

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Špela HÖFFERLE

OSAMITEV DNA IZ SOJINEGA LECITINA

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Špela HÖFFERLE

OSAMITEV DNA IZ SOJINEGA LECITINA

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

ISOLATION OF DNA FROM SOYBEAN LECITHIN

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

POPRAVKI:

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti, Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo večinoma v laboratorijih Katedre za biotehnologijo, na Oddelku za živilstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Analize HPLC so bile opravljene v laboratorijih podjetja BIA Separations d.o.o v Ljubljani. Analize PCR v realnem času so bile opravljene na Oddelku za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo, na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Petra Rasporja in za recenzentko prof. dr. Jano Žel.

Mentor: prof. dr. Peter Raspor

Recenzentka: prof. dr. Jana Žel

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Franc Viktor Nekrep
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Peter Raspor
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Jana Žel
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Špela Höfferle

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 543.54+577.21:633.853.52:614.31(043)=863
KG gensko spremenjeni organizmi/GSO/gensko spremenjena živila/gensko spremenjena soja/detekcija GSO/ zakonodaja GSO/sojin lecitin/DNA/osamitev DNA/ kromatografija/HPLC/monoliti/CIM/CTAB/PCR/PCR v realnem času
AV HÖFFERLE, Špela
SA RASPOR, Peter (mentor)/ŽEL, Jana (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2007
IN OSAMITEV DNA IZ SOJINEGA LECITINA
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP XI, 88 str., 13 pregl., 34 sl., 7 pril., 124 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Po veljavni zakonodaji Evropske Unije (EU) se zahteva natančno označevanje gensko spremenjenih (GS) živil. Pomembna stopnja v procesu določanja gensko spremenjenih organizmov (GSO) je osamitev DNA. V ta namen smo iz šestih vzorcev sojinega lecitina, z uporabo ionsko-izmenjevalne kromatografije s CIM[®] (convective interaction media) DEAE (dietilaminoetil) diski ter ločeno iz štirih vzorcev sojinega lecitina, z metodo CTAB (heksadeciltrimetil amonijev bromid), osamili sojino DNA. Kot referenčna vzorca, ki naj ne bi vsebovala sojine DNA, smo uporabili vzorec lecitina pšenice in lecitina pire. Obe metodi osamitve sta se izkazali kot ustrezni. Preverili smo količino in kakovost (razgrajenost in čistost) osamljene DNA. Izvedli smo sprektrofotometrične meritve za določanje koncentracije in čistosti nukleinskih kislin (NK), ki so pokazale, da so v analiziranih ekstraktih prisotne nečistoče, zato rezultati določanja koncentracij NK niso popolnoma zanesljivi. Z agarozno gelsko elektroforezo smo preverili razgrajenost osamljene DNA. Rezultati so pokazali, da smo z obema metodama, iz vzorcev sojinega lecitina, osamili majhne količine močno razgrajene DNA. S kvalitativnim PCR in PCR v realnem času, kot testoma pomnoževanja za sojo specifičnega odseka *lectin* gena, smo dokazali prisotnost sojine DNA v vseh analiziranih vzorcih sojinega lecitina. PCR v realnem času je pokazal večjo občutljivost. Sojino DNA sta vsebovala tudi referenčna vzorca, vendar je bila navzkrižna kontaminacija med osamitvijo izključena. S PCR v realnem času smo določali tudi prisotnost inhibitorjev PCR v pridobljenih ekstraktih ter naredili relativne primerjave med uporabljenima metodama osamitve, v količini osamljene sojine DNA. S pomočjo CIM[®] DEAE diskov smo osamili majhno količino sojine DNA. Metoda CTAB, pri kateri je osamljena DNA večinoma izhajala iz večje ali enake količine ekstrakta, se je izkazala za deloma manj uspešno, saj smo z njo, pri večini vzorcev, osamili še manjšo količino sojine DNA, v primerjavi s CIM[®] DEAE diski. V nekaterih ekstraktih analiziranih vzorcev sojinega lecitina, osamljenih s pomočjo CIM[®] DEAE diskov ali pa z metodo CTAB, so bili domnevno prisotni inhibitorji PCR. Rezultati analiz PCR v realnem času za določanje prisotnosti inhibitorjev reakcije, zaradi nihanja vrednosti Ct (cycle threshold), niso popolnoma zanesljivi. Na koncu smo s kvalitativnim PCR izvedli tudi presejalno analizo, s katero smo določali 35S promotor cvetačnega mozaičnega virusa in NOS terminator, ki sta prisotna v skoraj vseh dovoljenih GS-rastlinah v EU, vključno z Roundup Ready[®] sojo. V nobenem od analiziranih vzorcev lecitina nismo dokazali DNA GS-soje, niti pri osamitvi z metodo CTAB niti s pomočjo CIM[®] DEAE diskov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDK 543.54+577.21:633.853.52:614.31(043)=863
CX genetically modified organisms/GMO/genetically modified foods/genetically modified soybean/GMO detection/GMO legislation/soybean lecithin/DNA/isolation of DNA/chromatography/HPLC/monoliths/CIM/CTAB/PCR/real-time PCR
AU HÖFFERLE, Špela
AA RASPOR, Peter (supervisor)/ŽEL, Jana (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2007
TI ISOLATION OF DNA FROM SOYBEAN LECITHIN
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 88 p., 13 tab., 34 fig., 7 ann., 124 ref.
LA sl
AL sl/en
AB European Union (EU) legislation demands correct labelling of genetically modified (GM) foods. DNA isolation is an important step in detection of genetically modified organisms (GMO). In this work, anion-exchange chromatography, using CIM[®] (convective interaction media) DEAE (diethylaminoethyl) monolithic columns was tested for isolation of DNA from 6 samples of soybean lecithin; and CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) method, for isolation of DNA from 4 samples of soybean lecithin. As reference samples, with expected absence of soybean DNA, samples of wheat lecithin and spelt lecithin were used. Both extraction procedures were successful. The quantity and quality (degradation and purity) of extracted DNA were estimated. Spectrophotometric determination of concentration and purity of nucleic acids (NA) indicated the presence of impurities in the tested samples and therefore indicated, that results on the NA concentrations were not entirely reliable. Using agarose gel electrophoresis, we demonstrated small amounts of heavily degraded DNA in the extracts of soybean lecithin. Using qualitative PCR and real-time PCR, for detection of soybean specific sequence of *lectin* gene, we demonstrated the presence of soybean DNA in all the soybean lecithin samples. Real-time PCR showed higher sensitivity. Soybean DNA was also present in the reference samples, but contamination between samples during the isolation was excluded. To ascertain the presence or absence of potent PCR inhibitors and to make relative comparisons in the amounts of soybean DNA, isolated using the two extraction procedures, real-time PCR was used. The analysis indicated that, using CIM[®] DEAE monolithic columns, we isolated small amounts of soybean DNA. In comparison, CTAB method demonstrated even smaller amounts of isolated soybean DNA in most of the extracts, despite the mostly same or higher volumes of extracts. Inhibitors were presumably present in some of the extracts of the soybean lecithin samples, isolated using CIM[®] DEAE monolithic columns or CTAB method. Because of the variability of the Ct (cycle threshold) values in real-time PCR, the results on inhibition are not entirely reliable. Using qualitative PCR we also performed a screening method, using cauliflower mosaic virus 35S promoter and NOS terminator as target sequences, since they are up-to-now present in nearly all EU approved GM-plants, along with Roundup Ready[®] soybean. Using either CIM[®] DEAE monolithic columns or CTAB as extraction methods, we did not detect DNA of GM-soybean in any of lecithin samples analysed.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA.....	1
1.2 CILJI DELA IN DELOVNA HIPOTEZA.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KRATKA KRONOLOGIJA RAZVOJA GENSKO SPREMENJENIH (GS) ŽIVIL.....	3
2.2 ZAKONODAJA PODROČJA GENSKO SPREMENJENIH ORGANIZMOV (GSO)	3
2.2.1 Zakonodaja v Evropski Uniji	3
2.2.1.1 Sproščanje GSO v okolje	4
2.2.1.2 Sledljivost in označevanje.....	4
2.2.2 Zakonodaja v Sloveniji.....	5
2.3 GS-RASTLINE V SVETOVNEM KMETIJSTVU.....	6
2.3.1 Razvoj in aktualno stanje.....	6
2.3.2 GS-poljščine in -živila v Evropski Uniji	7
2.3.3 GS-poljščine v Sloveniji	7
2.4 SOJIN LECITIN	8
2.4.1 Sestava	8
2.4.2 Predelava soje	8
2.4.3 Pridobivanje sojinega lecitina.....	9
2.4.4 Uporaba sojinega lecitina.....	10
2.5 OSNOVE TEHNOLOGIJE REKOMBINANTNE DNA	10
2.5.1 Osnove genske transformacije rastlin.....	10
2.5.2 GS-soja.....	11
2.6 OSAMITEV DNA	13
2.6.1 Heksadeciltrimetil amonijev bromid (CTAB) metoda	13
2.6.2 Druge metode osamitve DNA	14
2.7 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)	14
2.7.1 Osamitev biomolekul s HPLC	15
2.7.2 Monolitni kromatografski nosilci CIM® (convective interaction media).....	16
2.7.3 Ionsko-izmenjevalna kromatografija DNA.....	16
2.8 METODOLOGIJA UGOTAVLJANJA GENSKO SPREMENJENIH ORGANIZMOV	18
2.8.1 Postopek ugotavljanja GS-rastlin	18
2.8.2 Metode zaznave rekombinantne DNA	19
2.8.2.1 Kvalitativna in vgnezdna verižna reakcija s polimerazo (PCR).....	20
2.8.2.2 Kvantitativni kompetitivni PCR.....	20
2.8.2.3 PCR v realnem času	21
2.8.2.4 Hibridizacija odtisa southern.....	22
2.8.2.5 Mikromreže	22
2.8.2.6 Biosenzorji	22
2.8.3 Metode zaznave rekombinantnih proteinov.....	23
2.8.3.1 Encimsko-imunska metoda (ELISA)	23

