baktérií rodu *Lactobacillus* s primérmí LbLMA1-rev, R16-1

Metódou PCR bola overená prítomnosť DNA baktérií rodu *Lactobacillus* s využitím špecifických primérov pre rod *Lactobacillus*: LbLMA1-rev, R16-1. Veľkosť špecifického produktu PCR bola 250 bp. Vizualizácia produktov PCR je uvedená na Obrázku 4. Pre pozitívnu kontrolu bola využitá matrica DNA *Lactobacillus paracasei* LOCK 0919 (10 ng· μl^{-1}).



Beh	Metóda izolácie DNA	Doba varenia t [min]	Množstvo DNA v PCR zmesi [ng]	Detekcia produktov PCR
1	Fenolovou extrakciou	60	10	+
2		30	10	-
3		15	10	++
4		0	10	+++
5	Mag. nosič Dynabeads® DNA DIRECT™	60	10	-
6		30	10	-
7		15	10	-
8		0	10	-
9	Mag. nosič P(HEMA-co-GMA)	60	10	-
10		30	10	-
11		15	10	+
12		0	10	-
13	DNA štandard	0	10	
14	negatívna kontrola	0	0	-
15	pozitívna kontrola	0	10	++++

Detekcia produktu PCR:

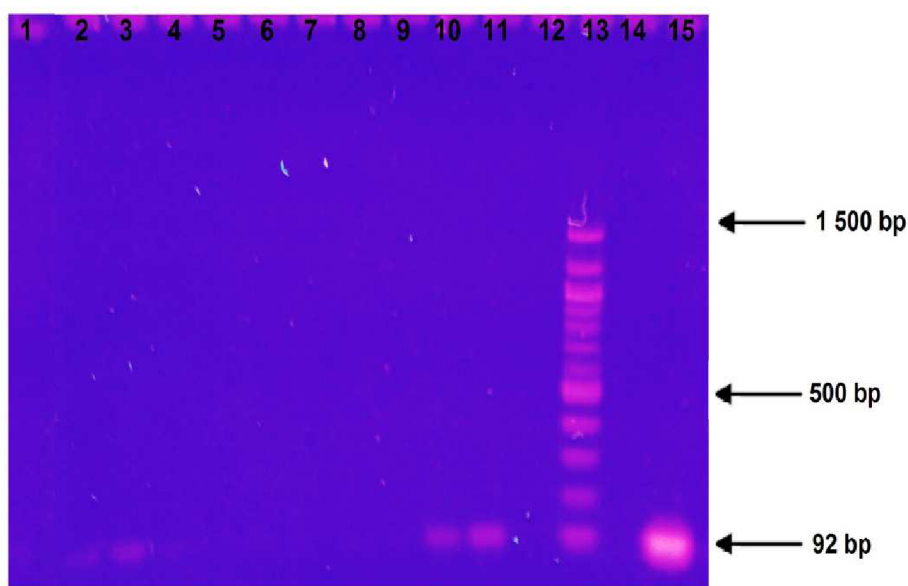
++++, +++, ++, + produkty PCR o rôznej intenzite

- nedetegované produkty PCR

Obrázok 4: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR (250 bp), amplifikovaná bola DNA povarených hrubých lyzátov buniek pomocou primérov špecifických pre rod *Lactobacillus* LbLMA1-rev, R16-1.

6.6 Dôkaz prítomnosti DNA baktérií rodu *Lactobacillus* s priméromi F all lac, R all lac

Ďalšou Metódou PCR bola overená prítomnosť DNA baktérií rodu *Lactobacillus* s využitím špecifických primérov pre rod *Lactobacillus*: F all lac, R all lac. Veľkosť špecifického amplifikačného produktu PCR bola 92 bp. Vizualizácia produktov PCR je uvedená na Obrázku 5. Pre pozitívnu kontrolu bola využitá matrica DNA *Lactobacillus paracasei* LOCK 0919 (10 ng·µl⁻¹).