2.8.3.2 Hibridizacija odtisa western	23
2.8.4 Druge metode zaznave GS-rastlin	24
2.9 PROBLEMATIKA UGOTAVLJANJA GS-ŽIVIL	24
2.9.1 Vzorčenje in homogenizacija	25
2.9.2 Količina in kakovost DNA	25
2.9.3 PCR	26
3 MATERIAL IN METODE	27
3.1 POTEK DELA	27
3.2 MATERIAL	28
3.2.1 Vzorci	28
3.2.2 Referenčni vzorci	28
3.2.3 Kemikalije	29
3.2.4 Aparature in naprave	31
3.3 METODE	32
3.3.1 Vzorčenje	32
3.3.2 Metoda CTAB	33
3.3.3 Začetna ekstrakcija DNA s pufrom CTAB-1 in dodatkom heksana	34
3.3.4 Osamitev DNA z ionsko-izmenjevalno kromatografijo s CIM® DEAE diski	35
3.3.5 Spektrofotometrične analize	36
3.3.6 Kvalitativni PCR	37
3.3.7 Agarozna gelska elektroforeza	39
3.3.8 PCR v realnem času	39
4 REZULTATI	41
4.1 OSAMITEV DNA Z IONSKO-IZMENJEVALNO KROMATOGRFIJO S CIM® DEAE DISKI	42
4.1.1 Optimizacija pogojev ločevanja	42
4.1.2 Osamitev DNA iz ekstraktov	44
4.2 PREVERJANJE KONCENTRACIJE IN KAKOVOSTI OSAMLJENE DNA	49
4.2.1 Spektrofotometrične analize	49
4.2.2 Agarozna gelska elektroforeza	52
4.2.3 Kvalitativni PCR	53
4.2.4 PCR v realnem času	56
4.3 ODKRIVANJE DNA GS-SOJE V VZORCIH LECITINA	63
4.3.1 Pomnoževanje CaMV 35S promotorja	63
4.3.2 Pomnoževanje NOS terminatorja	64
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	66
5.1 RAZPRAVA	66
5.1.1 Osamitev DNA z ionsko-izmenjevalno kromatografijo s CIM® DEAE diski	66
5.1.2 Preverjanje količine in kakovosti osamljene DNA	67
5.1.2.1 Spektrofotometrične analize	68
5.1.2.2 Agarozna gelska elektroforeza	69
5.1.2.3 Kvalitativni PCR	70
5.1.2.4 PCR v realnem času	71
5.1.3 Odkrivanje DNA GS-soje v vzorcih lecitina	74
5.2 SKLEPI	76
6 POVZETEK	77
7 VIRI	78
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Uporaba in funkcija sojinega lecitina v živilstvu (Szuhaj, 1983; Mahungu in Artz, 2002).....	10
Preglednica 2: Pregled v svetu obstoječih linij oz. transformacijskih dogodkov (ang. transformation event) GS-soje z dovoljenjem za tržno pridelavo, sproščanje v okolje ali uporabo v prehrani ljudi in živali (GM database..., 2007).....	12
Preglednica 3: Seznam analiziranih vzorcev lecitina, njihov izvor, dobavitelj, pridobivanje in uporaba	28
Preglednica 4: Izhodiščne mase vzorcev, iz katerih smo osamili DNA z metodo CTAB in približni volumni ekstraktov po stopnji 8.....	34
Preglednica 5: Izhodiščne mase vzorca, dobljeni volumni ekstraktov in nanešeni volumni ekstraktov za čiščenje in koncentriranje na CIM® DEAE diskah	35
Preglednica 6: Pogoji PCR za pomnoževanje odseka <i>lectin</i> gena (Querci in sod., 2004) .	38
Preglednica 7: Pogoji PCR za pomnoževanje odseka CaMV 35S promotorja (Querci in sod., 2004)	38
Preglednica 8: Pogoji PCR za pomnoževanje odseka NOS terminatorja (Querci in sod., 2004).....	38
Preglednica 9: Priprava ustreznega agaroznega gela za elektroforezo	39
Preglednica 10: Pogoji agarozne gelske elektroforeze.....	39
Preglednica 11: Pogoji PCR v realnem času, za pomnoževanje odseka <i>lectin</i> gena (NIB)	40
Preglednica 12: Rezultati spektrofotometričnega določanja koncentracije nukleinskih kislin v ekstraktih, osamljenih z metodo CTAB in/ali s CIM® DEAE diski ($\lambda = 260$ nm).	50
Preglednica 13: Dobljene Ct in Δ Ct vrednosti za določanje inhibicije pomnoževanja odseka <i>lectin</i> gena s PCR v realnem času.....	57

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema primera vstavljenih genskih elementov v Roundup Ready [®] soji (Mariotti in sod., 2002; Javornik, 2004; Querci in Mazzara, 2004; Žel, 2004; Žel in sod., 2004).....	12
Slika 2: a) 10000-kratna povečava strukture metakrilatnega monolitnega nosilca CIM [®] ; b) CIM [®] diski; c) Ohišje za CIM [®] disk (CIM [®] basics, 2004).....	16
Slika 3: Shema elektrostatskih interakcij med pozitivno nabitimi DEAE skupinami anionskega izmenjevalca in negativno nabitimi fosfatnimi skupinami dvoverižne molekule DNA (Huber, 1998).....	17
Slika 4: Shema določanja GSO z molekularnimi metodami, v skladu z veljavno zakonodajo EU (Žel in sod., 2004).....	18
Slika 5: Shema poteka poskusov osamitve DNA GS-soje iz vzorcev lecitina	27
Slika 6: Pri agarozni gelski elektroforezi uporabljeni molekularni označevalci velikosti DNA (GeneRuler™..., 2006; DNA ladders, 2006a; DNA ladders, 2006b)	31
Slika 7: Površine kromatografskih vrhov v odvisnosti od nanešene količine ekstrakta vzorca št. 2 - pšenični lecitin	42
Slika 8: Odvisnost višine in oblike kromatograma od nanešene količine ekstrakta vzorca št. 6 (sojin lecitin).....	43
Slika 9: Površine kromatografskih vrhov v odvisnosti od nanešene količine ekstrakta vzorca št. 6 – sojin lecitin	44
Slika 10: Kromatogram osamitve DNA iz ekstrakta vzorca št. 1 (sojin lecitin) s CIM [®] DEAE diski.....	45
Slika 11: Kromatogram osamitve DNA iz ekstrakta vzorca št. 2 (pšenični lecitin) s CIM [®] DEAE diski.....	45
Slika 12: Kromatogram osamitve DNA iz ekstrakta vzorca št. 3 (lecitin pire) s CIM [®] DEAE diski.....	46
Slika 13: Kromatogram osamitve DNA iz ekstrakta vzorca št. 4 (sojin lecitin) s CIM [®] DEAE diski.....	47
Slika 14: Kromatogram osamitve DNA iz ekstrakta vzorca št. 5 (sojin lecitin) s CIM [®] DEAE diski.....	47
Slika 15: Kromatogram osamitve DNA iz ekstrakta vzorca št. 6 (sojin lecitin) s CIM [®] DEAE diski.....	48
Slika 16: Kromatogram osamitve DNA iz ekstrakta vzorca št. 7 (sojin lecitin) s CIM [®] DEAE diski.....	48
Slika 17: Kromatogram osamitve DNA iz ekstrakta vzorca št. 8 (sojin lecitin) s CIM [®] DEAE diski.....	49
Slika 18: Vrednosti izračunanih razmerij A_{260}/A_{280} za določanje čistosti DNA, osamljene z metodo CTAB in s pomočjo CIM [®] DEAE diskov	51

Slika 19: Vrednosti izračunanih razmerij A_{260}/A_{230} za določanje čistosti DNA, osamljene z metodo CTAB in s pomočjo CIM [®] DEAE diskov	51
Slika 20: Agarozna gelska elektroforeza za preverjanje razgrajenosti DNA, osamljene z metodo CTAB	52
Slika 21: Agarozna gelska elektroforeza za preverjanje razgrajenosti DNA, osamljene s CIM [®] DEAE diski.....	53
Slika 22: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov PCR, za odkrivanje sojine DNA v ekstraktih, osamljenih z metodo CTAB	54
Slika 23: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov PCR, za odkrivanje sojine DNA v ekstraktih, osamljenih s CIM [®] DEAE diski.....	55
Slika 24: Agarozna gelska elektroforeza za primerjavo osamitve sojine DNA z metodo CTAB in s CIM [®] DEAE diski, glede na pomnožke PCR, za odkrivanje sojine DNA	56
Slika 25: Primerjava odvisnosti intenzitete fluorescence od števila ciklov PCR v realnem času za sojino DNA iz vzorca št. 2 (ekstrakt pšeničnega lecitina) , osamljeno z metodo CTAB in s pomočjo CIM [®] DEAE diskov	58
Slika 26: Primerjava odvisnosti intenzitete fluorescence od števila ciklov PCR v realnem času za sojino DNA iz vzorca št. 3 (ekstrakt lecitina pire) , osamljeno z metodo CTAB in s pomočjo CIM [®] DEAE diskov	59
Slika 27: Primerjava odvisnosti intenzitete fluorescence od števila ciklov PCR v realnem času za sojino DNA iz vzorca št. 5 (ekstrakt sojinega lecitina) , osamljeno z metodo CTAB in s pomočjo CIM [®] DEAE.....	60
Slika 28: Primerjava odvisnosti intenzitete fluorescence od števila ciklov PCR v realnem času za sojino DNA iz vzorca št. 6 (ekstrakt sojinega lecitina) , osamljeno z metodo CTAB in s pomočjo CIM [®] DEAE diskov	61
Slika 29: Primerjava odvisnosti intenzitete fluorescence od števila ciklov PCR v realnem času za sojino DNA iz vzorca št. 7 (ekstrakt sojinega lecitina) , osamljeno z metodo CTAB in s pomočjo CIM [®] DEAE diskov	62
Slika 30: Primerjava odvisnosti intenzitete fluorescence od števila ciklov PCR v realnem času za sojino DNA iz vzorca št. 8 (ekstrakt sojinega lecitina) , osamljeno z metodo CTAB in s pomočjo CIM [®] DEAE diskov	63
Slika 31: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov PCR, za odkrivanje CaMV 35S promotorja GS-soje v ekstraktih, osamljenih z metodo CTAB.....	64
Slika 32: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov PCR, za odkrivanje CaMV 35S promotorja GS-soje v ekstraktih, osamljenih s CIM [®] DEAE diski	64
Slika 33: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov PCR, za odkrivanje NOS terminatorja GS-soje v ekstraktih, osamljenih z metodo CTAB	65
Slika 34: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov PCR, za odkrivanje NOS terminatorja GS-soje v ekstraktih, osamljenih s CIM [®] DEAE diski.....	65

KAZALO PRILOG

Priloga A1: Višine kromatografskih vrhov v odvisnosti od nanešenih volumnov vodne raztopine DNA (standardna raztopina lososove genomske DNA).....	
Priloga B1: Površine vrhov kromatogramov za posamezne količine nanešenega ekstrakta pšeničnega lecitina (vzorec št. 2).....	
Priloga B2: Površine vrhov kromatogramov za posamezne količine nanešenega ekstrakta sojinega lecitina (vzorec št. 6).....	
Priloga C1: Pripadajoče površine in višine vrhov (absorbanca pri 260 nm) kromatogramov za ekstrakte, čiščene in koncentrirane s pomočjo CIM [®] DEAE diskov, ki so bili shranjeni za nadaljnjo uporabo.....	
Priloga D1: Rezultati spektrofotometričnega določanja koncentracije nukleinskih kislin v ekstraktih, osamljenih s pomočjo CIM [®] DEAE diskov po obarjanju z absolutnim etanolom	
Priloga D2: Rezultati spektrofotometričnega določanja koncentracije nukleinskih kislin v ekstraktih, osamljenih z metodo CTAB	
Priloga E1: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov PCR, za odkrivanje sojine DNA v ekstraktih, osamljenih s CIM [®] DEAE diski	

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A_x	absorbanca pri valovni dolžini x nm
Bt-koruza	koruza, ki ima vnesen gen CryA1 iz bakterije <i>Bacillus thuringiensis</i> , za odpornost proti insektom
CaMV 35S	promotor iz mozaičnega virusa cvetače; cauliflower mosaic virus
CIM[®]	monolitni kromatografski nosilec; convective interaction media
Ct	število ciklov; cycle threshold
CTAB	heksadeciltrimetil amonijev bromid; cetyltrimethylammonium bromide
DEAE	dietilaminoetil; diethylaminoethyl
EDTA	etilendiamin tetraacetna kislina; ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	encimsko-imunska metoda; enzyme-linked immunosorbent assay
EPSPS	5-enol-piruvil-šikimat-3-fosfat sintaza
EU	Evropska Unija
DNA	deoksiribonukleinska kislina
FRET	fluorescence resonance energy transfer
GMO3, GMO4	začetna oligonukleotida za pomnoževanje odseka <i>lectin</i> gena (<i>Le1</i>)
GS	gensko spremenjen(a)
GSO	gensko spremenjen organizem
GTS 40-3-2	linija gensko spremenjene Roundup Ready [®] soje
HA-nos 118-f, HA-nos 118-r	začetna oligonukleotida za pomnoževanje odseka NOS terminatorja
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
lectin	za sojo specifičen gen za beljakovino lektin
MZ	meja zaznavanja, limita detekcije
MZK	meja zaznavanja količine; limita kvantifikacije
NIB	Nacionalni inštitut za biologijo
NK	nukleinske kisline
NOS	terminator za nopalinsko sintazo s Ti plazmida bakterije <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
PAT	fosfinotricin-N-acetiltransferaza
pat, bar	gena iz bakterij <i>Streptomyces viridochromogenes</i> in <i>S. hygroscopicus</i> , ki kodirata encim PAT
PCR	verižna reakcija s polimerazo, polymerase chain reaction
p35S-cf3, p35S-cr4	začetna oligonukleotida za pomnoževanje odseka CaMV 35S promotorja
QA	kvartarni amin, quaternary amine
QC-PCR	kvantitativni kompetitivni PCR, quantitative competitive PCR
rBST	rekombinantni goveji somatotropin (rastni hormon)
RI detektor	refrakcijski detektor HPLC sistema, refractive index detector
RRS	gensko spremenjena soja, Roundup Ready [®] soja
t	čas
Tris	trihidroksimetilaminometan
UV-VIS detektor	UV-detektor sistema HPLC; ultraviolet visible spectroscopy
ZDA	Združene države Amerike
ZRGSO	Zakon o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi
ZZUZIS	Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili
Φ_v	hitrost pretoka
γ	masna koncentracija
λ/HindIII, 100 bp	molekulska označevalca velikosti DNA, uporabna pri gelski elektroforezi

1 UVOD

Genski inženiring, genska tehnologija oz. tehnologija rekombinantne DNA (deoksiribonukleinske kisline) se uvršča v biotehnološko znanost. Genski inženiring izvira iz klasične biotehnologije, ki je del področja kmetijstva, okoljevarstva, živilske tehnologije in medicine. V preteklih desetletjih je klasična biotehnologija, s pomočjo genske tehnologije, napredovala v sodobno. S pomočjo številnih orodij nam genska tehnologija danes omogoča manipulacijo dednine in prenos le-te med organizmi kot so rastline, živali, bakterije in virusi (Bohanec, 2004). V primerjavi s klasičnim žlahtnjenjem rastlin, se pri genskem inženiringu v rastlino vnašajo točno določene želene lastnosti oz. geni, ki so lahko iz katerega koli organizma ali pa narejeni umetno, pri tem pa ni vnosa številnih nepoznanih genov, kot je to pogosto pri klasičnem žlahtnjenju (Žel, 2004).

Gensko spremenjeni organizem (GSO) je po definiciji organizem, z izjemo človeka, ali mikroorganizem, katerega genski material je spremenjen s postopki, ki spreminjajo genski material drugače, kot to poteka v naravnih razmerah s križanjem ali naravno rekombinacijo (Zakon o ravnanju..., 2002). Rastline z vnesenimi osamljenimi geni (transgene rastline) praviloma tudi označujemo kot GSO, gensko spremenjene rastline (GS-rastline) oz. iz njih pridobljeno živilo – gensko spremenjena hrana (GS-hrana) (Bohanec, 2004). Gensko spremenjena živila (GS-živila) so živila ali sestavine živil, ki vsebujejo ali jih sestavljajo GSO ter živila in sestavine živil, pridobljena iz GSO, ki pa ne vsebujejo GSO (Zakon o spremembah..., 2002). Med GS-živila štejemo tudi sestavine, pridobljene iz GSO, kot so npr. škrob, rafinirano rastlinsko olje, arome, sladkor, encime, idr.; ne uvrščamo pa mednje živil, ki so le pridobljena s pomočjo GSO ali njihovih delov (npr. rekombinantnih encimov). Pri uvrščanju živil med GS-živila je ključen parameter nedvomno prisotnost sestavin, ki izvirajo iz GSO (Jerman in Raspor, 2004).

Živilo se glede na proizvajalca, potrošnika ali pa zakonodajo lahko pojmuje različno. Po zakonu o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi (ZRGSO) je živilo vse, kar ljudje uporabljajo za prehranske namene v nepredelani, polpredelani ali predelani obliki, vključno s pitno vodo in pijačami, aditivi za živila, pomožnimi tehnološkimi sredstvi, snovmi za obogatitev živil in žvečilnim gumijem. Med živila se ne prištevajo tobak in tobačni izdelki, zdravila ter psihotropne substance (Zakon o zdravstveni..., 2000; Zakon o spremembah..., 2002). Lecitin je kompleksna mešanica, ki je večinsko sestavljena iz fosfolipidov (Szuhaj, 1983). Spada v kategorijo aditivov. Aditiv je vsaka snov, ki se običajno ne uporablja oz. uživa kot živilo in ne predstavlja običajne sestavine živila, ne glede na to, ali ima hranilno vrednost ali ne, se pa namensko dodaja živilu iz tehnoloških in organoleptičnih razlogov v proizvodnji, pakiranju, za prevoz in hrambo, ima neposredne ali posredne učinke na živilo in postane sestavina živila (Zakon o zdravstveni..., 2000).

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Soja predstavlja do sedaj najbolj uspešno in razširjeno GS-rastlino. V letu 2006 je zasedala že več kot polovico površin za gojenje GS-rastlin (James, 2006). Komercialni sojin lecitin je, zaradi svoje funkcionalnosti in širokih možnosti uporabe v živilski in drugih industrijah, eden izmed najbolj pomembnih stranskih produktov industrije procesiranja sojinega olja (Szuhaj, 1983; Mahungu in Artz, 2002). Dokazano je, da postopki procesiranja sojinega

olja povzročijo koncentriranje sojine DNA v sojinem lecitinu, zato je v njem, v primeru izvora lecitina iz GS-soje, lahko prisotna gensko spremenjena dednina (Gryson in sod., 2002).

Posledica agresivnih fizikalnih in kemijskih postopkov, uporabljenih pri predelavi živil, je pogosto zmanjšana količina in kakovost DNA. S tem se zviša meja zaznavanja rekombinantne DNA (najnižja raven analita, ki se lahko zanesljivo zazna, glede na znano ciljno taksonomsko specifično število kopij genomov), kar lahko onemogoča določanje GSO (Anklam in sod., 2002). Zaradi zavedanja potrošnikov ter njihove pravice do izbire po lastni presoji, mora biti po določilih EU zagotovljeno jasno označevanje GSO. Prag za naključno prisotne dovoljene GSO v živilih in krmi je v Evropski Uniji (EU) 0,9 % (Regulation (EC) No. 1829/2003..., 2003). Učinkovit nadzor nad GSO zahteva torej ustrezne metode zaznave, identifikacije in kvantifikacije minimalnih zaznavnih koncentracij DNA v vzorcu (Anklam in sod., 2002).

Prvi korak in ena najbolj pomembnih in obenem tudi najdražjih stopenj v pridobivanju biomolekul, med drugim tudi rekombinantne DNA, je njihova osamitev in čiščenje (Štrancar in sod. 2002). Izbira najbolj ustrezne metode osamitve je odvisna od narave vzorca in nadaljnje uporabe DNA, temelji pa na kompromisu med učinkovitostjo metode in kakovostjo DNA (Somma, 2004). Številne metode osamitve DNA iz visoko procesiranega sojinega lecitina in olja ne zagotavljajo zadostne količine in kakovosti DNA, za uspešno zaznavo rekombinantne DNA (Meyer, 1999). Danes je ena izmed najbolj uporabnih metod, za osamitev DNA iz rastlin in živil rastlinskega izvora, metoda CTAB (heksadeciltrimetil amonijev bromid; ang. *cetyltrimethylammonium bromide*), ki pa iz lecitina pogosto osami zelo nizke količine DNA (Zimmermann in sod., 1998) in povzroča ko-ekstrakcijo inhibitorjev verižne reakcije s polimerazo (Hübner in sod., 1999a). Pomemben korak v razvoju in reševanju problemov osamitve in čiščenja biomolekul je tudi izpopolnjevanje tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) in uporaba monolitnih kromatografskih nosilcev, ki so se v preteklosti že izkazali kot uspešni v procesu ločevanja DNA in osamitve DNA iz procesiranih živil (Mihelič in sod., 2001; Jerman in sod., 2005).

1.2 CILJI DELA IN DELOVNA HIPOTEZA

Sojin lecitin pogosto vsebuje manjše količine sojine DNA, ki lahko nedvoumno dokažejo ali sojin lecitin izvira iz GS-soje in omogočajo jasno označevanje GSO, v skladu z zakonodajo EU. Cilj naše naloge je bil postaviti metodo oz. osamiti DNA GS-soje iz sojinega lecitina. Zaradi agresivnih postopkov pridobivanja sojinega lecitina je mogoče pričakovati, da se bo izvor lecitina iz GS-soje zabil.

V delovni hipotezi trdimo, da je količina DNA GS-soje v sojinem lecitinu zadostna za nedvoumen dokaz prisotnosti DNA in s tem izvora lecitina iz GS-soje.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KRATKA KRONOLOGIJA RAZVOJA GENSKO SPREMENJENIH (GS) ŽIVIL

Prvo uspešno kloniranje evkariontskega gena v bakterijo *Escherichia coli*, je bilo leta 1973 (Morrow in sod., 1974). Leta 1979 so ameriški znanstveniki uspeli proizvesti rekombinantni goveji somatotropin (rastni hormon rBST), z namenom povečanja proizvodnih kapacitet mleka pri kravah (Uzogara, 2000). Naslednja prelomnica v razvoju je bila uspešno kloniranje gena v rastlinske celice s pomočjo patogene bakterije *Agrobacterium tumefaciens* leta 1983 (Fraley in sod., 1983).

V obdobju od leta 1983 do 1989 je sledil hiter razvoj tehnologije rekombinantne DNA, ki je omogočila in še vedno omogoča genetsko transformacijo številnih rastlin in živali. Vlada Združenih držav Amerike (ZDA) je v tem obdobju odobrila uporabo rBST za povečanje proizvodnje mleka, kasneje (leta 1990) pa tudi uporabo rekombinantnega sirišča v proizvodnji sira (Uzogara, 2000; Jerman in Raspor, 2004).