Beh	Metóda izolácie DNA	Doba varenia t [min]	Množstvo DNA v PCR zmesi [ng]	Detekcia produktov PCR
1	Fenolovou extrakciou	60	10	-
2		30	10	+
3		15	10	+
4		0	10	-
5	Mag. nosič Dynabeads® DNA DIRECT™	60	10	-
6		30	10	-
7		15	10	-
8		0	10	-

Beh	Metóda izolácie DNA	Doba varenia t [min]	Množstvo DNA v PCR zmesi [ng]	Detekcia produktov PCR
9	Mag. nosič P(HEMA-co-GMA)	60	10	-
10		30	10	++
11		15	10	++
12		0	10	-
13	DNA štandard	0	10	-
14	negatívna kontrola	0	0	-
15	pozitívna kontrola	0	10	++++

Detekcia produktu PCR:

++++, +++, ++, + produkty PCR o rôznej intenzite

- nedetegované produkty PCR

Obrázok 5: Agarózová gélová elektroforéza produktov PCR, amplifikovaná bola DNA z povarených hrubých lyzátov buniek pomocou primérov špecifických pre rod *Lactobacillus* F all lac, R all lac.

7 DISKUSIA

Technologickou úpravou je dosiahnutá vhodná kvalita potravín (farba, vzhľad, textúra a pod.), ale významne sa znehodnocuje alebo až odstraňuje DNA z výrobku, čím sa redukuje citlivosť analýzy a znižuje sa detekčný a kvantifikačný limit. Bolo zistené, že najvýznamnejší vplyv má teplota a doba tepelného spracovania suroviny, ale tiež záleží na druhu potraviny, teda, či sa jedná o rastlinnú alebo živočíšnu potravinu, prípadne v prípade mäsa aj na pôvode. [4]

7.1 Izolácia DNA z výrobku

Pre izoláciu DNA z reálneho vzorku bol zvolený mliečny výrobok BIO jogurtové mlieko s kultúrou BiFi, ktoré obsahovalo mliečnu kultúru, *Bifidobacterium* BB12 a *Lactobacillus acidophilus* LA5 ($10^6 \cdot g^{-1}$). Z výrobku bol pripravený hrubý lyzát buniek, ktorý bol podrobený zahrievaniu vo vriacej vode, čím sa prítomné nukleové kyseliny degradovali. Nukleové kyseliny je možné vidieť na obrázku gélovej elektroforézy DNA získanej fenolovou extrakciou (Obrázok 2) z hrubých lyzátov buniek. DNA bola izolovaná metódou fenolovej extrakcie a magnetickými mikročasticami Dynabeads® DNA DIRECT™ a P(HEMA-co-GMA) v rôznom množstve. Podobné výsledky boli dosiahnuté aj inými autormi. [22]

7.2 Spektrofotometrické stanovenie koncentrácie a čistoty izolovanej DNA

Koncentrácia a čistota vzoriek DNA bola stanovená spektrofotometricky, vyhodnotením jednotlivých nameraných hodnôt absorbancií v rozmedzí vlnových dĺžok 220–320 nm. Z hodnoty A_{260nm} bola určená koncentrácia DNA. Pre izolovanú DNA fenolovou extrakciou boli hodnoty koncentrácie v rozmedzí od $40,0 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ do $22,5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, pre DNA získanú prostredníctvom Dynabeads® DNA DIRECT™, bola koncentrácia v rozmedzí $35,0 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ do $10,0 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a pre DNA získanú časticami P(HEMA-co-GMA) boli hodnoty koncentrácie v rozmedzí od $60,0 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ do $11,5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. DNA bola izolovaná všetkými použitými metódami v rôznej koncentrácii. Množstvo DNA bolo postačujúce pre následnú PCR. [21]

7.3 Gélová elektroforéza bakteriálnej DNA

Zo snímky gélovej elektroforézy bakteriálnej DNA izolovanej fenolovou extrakciou (Obrázok 2), nebola pre beh č. 1, 2, 3 zreteľná prítomnosť bakteriálnej DNA a pre beh č. 4 bola viditeľná len degradovaná chromozomálna DNA. Dôvodom neprítomnosti DNA v behoch 1, 2, 3, mohla byť nízka koncentrácia a degradácia izolovanej DNA bakteriálnej kultúry z použitého výrobku fenolovou extrakciou. DNA nemohla byť detegovaná, pretože bola degradovaná zahrievaním a jej koncentrácia bola pod medzou citlivosti gélovej elektroforézy. DNA bola v dostatočnom množstve a kvalite pre polymerázovú reťazovú reakciu (viz ďalej). DNA a RNA boli detegované v degradovanej forme v závislosti od doby varenia. Podobné výsledky boli získané aj inými autormi [8].