V največji meri je razvoj tehnologije GS-živil zajel kmetijstvo. Začetki komercialne pridelave GS-rastlin, ki so dosegle širšo javnost, se navezujejo na transgeni tobak, odporen na virusno okužbo. Ta je bil prva GS-rastlina na tržišču. Prva GS-rastlina, ki je bila predlagana za tržno proizvodnjo kot živilo za ljudi je bil paradižnik Flavr Savr™, z upočasnim mehčanjem. Ta je leta 1994 postal prvo širše dostopno GS-živilo. Sledila so dovoljenja za komercialno pridelovanje bombaža in koroze z rezistenco za insekte in/ali herbicide; oljno ogrščico s spremenjeno kakovostjo olja; soje z rezistenco za herbicid; na insekte odporen paradižnik, idr. (James in Krattiger, 1996). Na evropskem tržišču se je kot prva GS-poljščina pojavila Roundup Ready® soja (RRS), sledila ji je Bt-koruzka (Raspor, 2002). Tehnologijo je do leta 2006 privzelo skupno 22 držav sveta, od tega polovica držav v razvoju (James, 2006).

2.2 ZAKONODAJA PODROČJA GENSKO SPREMENJENIH ORGANIZMOV (GSO)

2.2.1 Zakonodaja v Evropski Uniji

Področje GSO je v Evropski uniji zakonsko urejeno že od začetka devetdesetih let 20. stoletja. Vodilne smernice zakonske ureditve Evropske Unije (EU) v zvezi z GSO so predvsem (Franzone, 2002):

- poglobljena znanstvena presoja tveganj,
- ukrepi za obvladovanje tveganj, ki temeljijo na načelu previdnosti,
- obveščanje javnosti in njeno sodelovanje v procesu pridobivanja dovoljenja,
- sorazmernost predpisanih zahtev z ugotovljenim tveganjem in
- skladnost predpisanih zahtev z mednarodnimi obveznostmi EU.

Namen postopkov za odobritev izdelkov je zagotavljanje varnosti GSO in izdelkov iz GSO, za zagotovitev visoke ravni varstva življenja in zdravja ljudi, živali ter zaščite okolja. Organi oblasti morajo zagotoviti, da postopek pridobivanja dovoljenja za uporabo GSO spoštuje predhodno omenjene smernice oz. načela, da bo potrošnik lahko izbral po lastni presoji (Franzone, 2002).

Področje GS-živil urejajo številne direktive, uredbe in priporočila. Med najnovejše ter najpomembnejše danes veljavne sodijo (Questions and answers on the regulation ..., 2005; Šuštar-Vozlič, 2005; Cankar, 2006):

- Direktiva 2001/18/EC o namernem sproščanju GSO v okolje in o razveljavitvi Direktive Sveta 90/220/EEC (Directive 2001/18/EC..., 2001);
- Uredba št. 1829/2003 o GS-živilih in –krmi (Regulation (EC) No. 1829/2003..., 2003);
- Uredba št. 1830/2003 o sledljivosti in označevanju GSO ter sledljivosti živil in krme, proizvedenih iz GSO, ter o spremembi Direktive 2001/18/ES (Regulation (EC) 1830/2003..., 2003);
- Uredba Komisije št. 65/2004 o vzpostavitvi sistema za razvijanje in dodeljevanje posebnih identifikatorjev za GSO (Commission Regulation (EC) No. 65/2004..., 2004);
- Priporočilo Komisije 2004/787/EC o tehničnih navodilih za vzorčenje in odkrivanje GSO in materialov, proizvedenih iz GSO, v obliki proizvodov ali vsebovanih v proizvodih v okviru Uredbe (ES) št. 1830/2003 (Commission Recommendation 2004/787/EC..., 2004).

2.2.1.1 Sproščanje GSO v okolje

V državah Evropske unije je bila na področju GSO leta 1990 sprejeta Direktiva 90/220/EEC, o namernem sproščanju GSO v okolje (Council Directive 90/220/EEC..., 1990). Leta 2001 jo je nadomestila istoimenska Direktiva 2001/18/EC (Directive 2001/18/EC..., 2001). Namerno sproščanje je vsak nameren vnos GSO ali kombinacije GSO v okolje, za katerega se ne uporabljajo posebni zadrževalni ukrepi za omejitev stika s prebivalstvom in okoljem in za zagotovitev visoke ravni varnosti za prebivalstvo in okolje (Directive 2001/18/EC..., 2001). Direktiva zahteva od držav članic EU, da sprejmejo ustrezne ukrepe za zagotovitev sledljivosti in označevanja dovoljenih GSO v vseh fazah njihovega dajanja v promet (Šuštar-Vozlič, 2005). Direktiva se nanaša na 2 vrsti aktivnosti, in sicer namerno sproščanje GSO iz eksperimentalnih namenov (t.i. poljski poskusi) ter dajanje GSO na trg (kultivacija, uvoz, transformacija v industrijske izdelke) (Questions and answers on the regulation ..., 2005).

2.2.1.2 Sledljivost in označevanje

Zakonsko je bil v zadnjih letih vpeljan princip sledljivosti GSO. Sledljivost pomeni zmožnost slediti GSO in proizvodom, proizvedenim iz GSO, v vseh fazah njihovega dajanja v promet skozi proizvodne in distribucijske verige, kar v prehrabeni verigi pomeni od polja do mize. Določbe o sledljivosti proizvodov za živila in krmo, proizvedenih iz GSO zahtevajo, da se pri dajanju proizvodov, proizvedenih iz GSO, zagotovi, da se nosilcu dejavnosti, ki proizvod prejema, v pisni obliki prenesejo naslednje informacije (Regulation (EC) No. 1829/2003..., 2003):

- navedba vsake sestavine živila, ki je proizvedena iz GSO;
- navedba vsake sestavine ali dodatka krme, ki je proizveden iz GSO;
- pri proizvodih, za katere ni seznama sestavin, navedba, da je proizvod proizveden iz GSO.

Izvajanje sistema sledljivosti zahteva ustrezne metode zaznave oz. tehnična orodja določanja GSO, poleg tega pa je tudi strogo vezano na določbe o označevanju. Nižja kot je dovoljena meja, do katere ni potrebno označevanje, zahtevnejši in dražji so sistemi sledljivosti (Miraglia in sod., 2004).

Po določilih Uredb št. 1829/2003 in 1830/2003 morajo biti jasno označeni vsi proizvodi, ki vsebujejo ali so sestavljeni iz GSO, kot tudi vsa živila, ki so proizvedena iz GSO, če so ti v EU dovoljeni. Označena morajo biti vsa živila, ki pridejo neposredno do potrošnika, ne glede na to, ali še vsebujejo DNA ali beljakovino, ki izhaja iz genske transformacije, ali pa je ta že razgrajena. Vsak GSO ali izdelek iz GSO, mora biti opremljen s t.i. posebnim identifikatorjem, ki je ključen pri učinkovitem iskanju informacij o GSO. Gre za enostavno numerično ali alfanumerično kodo za identifikacijo GSO na podlagi transformacije, s pomočjo katere je bil razvit (Regulation (EC) No. 1829/2003..., 2003; Regulation (EC) No. 1830/2003..., 2003; Commission Regulation (EC) No. 65/2004..., 2004; Šuštar-Vozlič, 2005).

Ključno je zanesljivo in lahko razumljivo označevanje GSO, ki potrošniku omogoča, da ugotovi, ali izdelek, ki ga kupuje, vsebuje GSO ali iz GSO izhaja (Franzone, 2002). Pri označevanju predpakiranih in nepredpakiranih proizvodov, ki so sestavljeni iz ali vsebujejo GSO, morajo biti na etiketi (pri predpakiranih izdelkih) ali v predstavitvi proizvoda (pri nepredpakiranih izdelkih) vidne besede »ta proizvod vsebuje gensko spremenjene organizme« ali »ta proizvod vsebuje gensko spremenjeni [ime organizma(-ov)]«. Z novimi uredbami pa je bil vpeljan tudi znižan prag za naključno prisotna dovoljena GS-živila in krmo, ki znaša 0,9 %. Pod to vrednostjo označevanje ni potrebno, pod pogojem, da so ti sledovi naključni ali tehnično neizogibni (Regulation (EC) No. 1829/2003..., 2003; Regulation (EC) No. 1830/2003..., 2003). Med spravilom pridelka, skladiščenjem, transportom in predelavo lahko zlahka pride namreč do naključne prisotnosti GSO, vendar morajo predelovalci oz. proizvajalci dokazati, da so bili izvedeni vsi ustrezni ukrepi za preprečevanje neizogibne prisotnosti GSO. Za GSO, ki v EU še niso dovoljeni, so pa že dobili pozitivno mnenje agencije za varno hrano ali znanstvenega odbora, znaša prag, pod katerim označevanje ni potrebno 0,5 % (Šuštar-Vozlič, 2005). S tem se zagotovi, da so potrošniki v celoti in verodostojno obveščeni o GSO in iz njih proizvedenih izdelkih, živilih in krmi, ter jim je tako omogočena ozaveščena izbira proizvoda (Regulation (EC) No. 1829/2003..., 2003; Regulation (EC) No. 1830/2003..., 2003).

2.2.2 Zakonodaja v Sloveniji

Zakonodaja Republike Slovenije je v splošnem usklajena oz. se usklajuje z zakonodajo EU. Slovenija je sprejela številne zakone, ki urejajo področje GSO. Nekateri izmed danes veljavnih so (Žel, 2002; Nacionalna zakonodaja, ...2006):

- Zakon o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi (uradno prečiščeno besedilo): ZRGSO-UPB1, UL RS 23/2005 z dne 10.3.2005 (Zakon o ravnanju..., 2005);
- Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živilii: ZZUZIS, UL RS 52/2000 z dne 13.6.2000 (Zakon o zdravstveni..., 2000);
- Zakon o spremembah in dopolnitvah zakona o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živilii: ZZUZIS-A, UL RS 42/2002 z dne 15.5.2002 (Zakon o spremembah..., 2002).

ZRGSO ureja ravnanje z GSO in določa ukrepe za preprečevanje in zmanjševanje možnih škodljivih vplivov na okolje, še zlasti kar se tiče ohranjanja biotske raznovrstnosti. Določa tudi ukrepe za preprečevanje in zmanjševanje škodljivih vplivov na zdravje oz. dobrobit ljudi, do katerih bi lahko prišlo pri delu z GSO v zaprtih sistemih, pri namernem sproščanju GSO v okolje ali dajanju GSO ali izdelkov, ki vsebujejo GSO ali so sestavljeni iz njih ali njihovih kombinacij, na trg. Določila zakona ne veljajo za GS-živila in -krmo za prehrano ljudi in živali ter zdravila, ki jih urejajo posebni predpisi (Zakon o ravnanju..., 2005).

ZZUZIS določa pogoje, ki jih morajo izpolnjevati živila, aditivi za živila in izdelki ter snovi, ki prihajajo v stik z živilo, da so zdravstveno ustrezni. Določa tudi zdravstveni nadzor nad njihovo proizvodnjo in prometom z namenom, da se varuje zdravje ljudi, zaščitijo interesi potrošnika in omogoča nemoten promet na notranjem trgu in s tujino, spremljanje (monitoring) zdravstvene ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živilo ter medresorsko in mednarodno sodelovanje na področju zdravstvene problematike prehrane in prehranske politike. Zakon se, seveda skladno s predpisi, ki urejajo področje ravnanja z GSO, navezuje tudi na GS-živila (Zakon o zdravstveni..., 2000; Zakon o spremembah...2002).