7.4 PCR špecifická pre doménu *Bacteria*

Prítomnosť bakteriálnej DNA bola dokázaná vo všetkých vzorkách využitím primérov F_eub, R_eub špecifických pre doménu *Bacteria*. Veľkosť špecifického amplifikačného produktu PCR bola 466 bp a produkty PCR boli rôznej intenzity, ale stále viditeľné. Podobné výsledky boli získané aj inými autormi [22], ale ich vzorky nezahrievali.

Degradáciu DNA vplyvom zahrievania 0, 15, 30 a 60 minút je možné sledovať na Obrázku 3, behy 1 – 4, kde sa s rastúcim časom zahrievania znižuje intenzita špecifického

amplifikačného produktu PCR. Ďalším faktorom je citlivosť PCR špecifická pre doménu *Bacteria*. Najnižšie množstvo DNA amplifikovateľnej v PCR za vzniku na géle detegovaných špecifických produktov PCR pre doménu *Bacteria* je 10 fg. [23]

Potvrdil sa vplyv zahrievania (degradácie DNA) na množstvo amplifikovateľnej DNA. Poznatok, že záleží na dobe zahrievania, ktorá ovplyvňuje výsledok následnej analýzy, bolo potvrdené aj inými pracovníkmi, ktorí skúmali mäsové produkty varené od 10 – 240 min. Tento proces spôsobil postupný pokles amplifikácie DNA paralelne s prírastkom počas doby varenia. [8]

7.5 PCR špecifická pre rod *Lactobacillus* s primérmí LbLMA1-rev, R16-1

Dôkaz prítomnosti DNA baktérií rodu *Lactobacillus* vo vzorkách bol prevedený využitím primérov LbLMA1-rev, R16-1 špecifických pre rod *Lactobacillus*. Ako najvhodnejšia metóda izolácie DNA baktérií rodu *Lactobacillus* sa ukázala fenolová extrakcia. Keďže všetky vzorky boli zriedené na koncentráciu $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a DNA buniek rodu *Lactobacillus* predstavovala len určitú časť z celkového množstva 10 ng, špecifické produkty boli len slabo detegované alebo neboli detegované vôbec. Podobné výsledky boli získané aj inými autormi [22] s výnimkou, že ich vzorky neboli podrobené tepelnému spracovaniu. Rovnako ako je uvedené v kapitole 7.4 boli produkty PCR ovplyvnené rovnakými faktormi (degradácia DNA vplyvom varu po rôznu dobu). Citlivosť PCR pre rod *Lactobacillus* je 100 pg. Jedná sa o najnižšie množstvo DNA amplifikovanej v tejto PCR za vzniku produktov PCR detegovaných pomocou agarózovej gélovej elektroforézy.

7.6 PCR špecifická pre rod *Lactobacillus* s primérmí F all lac, R all lac

Pre identifikáciu bola využitá ďalšia PCR špecifická pre rod *Lactobacillus* s využitím primérov F all lac, R all lac. V tejto PCR sa amplifikuje produkt PCR o dĺžke 92 bp. Keďže všetky vzorky boli zriedené na koncentráciu $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a DNA buniek rodu *Lactobacillus* predstavovala len určitú časť z celkového množstva 10 ng, špecifické produkty boli len slabo detegované alebo neboli detegované vôbec. Podobné výsledky boli získané aj inými autormi s výnimkou, že ich vzorky neboli podrobené varu. [24] Rovnako ako je uvedené v kapitole 7.4 bola amplifikácia (tvorba produktov PCR) ovplyvnená rovnakými faktormi (degradácia DNA vplyvom varu po rôznu dobu). Citlivosť tejto PCR, špecifickej pre rod *Lactobacillus* bola 3 ng. Taktiež tento faktor, vedľa degradácie DNA, zrejme ovplyvnil to, že na géle neboli detegované špecifické produkty PCR.

8 ZÁVER

Pomocou fenolovej extrakcie a dvoch typov magnetických častíc bola izolovaná DNA v dostatočnom množstve a čistote pre následnú amplifikáciu. Bolo ukázané, že degradácia DNA povarením má vplyv na jej amplifikáciu v PCR. V porovnaní s nezahrievanou DNA boli detegované produkty PCR menšej intenzity alebo neboli detegované vôbec. Vzhľadom k rôznej citlivosti použitých PCR pre ďalšiu prácu by bolo vhodné optimalizovať extrakčnú metódu ako aj podmienky amplifikácie, napríklad použiť väčšie množstvo DNA v PCR zmesi.

9 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] CLARK, S. *Rapid Detection Assays for Food and Water*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2001, 243 s. ISBN 08-540-4779-4.
- [2] HRNČIROVÁ, Z., BERGEROVÁ, E., SIEKEL, P. Effects of technological treatment on DNA degradation in selected food matrices of plant origin. *Journal of Food* [online]. 2008, Vol. 47, issue 1, s. 23-28 [cit. 2014-12-06]. ISSN 13368672. Dostupné z: AGRIS (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
- [3] LÓPEZ-ANDREO, M., ALDEGUER, M., GUILLÉN, I., et al. Detection and quantification of meat species by qPCR in heat-processed food containing highly fragmented DNA. *Food Chemistry* [online]. 2012, Vol. 134, issue 1, s. 518-523 [cit. 2014-11-08]. ISSN 03088146.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814612002993>
- [4] GRYSON, N. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2010, Vol. 396, issue 6, s. 2003-2022 [cit. 2014-11-08]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-009-3343-2>
- [5] JONAS, D. A., ELMADFA, J., ENGEL, I., et al. Safety considerations of DNA in food. *Annals of Nutrition and Metabolism* [online]. 2001, Roč. 45, č. 6, s. 235-254 [cit. 2015-03-27]. ISSN 02506807.
- [6] BAUER, T., HAMMES, W. P., HAASE, N. U., et al. Effect of food components and processing parameters on DNA degradation in food. *Environmental Biosafety Research* [online]. 2004, Vol. 3, issue 4, s. 215-223 [cit. 2015-03-15]. ISSN 16357922.
- [7] EEDE, G., AARTS, H., BUHK, H. J., et al. The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from genetically modified (GM) plants. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2004, Vol. 42, issue 7, s. 1127-1156 [cit. 2015-03-30]. ISSN 02786915.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691504000407>
- [8] ŞAKALAR, E., ABASIYANIK, M. F., BEKTIK, E., et al. Effect of Heat Processing on DNA Quantification of Meat Species. *Journal of Food Science* [online]. 2012, Vol. 77, issue 9, N40-N44 [cit. 2014-11-08]. ISSN 00221147.
Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2012.02853.x>
- [9] HUPFER, Ch., MAYER, J., HOTZEL, H., et al. *The effect of ensiling on PCR-based detection of genetically modified Bt maize*. *European Food Research and Technology* [online]. 1999, Vol. 209, issue 5, s. 301-304 [cit. 2015-03-17].
- [10] HERMAN, L., BLOCK, J., VIANE, R. Detection of hazelnut DNA traces in chocolate by PCR. *International Journal of Food Science and Technology* [online]. 2003, Vol. 38, issue 6, s. 633-640 [cit. 2015-03-18].
- [11] MATSUOKA, T., KURIBARA, H., AKIYAMA, H., et al. A Multiplex PCR Method of Detecting Recombinant DNAs from Five Lines of Genetically Modified Maize. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)* [online]. 2001, Vol. 42, issue 1, s. 24-32 [cit. 2014-12-21].
- [12] MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., et al. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* [online]. 1986, Vol. 51, issue 0, s. 1-2 [cit. 2014-12-07].
- [13] GIOVANNINI, T., CONCILIO, L. PCR Detection of Genetically Modified Organisms: A Review. *Starch - Stärke* [online]. 2002, Vol. 54, issue 8, s. 321-327 [cit. 2015-03-25].