V Sloveniji zaradi zavedanja problematike GSO poteka intenzivno sodelovanje pristojnih ministrstev, inšpekcijskih služb, laboratorija za določanje GSO, znanstvenikov s tega področja in nevladnih organizacij (Žel, 2002). Izvajanje zakonov omogočajo številne uredbe in pravilniki v zvezi z GSO (Nacionalna zakonodaja..., 2006).

2.3 GS-RASTLINE V SVETOVNEM KMETIJSTVU

2.3.1 Razvoj in aktualno stanje

Začetki komercialne pridelave GS-rastlin izvirajo iz republike Kitajske in se navezujejo na transgeni tobak, odporen na virusno okužbo, ki je bil prva GS-rastlina na tržišču. Sledil je nagel porast površin za gojenje GS-rastlin in privzetje nove tehnologije. Od leta 1996 do 2006 so se površine za gojenje GS-poljščin povečale za kar 60-krat. Med letoma 2005 in 2006 so se povečale za 13 % in so v letu 2006 obsegale že približno 102 milijona hektarov (James, 2006).

V skladu s povečevanjem površin za gojenje GS-poljščin se privzetju nove tehnologije vsako leto pridružijo nove države. V letu 2006 je bilo tako zabeleženih skupno 10,3 milijone kmetov iz 22 držav sveta, od tega 6 držav članic EU. Polovica omenjenih držav spada med države v razvoju. Po površini, namenjeni za gojenje GS-rastlin, je bilo leta 2006 vodilnih 14 držav, in sicer ZDA, Argentina, Brazilija, Kanada, Indija, Kitajska, Paragvaj, Južnoafriška republika, Urugvaj, Filipini, Avstralija, Romunija, Mehika in Španija. Površina je na državo znašala več kot 50000 hektarov (James, 2006).

Najbolj razširjena GS-poljščina v letu 2006 še vedno ostaja soja, ki predstavlja kar 57 % celotnih površin za gojenje GS rastlin. Sledijo ji koruza (25 %), bombaž (13 %) in oljna ogrščica (5 %). Prevladujoča, z genskim inženiringom dodana lastnost, pri poljščinah še vedno ostaja toleranca na herbicide, sledita pa ji odpornost na žuželke ter obe lastnosti

(toleranca na herbicid in odpornost na škodljivce) skupaj (James, 2006). Skupno je bilo v svetu do danes izdanih že preko 100 dovoljenj za transgene elemente, vključene v 21 vrst rastlin. Ti imajo bodisi dovoljenje za tržno pridelavo, sproščanje v okolje ali uporabo v prehrani ljudi in živali (GM database..., 2007).

Raziskave kažejo trend uresničevanja predvidenih potencialnih pozitivnih posledic gojenja GS-rastlin. Te so zmanjšanje uporabe pesticidov, vpliv na zmanjšanje količine toplogrednih plinov v ozračju ter verjetno najpomembnejše – zmanjšanje svetovne lakote za 50 % do leta 2015 (James, 2006).

2.3.2 GS-poljščine in -živila v Evropski Uniji

Vodilna država EU, ki goji GS-rastline, je bila v letu 2006 Španija; poleg te, pa gojijo GS-rastline v EU še Francija, Češka, Portugalska, Nemčija in Slovaška (James, 2006).

Pred začetkom veljave Uredbe št. 1829/2003 (Regulation (EC) No. 1829/2003...2003), torej do 18. aprila 2004, je bilo na trgu EU prisotnih 26 izdelkov (hrana in krma), ki so sestavljeni iz GSO ali pa vsebujejo GSO. Nova zahteva po pridobitvi dovoljenja za GSO je pokazala, da gre za izdelke iz 12 linij koruze, 6 linij oljne ogrščice, 5 linij tobaka, linijo soje ter biomaso in kvasno kremo (ang. yeast cream). Ti izdelki se lahko zakonito sproščajo na trg EU (Notification of existing products..., 2005; Questions and answers on GMO..., 2005).

2.3.3 GS-poljščine v Sloveniji

Kar se tiče kmetijstva je za Slovenijo značilna precej majhna površina njiv v absolutnem smislu in po površini na prebivalca ali kmetijo, zato je intenzivna predelava poljščin, za konkurenčnost na evropskem in svetovnem trgu otežena. Če upoštevamo še skrb za okolje ter zahteve po zdravi in neoporečni hrani je precej očitno, da je razvoj kmetijstva v Sloveniji usmerjen predvsem v ekološko in sonaravno poljedelstvo. Tudi pri krmi za domače živali se od dobaviteljev ponavadi zahteva certifikat o odsotnosti GS-rastlin v krmi (Šuštar-Vozlič in Meglič, 2002).

Če se osredotočimo na pridelovanje koruze, soje in oljne ogrščice je razvidno, da sta med bolj perspektivnimi poljščinami predvsem koruza in oljna ogrščica. Pridelovanje soje pri nas ni razširjeno, vzroki pa so predvsem v razmeroma hladnem podnebju, premajhni industriji za odkup izdelkov ter neprimernosti soje za neposredno uporabo v prehrani živali (potrebna predhodna obdelava). Pri vseh treh poljščinah uporaba GS-hibridov v Sloveniji zaenkrat ne bi imela pozitivnih ekonomskih učinkov, saj je mogoče s sodobnimi herbicidi rastline brez težav zaščititi do te mere, da pleveli ne povzročijo omembe vredne gospodarske škode (Šuštar-Vozlič in Meglič, 2002).

Slovenija je glede GS-rastlin zadržana. Za sajenje je dovoljena le ena vrsta GS-koruze. V hrani in krmi so dovoljene GS-soja in nekaj vrst GS-koruze ter GS-oljne ogrščice. GS-živila se na policah slovenskih trgovin pojavljajo le redko (Žel, 2007). Po podatkih Statističnega urada Republike Slovenije je Slovenija v letu 2005 največ soje uvozila iz Avstrije, medtem ko sta v letu 2006 (jan – nov) kot izvoznici občutno prevladovali

Brazilijska in Paragvaj, ki spadata med države z intenzivno pridelavo GS-poljščin, med drugim tudi GS-sojo. Kar se tiče uvoza lecitina in fosfoaminolipidov, smo teh v letu 2005 in 2006 največ uvozili iz Italije in Nemčije (James, 2006; Statistični urad..., 2005; Statistični urad..., 2006). Poleg tega uvažamo še številne končne izdelke, katerih surovine bi lahko bile gensko spremenjene. Pričakujemo lahko, da se bodo v prihodnosti na slovenskem tržišču GS-poljščine in GS-izdelki pojavljali vedno bolj pogosto in bo učinkovit nadzor nad njimi vedno bolj pomemben (Jerman, 2004).

2.4 SOJIN LECITIN

Sojin lecitin je zelo uporaben stranski proizvod procesiranja sojinega olja. Dokazano je, da postopki procesiranja povzročijo koncentriranje DNA v sojinem lecitinu, zato le-ta, v primeru izvora lecitina iz GS-soje, lahko vsebuje DNA GS-soje (Gryson in sod., 2002). V nadaljevanju so opisane glavne značilnosti sojinega lecitina, s poudarkom na nekaterih postopkih procesa njegove proizvodnje, ki vpliva na to, kje in v kakšni količini se sojina DNA po predelavi nahaja ter kakšna je njena kakovost (Pauli in sod., 1998; Gryson in sod., 2002; Gryson in sod., 2004).

2.4.1 Sestava

Lecitin je kompleksna mešanica fosfatidov, trigliceridov, fitoglikolipidov, fitosterolov, tokoferolov in maščobnih kislin. Redkeje se izraz nanaša le na fosfolipid fosfatidilholin. Primarni vir lecitina, kot naravnega emulgatorja za uporabo v proizvodnji živil, je soja, natančneje sojino olje. Ostali viri lecitina so pogosto tudi koruza, sončnice, bombažno seme, oljna ogrščica, jajca in arašidi (Szuhaj, 1983; Mahungu in Artz, 2002).

Glavna funkcionalna sestavina sojinega lecitina so fosfolipidi. Surovo olje soje vsebuje običajno 1 – 3 % fosfolipidov (Haraldsson, 1983). Tipična fosfolipidna sestava surovega lecitina je 15 % fosfatidilholina, 13 % fosfatidiletanolamina, 9 % fosfatidilinozitola in 2 % fosfatidilserina. Sestava vpliva na funkcionalnost lecitina; večja količina fosfatidilholina favorizira nastanek emulzije olja v vodi; večja količina fosfatidilinozitola pa emulzije vode v olju. Pogosto je sestava lecitina odvisna od klimatskih razmer in sestave tal, v katerih raste soja; časa pobiranja pridelka, shranjevanja pridelka, ekstrakcije olja in uporabljenih pogojev procesa za pridobivanje lecitina (Szuhaj, 1983; Mahungu in Artz, 2002).

2.4.2 Predelava soje

Primarno se soja uporablja za hrano ljudi, pomemben sekundarni proizvod predelave soje pa je sojino olje iz katerega se pridobiva lecitin. Proces se začne na polju. Pobiranju soje sledi transport in nato številni pripravljalni postopki kot je mehansko ali ročno mlatenje, za ločitev sojinega zrna od stroka. Pomemben nadaljnji korak je čiščenje, ki se ga ponavadi izvaja večkrat. Mehansko se odstrani ostanke prsti, kamenja, rastlin, semen plevela, insektov itd. Očiščena sojina zrna se nato sušijo, trejo in lupijo. Oluščena sojina zrna se stiska oz. zvalja v kosmiče, pri čemer se zaradi poškodbe oljnih celic izceja sojino olje (Anderson, 1996; Soybean processing, 2007). Priporočena vlažnost kosmičev pred nadaljnjo obdelavo je približno 8 - 12-odstotna, temperatura pa 71 – 77 °C (Williams in Hron, 1996). Sledi solventna ekstrakcija z uporabo heksana, zaradi potencialne toksičnosti

heksana pa se včasih uporabljajo tudi alternativna topila, pa tudi superkritična ekstrakcija z ogljikovim dioksidom (Friedrich in List, 1982; Erickson, 1983). Kosmiči iz katerih se je izcedilo olje, se dalje lahko uporabijo za proizvodnjo koncentratov sojinih proteinov, krme za živali, sojine moke itd. Pridobljeno olje se filtrira in se lahko shranjuje pri temperaturi 43 – 48 °C, pogosto pa kar pri sobni temperaturi. Sojino olje za humano uporabo mora za tem preiti še proces degumiranja in rafiniranja, da se odstranijo neželjene v olju topne snovi (Haraldsson, 1983; Anderson, 1996; Soybean processing, 2007).

2.4.3 Pridobivanje sojinega lecitina

Postopke obdelave olja, namenjenega za humano uporabo, pri katerih se odstranijo predvsem v olju topne nečistoče, imenujemo v skupnem imenu rafiniranje. Proces najpogostejše sestavlja degumiranje, fizikalno ali kemijsko rafiniranje, beljenje in deodorizacija (Haraldsson, 1983).

Glavni postopek s katerim se fosfolipide, iz katerih se proizvaja komercialni lecitin, loči od olja je degumiranje. Izraz označuje postopek, ki odstrani fosfolipide in nekatere druge sluzaste snovi iz olja, pri tem pa ne spremeni kislosti olja. Postopek ima tri namene; odstranitev čim večje količine fosfolipidov iz olja, ki je nato primerno za daljše shranjevanje; priprava olja na fizikalno rafiniranje; ali pa pridobitev zelo uporabnega stranskega produkta – lecitina (Anderson, 1996). Pred fizikalnim rafiniranjem je degumiranje nujno, medtem ko kemijsko oz. alkali rafiniranje ne zahteva degumiranja (Hodgson, 1996). Poznamo več principov degumiranja; z uporabo vode oz. vodne pare; z uporabo vode in kisline (t.i. superdegumiranje z dodatkom očetne kisline), z uporabo kisline, ki ji sledi dodatek baze; samo z uporabo baze (amonijev hidroksid); v novejšem času pa tudi s pomočjo encimov (Haraldsson, 1983; Hodgson, 1996). Pri najbolj preprostem degumiranju se surovemu olju, s počasnim mešanjem pri 50 - 70 °C (ponekod tudi 95 °C), doda do 3 % vodne pare ali vode, da postopoma pride do hidracije lecitina. Pri 20 – 30 min mešanju se preprečuje dostop zraka, da olje ne oksidira. Gre v bistvu za solventno ekstrakcijo, pri čemer hidracija lecitina povzroči ločitev lecitina od olja in tvorbo skupkov. Na ta način se odstranijo predvsem fosfolipidi, ki zlahka tvorijo vezi z vodo; tisti bolj hidrofobni pa zahtevajo dodatek kemijskih snovi (Haraldsson, 1983; Sipos in Szuhaj, 1996). Pogosto se dodaja fosforna kislina ali pa citronska kislina, čemur lahko sledi še nevtralizacija z dodatkom natrijevega hidroksida (NaOH). V novejšem času se uporablja tudi encimsko degumiranje s pomočjo mikrobne fosfolipaze, ki odcepi eno od maščobnih kislin s fosfolipida in mu poveča hidrofilnost (Erickson, 1983; Forster in Harper, 1983; Yang in sod., 2006). Ločevanje se pospeši z nadaljnjim centrifugiranjem, po potrebi večkratnim. Degumirano olje se naprej obdeluje, medtem ko se lecitin suši v izparjevalniku ali vakuumsko, pri temperaturi 60 – 80 °C in procesira do različnih komercialnih izdelkov (Haraldsson, 1983; Szuhaj, 1983; Sipos in Szuhaj, 1996; Mahungu in Artz, 2002).

V idealnih pogojih se z degumiranjem pridobi lecitin, sestavljen iz 40 – 50 % vode in 65 – 70 % fosfatidov (Szuhaj, 1983). Pogosto pa lecitin po ekstrakciji vsebuje še ogljikove hidrate, proteine, težke kovine in druge nečistoče, katerih prisotnost, po regulatornih standardih, v komercialnem lecitinu ni dovoljena. Te se odstrani s pomočjo filtracije, dialize ali adsorpcije na celulozni material. Pogosto se zahteva tudi frakcionacija lecitina, s

katero lahko, s pomočjo različnih organskih topil (aceton, etanol, idr.), iz mešanice grobo ločimo različne fosfolipide, ki jih lahko uporabimo kot emulgatorje (Pickard in sod., 1996). Pred sušenjem se, glede na potrebe, prilagodi še barvo in viskoznost lecitina. Barvo se prilagaja z beljenjem s pomočjo dodatka do 1,5 % vodikovega ali benzoil peroksida. Ta obenem prepreči tudi kvar lecitina zaradi prisotnih bakterij. Viskoznost lecitina se regulira z dodatkom sojinega olja, maščobnih kislin ali kalcijevega klorida (Szuhaj, 1983).

2.4.4 Uporaba sojinega lecitina

Komercialni lecitin je, zaradi svoje funkcionalnosti in širokih možnosti uporabe v živilski in drugih industrijah, eden izmed najbolj pomembnih stranskih produktov industrije procesiranja olja. Lecitin se uporablja kot aditiv v hrani, ponavadi v koncentraciji 1 – 2 %. Številne aplikacije v živilih prikazuje preglednica 1. Že od začetka uporabe je bil, predvsem zaradi naravnega izvora, še posebno zaželen pred drugimi, umetnimi aditivi. Poleg uporabe v živilih, se uporablja tudi pri proizvodnji farmacevtskih izdelkov, kozmetike, barve, plastike, gume, papirja, asfalta in kovin (Szuhaj, 1983).

Najpogosteje se lecitin uporablja kot emulgator. Je površinsko aktivna snov, ki zaradi svojih strukturnih lastnosti omogoča nastanek emulzij. Na mejni fazi med lipidi in vodo tvori plast, na katero se hidrofilno vežejo molekule vode, hidrofobno pa molekule lipidov. Zaradi nastanka te plasti se močno zmanjša medfazna površinska napetost med omenjenima fazama (Klofutar, 1994).

Preglednica 1: Uporaba in funkcija sojinega lecitina v živilstvu (Szuhaj, 1983; Mahungu in Artz, 2002)

Uporaba sojinega lecitina	Funkcija sojinega lecitina
margarina, majoneza	emulgator
čokolada, karamela in oblivi	kontrola viskoznosti, preprečevanje zlepljanja, kontrola kristalizacije
instant hrana (kakav v prahu, pudingi)	emulgator in sredstvo za vzdrževanje vlage
pekovski izdelki (krofi, torte, piškoti, pite)	emulgator, sredstvo za vzdrževanje vlage in ločevanje
siri	emulgator in sredstvo za preprečevanje zlepljanja
meso in perutnina, hrana za živali	sredstvo za porjavenje, emulgator, prehranski dodatek, ...
solatni preliv	emulgator in kontrola kristalizacije
mlečni izdelki in nadomestki	emulgator, sredstvo za vzdrževanje vlage, ...
pakiranje izdelkov	sredstvo za učinkovitejšo zapiranje embalaže
procesna oprema (površine za peko in cvrtje, mešalniki, sušilniki)	mazivo (lubrikant)
prehranski dodatek (tekoč, v granulah, v kapsulah)	potencialni učinek na zniževanje holesterola, zaviranje staranja in izboljšanje spomina

2.5 OSNOVE TEHNOLOGIJE REKOMBINANTNE DNA

2.5.1 Osnove genske transformacije rastlin

Kot GS-rastline označujemo le rastline z vnesenimi osamljenimi geni (Bohanec, 2004). Kot GSO in s tem posledično kot GS-rastline ne moremo označiti rastlin, ki so nastale z

mutagenozo, celično ali protoplastno fuzijo ter samo-kloniranjem (Zakon o ravnanju..., 2005). Osnovne metode genskega inženiringa so bile najprej razvite pri bakterijah, od sredine osemdesetih let prejšnjega stoletja pa jih je možno z manjšimi modifikacijami uporabljati praktično na vseh živih organizmih. Metode se seveda tudi danes ne prestopajo in dopolnjujejo (Bohanec, 2004).

Osnovne značilne stopnje rekombinantne tehnologije so (Bohanec, 2004):

1. osamitev DNA molekule (tuja oz. insertna DNA) iz donorskega organizma;
2. rezanje pridobljene DNA z restriktivnimi encimi – endonukleazami;
3. ponovno združevanje (lepljenje oz. ligacija) rezane DNA z drugo DNA iz klonskega vektorja (bakterijskega plazmida, bakteriofaga, kozmida, fagemida, ...) in s tem nastanek DNA konstrukta oz. rekombinantne DNA molekule;
4. vnos DNA konstrukta v gostiteljsko celico oz. transformacija (vnos v bakterijsko, rastlinsko celico);
5. namnoževanje vnesenega DNA konstrukta;
6. ločevanje gostiteljskih celic, ki so sprejele DNA konstrukt, od ostalih celic in identifikacija.

Gene, ki jih želimo vnesti v rastline, se pripravi v obliki plazmidne DNA, ki se namnožuje v bakterijah, najpogosteje v bakteriji *Escherichia coli*. Sledi vnos namnoženega DNA konstrukta v rastlinske celice in vgradnja v kromosomsko DNA. Pri vnosu v rastlinske celice se v splošnem lahko poslužujemo neposrednega (vnos gole DNA) in posrednega načina (vnos s pomočjo vektorjev) (Bohanec, 2004).

Najpogosteje uporabljena metoda vnosa genov v rastline je z bakterijo *Agrobacterium tumefaciens*, ki določene gene iz svojega genoma (T-DNA s plazmida Ti) v rastlinski genom vnaša naravno. Na omenjeni del genoma se vnese želeni »tují« gen (transformacijski dogodek oz. ang. transformation event) (Žel, 2004).

Pri rastlinah, ki jih bakterija *A. tumefaciens* težko okužuje, se uporablja tudi metoda vnosa z gensko puško – biolistika. DNA se, na zelo majhnih delčkih zlata ali tungstena, s pomočjo omenjene puške izstrelji v rastlino. Manj pogosto uporabljeni sta še metoda vnosa s silikonskimi vlakni in elektroporacija (Žel, 2004).

2.5.2 GS-soja

Soja je najuspešnejša GS-poljščina, saj je v letu 2006 predstavljala kar 57 % celotnih površin za gojenje GS-rastlin (James, 2006). Toleranca na herbicid glifosat v soji je, glede na obseg tržne pridelave, najuspešnejša genska sprememba. Omenjena GS-soja (*Glycine max* L.), ki spada v 1. generacijo GS-rastlin, je v EU dovoljena linija GTS 40-3-2 in nosi tržno ime Roundup Ready[®] soja (Querci in Mazzara, 2004). Toleranco na herbicid glifosat ji omogočajo z biolistično metodo vneseni geni (slika 1). Ti omogočajo sintezo encima EPSPS (5-enol-piruvil-šikimat-3-fosfat sintaza) in njegovo sodelovanje v biosintezi aminokislin, kljub prisotnosti herbicida. Omenjena soja se ponekod po svetu, kjer je to zakonsko dovoljeno, uporablja za gojenje, pa tudi za procesiranje in proizvodnjo hrane in krme (Javornik, 2004).

Druga dva načina tolerance na glifosat, ki je značilen za nekatere GS-rastline, sta možna tudi preko vstavitve gena *gox* iz bakterije *Ochrobactrum anthropi* za encim glifosat oksidoreduktazo, ki razgradi glifosat; ali vstavitvijo gena *epsps*, ki je bil osamljen iz koruze, spremenjen z *in vitro* mutagenezo in kodira za glifosat neobčutljiv encim (Javornik, 2004).