- [14] MURRAY, S. R., BUTLER, R. C., TIMMERMAN-VAUGHAN, G. M. Quantitative real-time PCR assays to detect DNA degradation in soy-based food products. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2009, Vol. 89, issue 7, s. 1137-1144 [cit. 2014-12-21].
- [15] SCHRADER, C., SCHIELKE, A., ELLERBROEK, L., JOHNE, R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2012, Vol. 113, issue 5, s. 1014-1026 [cit. 2015-03-09]. ISSN 13645072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- [16] AL-SOUD, W. A. RADSTROM. P. Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2001-02, Vol. 39, issue 2, s. 485-493 [cit. 2015-03-09]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.39.2.485-493.2001>
- [17] ZHANG, Ch.-L., FOWLER, M. R., SCOTT, N. W., et al. A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. *Food Control* [online]. 2007, Vol. 18, issue 9, s. 1149-1158 [cit. 2015-03-09]. ISSN 09567135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713506002106>
- [18] FURET, J.-P., QUÉNÉE, P., TAILLIEZ, P. Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2004, Vol. 97, issue 2, s. 197-207 [cit. 2015-03-10]. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016816050400265X>
- [19] HAARMAN, M., KNOL. J. Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal Lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2006-04, Vol. 72, issue 4, s. 2359-2365 [cit. 2015-01-07]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006>
- [20] DUBERNET, S. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiology Letters* [online]. Vol. 214, issue 2, s. 271-275 [cit. 2015-04-01]. ISSN 03781097. Dostupné z: [http://doi.wiley.com/10.1016/S0378-1097\(02\)00895-9](http://doi.wiley.com/10.1016/S0378-1097(02)00895-9)
- [21] ŠPANOVÁ, A., RITTICH, B. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010, 86 s. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [22] VYSTAVĚLOVÁ, R. *Identifikace vybraných druhů bakterií mléčného kvašení v mléčných výrobcích*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2012, 60 s. Vedúci diplomové práce doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.
- [23] SZNAPKOVÁ, V. *Identifikace bakterií druhu Lactobacillus acidophilus v probiotických výrobcích*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2012, 98 s. Vedúci diplomové práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc.
- [24] OLIVA, J. *Analýza DNA izolované z probiotických výrobků s využitím magnetických mikročástic*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2015, 85 s. Vedúci diplomové práce doc. RNDr. Alena Španová, CSc.

10 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

A	adenín
BiFi	mliečna kultúra <i>Bifidobacterium</i>
BMK	baktérie mliečneho kvasenia
bp	páry báz
C	cytozín
<i>Bt</i>	GMO s vloženým génom z baktérie <i>Bacillus thuringiensis</i>
CIZ	zmes chloroform-izoamylalkohol 24:1
Ct	začiatok cyklu v polymerázovej reťazovej reakcii v reálnom čase
CTAB	celiltrimetylamonium bromid
dATP	2'-deoxyadenozín-5'-trifosfát
dCTP	2'-deoxycitidín-5'-trifosfát
dGTP	2'-deoxyguanozín-5'-trifosfát
Dn	priemer magnetickej častice
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	2'-deoxynukleozid-5'-trifosfát
dsDNA	dvojláknová DNA
dTTP	2'-deoxytimidín-5'-trifosfát
Dw	priemerná váha magnetickej mikročastice
EDTA	kyselina etyléndiamíntetraoctová
FRET	fluorescence resonance energy transfer
GMO	geneticky modifikované organizmy
IRMM	Inštitút pre referenčný materiál a meranie
kbp	kilobázy
mag.	Magnetický
napr.	napríklad
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PDI	index polydisperzity
PEG	polyetylénglykol
P(HEMA-co-GMA)	poly(hydroxyetylmetakrylát-co-glycidylmetakrylát)
pod.	podobne
qPCR	kvantitatívna polymerázová reakcia v reálnom čase
RNA	ribonukleová kyselina
RT-PCR	polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase
S	sedimentačný koeficient, $1 \text{ S} = 10^{-12} \text{ s}$
SDS	dodecylsulfát sodný
ssDNA	jednovláknová DNA
T	timín
Taq DNA	termostabilný enzým izolovaný z baktérie <i>Thermus aquaticus</i>
TBE pufor	Tris-borát-EDTA pufor
TE pufor	Tris-EDTA pufor
UV	ultra fialový