Poleg regulatornega elementa in gena za vstavljeno lastnost, vsebuje GS-soja, tako kot večina obstoječih GSO še elemente, potrebne za izražanje novega proteina. To sta promotorsko in terminatorsko zaporedje, ki ju pogosto določujemo s presejalno analizo. Promotor je zaporedje, ki označuje začetek prepisovanja DNA. Terminator je zaporedje, ki deluje kot stop signal in označuje konec prepisovanja DNA (Mariotti in sod., 2002; Miraglia in sod., 2004). Večina GS-rastlin nosi v ta namen promotor 35S iz mozaičnega virusa cvetače (CaMV) in/ali terminator NOS za nopalinsko sintazo, ki izvira iz Ti plazmida bakterije *Agrobacterium tumefaciens*, možna pa je tudi zaznava vstavljenega gena za rezistenco na določen antibiotik (Mariotti in sod., 2002; Holst-Jensen in sod., 2003; Žel in sod., 2004).

rastlinska DNA	P-35S	Petunia EPSPS CTP	CP4 EPSPS	T-NOS	rastlinska DNA
----------------	--------------	------------------------------	----------------------	--------------	----------------

Slika 1: Shema primera vstavljenih genskih elementov v Roundup Ready[®] soji (**P-35S**: promotor za 35S podenoto ribosoma iz cvetačnega mozaičnega virusa (CaMV); **T-NOS**: terminator nopalinskega gena iz bakterije *Agrobacterium*; **CP4 EPSPS**: gen *AroA* za 5-enol-piruvil-šikimat-3-fosfat sintazo, na glifosat tolerantan encim iz bakterije *Agrobacterium tumefaciens*, sev CP4; **Petunia EPSPS CTP**: gen za kloroplastni tranzitni peptid (CTP), ki olajša vnos novo nastale sintaze v kloroplaste, kjer deluje glifosat) (Mariotti in sod., 2002; Javornik, 2004; Querci in Mazzara, 2004; Žel, 2004; Žel in sod., 2004)

Danes ima dovoljenje za tržno pridelavo, sproščanje v okolje ali uporabo v prehrani živali in ljudi že 6 linij GS-soje. Poleg omenjene soje s toleranco na glifosat, je npr. poznana tudi soja s toleranco na herbicid glufosinat in linije soje z zapisi za nekatere lastnosti, ki izboljšujejo njeno prehransko vrednost (preglednica 2). Soja s toleranco na glufosinat nosi gena *pat* in *bar* iz bakterij *Streptomyces viridochromogenes* in *S. hygroscopicus*, ki kodirata encim PAT (fosfinotricin-N-acetiltransferaza), ki z acetilacijo proste amino skupine glufosinata povzroči njegovo inaktivacijo (Javornik, 2004).

Preglednica 2: Pregled v svetu obstoječih linij oz. transformacijskih dogodkov (ang. transformation event) GS-soje z dovoljenjem za tržno pridelavo, sproščanje v okolje ali uporabo v prehrani ljudi in živali (GM database..., 2007)

Transformacijski dogodki	Odgovorna družba	Lastnost
A2704-12, A2704-21, A5547-35	Aventis CropScience	toleranca na glufosinat
A5547-127	Bayer CropScience (Aventis CropScience (AgrEvo))	toleranca na glufosinat
G94-1, G94-19, G168	DuPont Canada Agricultural Products	visoka koncentracija oleinske kisline
GTS 40-3-2	Monsanto Company	toleranca na glifosat
GU262	Bayer CropScience (Aventis CropScience (AgrEvo))	toleranca na glufosinat
W62, W98	Bayer CropScience (Aventis CropScience (AgrEvo))	toleranca na glufosinat

2.6 OSAMITEV DNA

Prvi korak v naboru tehnik rekombinantne DNA je osamitev DNA. Ekstrakcija DNA iz biološkega materiala zahteva v splošnem lizo celic, inaktivacijo celičnih nukleaz in ločevanje DNA od celičnih ostankov. Lizo celic dosežemo mehansko, kemično ali encimsko; ključen pa je uspešen kompromis med učinkovitostjo metode in kakovostjo (razgrajenostjo, prisotnostjo inhibitorjev) osamljene DNA. Učinkovite metode ločevanja DNA od celičnih ostankov so ponavadi kombinacije ekstrakcije in obarjanja; centrifugiranja, kromatografije in kombinirane imobilizacije DNA in magnetne separacije (Somma, 2004).

Upoštevač problematiko osamitve DNA, ki je podrobneje opisana v poglavju 2.9, ima analitik za osamitev in čiščenje na voljo več različnih metod. Izbira najbolj ustrezne je odvisna od tarčne nukleinske kisline, izvornega organizma, tipa vzorca (rastlinski material, semena, tkivo, procesiran material, ...), želenih rezultatov in nadaljnje uporabe osamljene DNA (Somma, 2004).

2.6.1 Heksadeciltrimetil amonijev bromid (CTAB) metoda

Metoda CTAB je bila leta 1980 razvita za hitro osamitev DNA iz rastlin (dolžine 50 kbp in več), in sicer jedrne, kloroplastne in mitohondrijske. Danes je metoda ena izmed najbolj uporabnih metod za osamitev DNA iz rastlin in živil rastlinskega izvora. Osamljena DNA je zadovoljivo očiščena nečistoč, npr. polisaharidov in polifenolov, ki so težko odstranljivi, in ki lahko motijo delovanje uporabljenih restrikcijskih endonukleaz (Murray in Thompson, 1980; Van den Eede in sod., 2004).

Metoda je v grobem sestavljena iz treh faz: lize celične membrane, ekstrakcije genomske DNA in njenega obarjanja. CTAB je kationski detergent, ki ga vsebuje začetni ekstrakcijski pufer. Zaradi podobne sestave, detergent ujame proteine in lipide membrane v svojo strukturo in s tem lizira membrano rastlinske celice in jedrno membrano. Pri pogojih nizke koncentracije soli tvori CTAB netopen kompleks z nukleinskimi kislinami, pri pogojih visoke koncentracije soli pa se kompleks z DNA raztaplja. Pufrsko kapaciteto raztopine zagotavlja Tris HCl; EDTA (ang. ethylenediaminetetraacetic acid) pa veže magnezijeve ione (Mg^{2+}) in s tem zmanjša aktivnost prisotnih encimov DNaz, ki razgrajujejo DNA. Nečistoče se odstranijo v fazi spiranja s kloroformom, ki denaturira proteine in pospeši ločevanje vodne in organske faze; ter pri pogojih nizke koncentracije soli, ko nečistoče ostanejo v supernatantu in so odstranjene, DNA pa je vezana v kompleksu s CTAB. V zadnji fazi se DNA, pri pogojih povišane koncentracije soli, sprosti z detergenta, se raztopi in s pomočjo izopropanola obori. Ostanke soli se odstranijo s pomočjo dodatnega spiranja s 70-odstotnim etanolom (Murray in Thompson, 1980; Gryson in sod., 2004; Somma, 2004).

Opisana metoda osamitve je v današnjem času pogosto uporabljena v molekularni genetiki in je že bila testirana in validirana za uporabo v postopku zaznave GSO (Zimmermann in sod., 1998; Lipp in sod., 1999; Lipp in sod., 2001; Gryson in sod., 2004). Zaradi prilagajanja metode raznolikosti vzorcev, med drugim tudi lecitinu, iz katerih je potrebno osamiti DNA, so bile razvite številne prilagoditve in dopolnitve osnovne metode CTAB

(Meyer in Jaccaud, 1997; Hupfer in sod., 1998; Zimmermann in sod., 1998; Hotzel in sod., 1999; Poms in sod., 2001; Gryson in sod., 2004).

2.6.2 Druge metode osamitve DNA

Za osamitev DNA iz hrane so bile preizkušene že številne metode. To so številne konvencionalne metode; komercialni kompleti, kjer gre za uporabo silikatnih membran ali magnetnih delcev; v zadnjih letih pa tudi kromatografske metode, npr. tekočinska kromatografija visoke ločljivosti oz. krajše HPLC (Terry in sod., 2002). Princip ločevanja in čiščenja DNA s pomočjo HPLC sistema je podrobneje opisan v poglavju 2.7.

Za osamitev DNA iz surovega materiala, kot sta soja, koruza in njuni derivati, vključno s sojinim lecitinom in oljem, je bilo uporabljenih oz. preverjenih mnogo različnih metod. Med njimi so, poleg metode CTAB, tudi t.i. metode Wizard, DNeasy, Nucleon phytopure, ROSE, ROSEX, Alkali, AlkaliX, Chelex 100, SDS/proteinase K, idr. Za lecitin je predlagana uporaba DNA-vezavnih silikatnih kolon (Wizard™), ki očisti DNA direktno iz raztopine, ki jo prodobimo z encimatsko (proteinaza K) ali kemijsko (SDS oz. natrijev dodecilsulfat) obdelavo vzorca živila. Omenjene metode so zagotovile bodisi zelo nizke količine relativno kakovostne DNA ali pa večje količine DNA slabe kakovosti (Zimmermann in sod., 1998).

V splošnem je za vzorce z visoko vsebnostjo maščob, kakršen je tudi sojin lecitin, priporočljiva predhodna obdelava vzorca s heksanom in kloroformom (Terry in sod., 2002). Za lecitin je bila preverjena tudi metoda osamitve DNA z uporabo ekstrakcijskega pufra, ki je vseboval gvanidin tiocianat ter dodatkom heksana. Po inkubaciji in centrifugiranju je sledila še faza čiščenja vodne faze s kloroformom in obarjanje DNA z izopropanolom. Metoda se je izkazala za uspešno, saj so z njo uspešno osamili DNA iz sojinega lecitina, ki se je izkazala kot primerna tudi za pomnoževanje v PCR (Wurz in sod., 1998).

2.7 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)

Za odkritje kromatografije štejemo leto 1906. Izraz kromatografija označuje separacijski postopek, ki omogoča ločevanje posameznih komponent vzorca in zaznavo teh z ustreznim detekcijskim sistemom, s ciljem kvalitativne ali kvantitativne analize. Molekule oz. komponente se ločijo med seboj na podlagi njihovih različnih fizikalnih in kemijskih interakcij z mobilno in stacionarno fazo. Na poti skozi kromatografsko kolono, ki je glavni del instrumenta, molekule vzorca ves čas prehajajo med mobilno in stacionarno fazo. V mobilni fazi poteka snovni prenos molekul na osnovi konvektivnega transporta, v stacionarni fazi pa poteka difuzivni transport skozi področja, v katerih tekočina miruje (Žorž, 1991; Barut, 1999).

HPLC je poleg obarjanja in ultrafiltracije pomemben separacijski proces (Štrancar in sod., 2002). Začetki HPLC segajo v šestdeseta leta 20. stoletja, ko je bil izdelan prvi ustrezeni komercialni HPLC instrument. HPLC omogoča ločevanje snovi na osnovi adsorpcije, porazdelitve, ionske izmenjave ali velikosti molekul (Sepčič in sod., 1997). Najenostavnejši HPLC sistem je sestavljen iz rezervoarja za mobilno fazo, črpalke,

injektorja, kromatografske kolone, detektorja in instrumenta za zapis signala (računalnik). Vzorec se dozira skozi injektor, kar mora predstavljati čim manjšo motnjo stacionarnih pogojev ločbe. Enakomeren pretok mobilne faze skozi kolono, ki ga zagotavljajo visokotlačne črpalke, je ključen za natančnost analize. Sistem črpalk lahko omogoča izokratsko ali pa gradientno elucijo. Pri izokratski eluciji se črpa skozi kolono le ena mobilna faza s konstantnim razmerjem topil. Simultano ločbo zmesi substanc, katerih polarost se giblje v širokem območju, pa lahko dosežemo z gradientno elucijo. V ta namen potrebujemo dodatno črpalko, mešalno komoro in dodatno mobilno fazo z drugačno sestavo (komponenta (b)), katere izbiro narekuje vzorec. S pomočjo računalniško krmiljenega programa pretoka linearno, stopničasto ali eksponentno večamo količino komponente (b) v mobilni fazi. S tem se skrajša čas analize in obenem izostrijo posamezni vrhovi (Žorž, 1991). Eluirane frakcije lahko analiziramo z različnimi tipi detektorjev, kot so npr. UV-VIS (ang. ultraviolet visible spectroscopy) absorpcijski detektor, fluorescenčni detektor ter refrakcijski oz. RI detektor (ang. refractive index detector) (Sepčič in sod., 1997). Slednji, vsaj v normalni izvedbi, izključuje gradientno elucijo. Najbolj uporaben, zaradi svoje enostavnosti, selektivnosti in občutljivosti, je UV-VIS detektor (Žorž, 1991).

Kromatografske metode, so se v preteklosti uporabljale predvsem za osamitev proteinov iz živalskih tkiv, mikrobnih kultur in rastlin. V novjšem času pridobivajo pomen tudi pri osamitvi biomolekul, npr. rekombinantnih proteinov, peptidov, polisaharidov in nukleinskih kislin (Levison in sod., 1998).

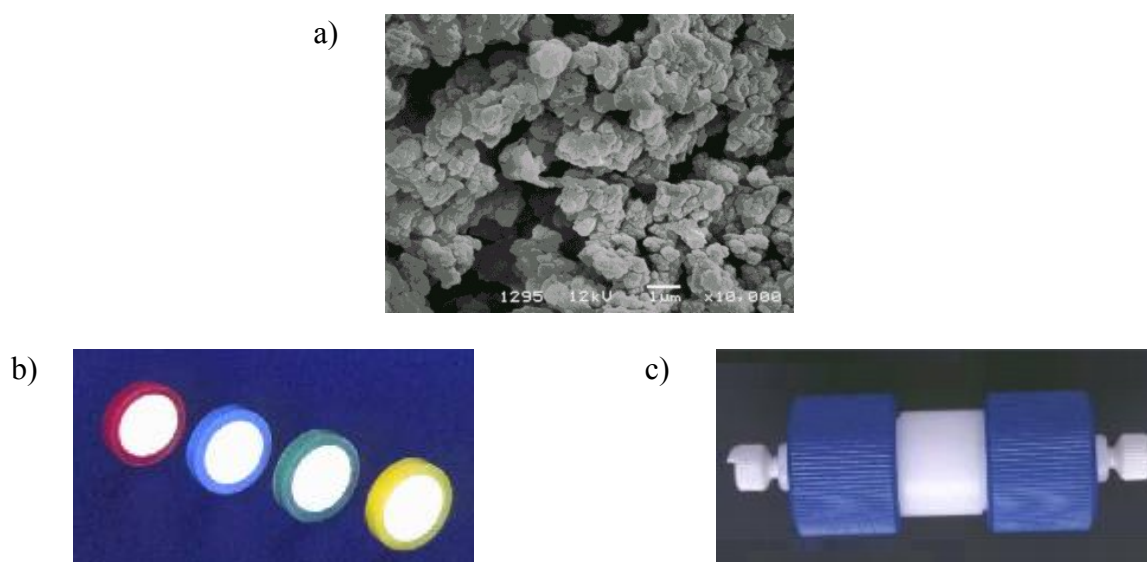
2.7.1 Osamitev biomolekul s HPLC

Poglavitni problem, ki nastopa pri ločevanju predvsem velikih biomolekul, je povezan z dejstvom, da imajo velike molekule majhno lastno difuzivnost in je zato čas, ki je potreben, da taka molekula difundira skozi sloj negibljive tekočine, sorazmerno dolg (Leonard, 1997). V ta namen se je začel razvoj kromatografskih nosilcev oz. stacionarnih faz, v smeri hitrejšega in učinkovitejšega ločevanja, obenem pa tudi ohranjanja biološke aktivnosti biomolekul (Unger in sod., 1987). Hitrejše ločevanje se je začelo z razvojem na področju oblike in dolžine uporabljenih kolon oz. nosilcev ter hidrodinamike (Barut in sod., 2003). Nekaj težav tradicionalnih poroznih nosilcev, predvsem nedostopnost majhnih por za biomolekule, je pomagal odpraviti npr. razvoj makroporoznih nosilcev ter t.i. mikropelikularnih (silikatnih) stacionarnih faz oz. nosilcev, ki so se izkazali za uspešne pri ločevanju dvoverižne DNA. Slednji so delno omejili tipične probleme kromatografije, kot je počasen prenos oz. difuzija biomolekul in posledično širjenje kromatografskih vrhov, ki so diktirali uporabo manjših hitrosti pretoka mobilne faze in manj učinkovitih gradientov elucije, kar je do tedaj povzročalo slabše in počasnejše ločevanje (Huber, 1998).

Pomemben korak v razvoju in reševanju problemov osamitve in čiščenja biomolekul predstavljajo monoliti. Izraz monolit označuje strukturo v enem kosu. Gre za rigidno makroporozno strukturo funkcionalnega organskega ali anorganskega polimera, ki je sestavljen iz močno prepletenih in med seboj povezanih kanalčkov, skozi katere potuje mobilna faza. Mednje spadajo tudi mehansko in kemično zelo stabilni CIM[®] diski (ang. convective interaction media; BIA Separations, Ljubljana, Slovenija) (Mihelič in sod., 2001).

2.7.2 Monolitni kromatografski nosilci CIM[®] (convective interaction media)

CIM[®] diski so nosilci za stacionarne faze, pogosto proizvedeni z radikalsko kopolimerizacijo monovinilnega (glicidil metakrilat) in divinilnega (etilen glikol dimetakrilat) monomera, v prisotnosti višjih alkoholov kot topil, ki tvorijo pore ter primerne iniciatorja (npr. benzoil peroksid). Primer rezultata polimerizacije je makroporozen polimer, ki vsebuje epoksi skupine, ki se nato, odvisno od nadaljnje uporabe nosilca, kemijsko modificirajo v močan (kvarterni amin – QA) ali šibek (dietilaminoetil – DEAE) anionski izmenjevalec (Barut, 1999). Za omenjene rigidne diske je značilna do 60-odstotna poroznost; premer makropor (povezani kanali med skupki polimera) je do 1,5 μm , premer mezopor (praznine znotraj skupkov polimera) pa do 0,1 μm . Delavno območje pH je med 1 in 13; stabilni so pri 1 M NaOH ali temperaturi avtoklaviranja, torej nam omogočajo sanitacijo (Štrancar in sod., 2002).



Slika 2: a) 10000-kratna povečava strukture metakrilatnega monolitnega nosilca CIM[®]; b) CIM[®] diski; c) Ohišje za CIM[®] disk (CIM[®] basics, 2004)

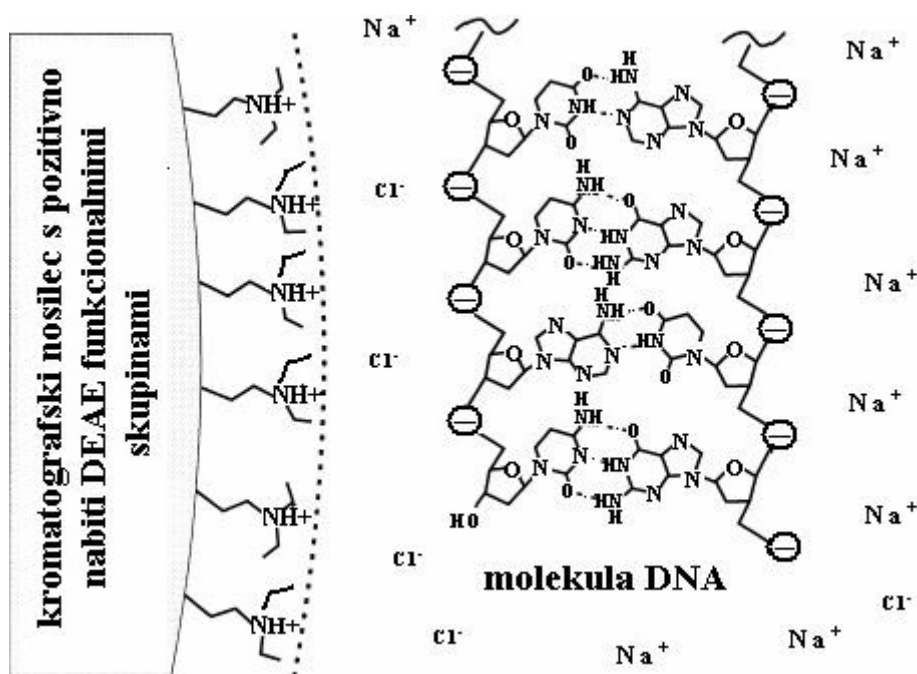
Visoka poroznost CIM[®] diskov je razlog za hitrejše potovanje biomolekul oz. prenos snovi, saj je v omenjenih porah prevladujoč mehanizem prenosa snovi konvekcija pred difuzijo. Ločevanje velikih molekul, kot so proteini in DNA, je tako uspešno opravljeno že v nekaj sekundah oz. minutah, kar je v za 1 – 2 velikostna reda krajšem času, kot s tradicionalnimi kolonami. Poleg hitrosti ločevanja jih odlikujejo še od hitrosti pretoka neodvisno ločevanje in nizek povratni pritisk, dinamična kapaciteta vezave molekul ter visoka ločljivost (Tennikova in Švec, 1993; Štrancar in sod., 1996; Barut, 1999; Podgornik in sod., 2004).

2.7.3 Ionsko-izmenjevalna kromatografija DNA

Ionsko-izmenjevalna kromatografija deluje na principu izmenjave med nabitimi molekulami v vzorcu (npr. DNA) in ioni v mobilni fazi, ki tekmujejo za vezavo na

ustrezno nabite funkcionalne skupine stacionarne faze ionskega izmenjevalca. Vezava tekom spiranja je reverzibilna, elucijo molekul iz vzorca pa lahko dosežemo s spremembo začetnega pH ali ionske jakosti mobilne faze (Sepčić in sod., 1997).

Sekundarna struktura dvoverižne DNA je organizirana tako, da so na osnovno ogrodje iz sladkorjev vezane pozitivno nabite baze orientirane v notranjost heliksa, negativno nabite fosfatne skupine pa štrlijo na zunanjo stran heliksa in dajejo DNA torej značilen negativen površinski naboj. Zelo pogosto uporabljene funkcionalne skupine anionskih izmenjevalcev so QA ali DEAE, ki so pozitivno nabite in zato privlačijo dvoverižno DNA. Zaostajanje dednine na disku je v splošnem odvisno od: ionsko-izmenjevalne kapacitete stacionarne faze, ionske jakosti, vezave ionov soli v nanašalnem pufru s funkcionalnimi skupinami izmenjevalca, temperature in dielektrične konstante elucijskega pufra ter dolžine DNA molekule. Ionsko-izmenjevalna kromatografija z anionskimi izmenjevalci je najbolj pomembna izvedba za ločevanje dvoverižne DNA (Huber in sod., 1998).



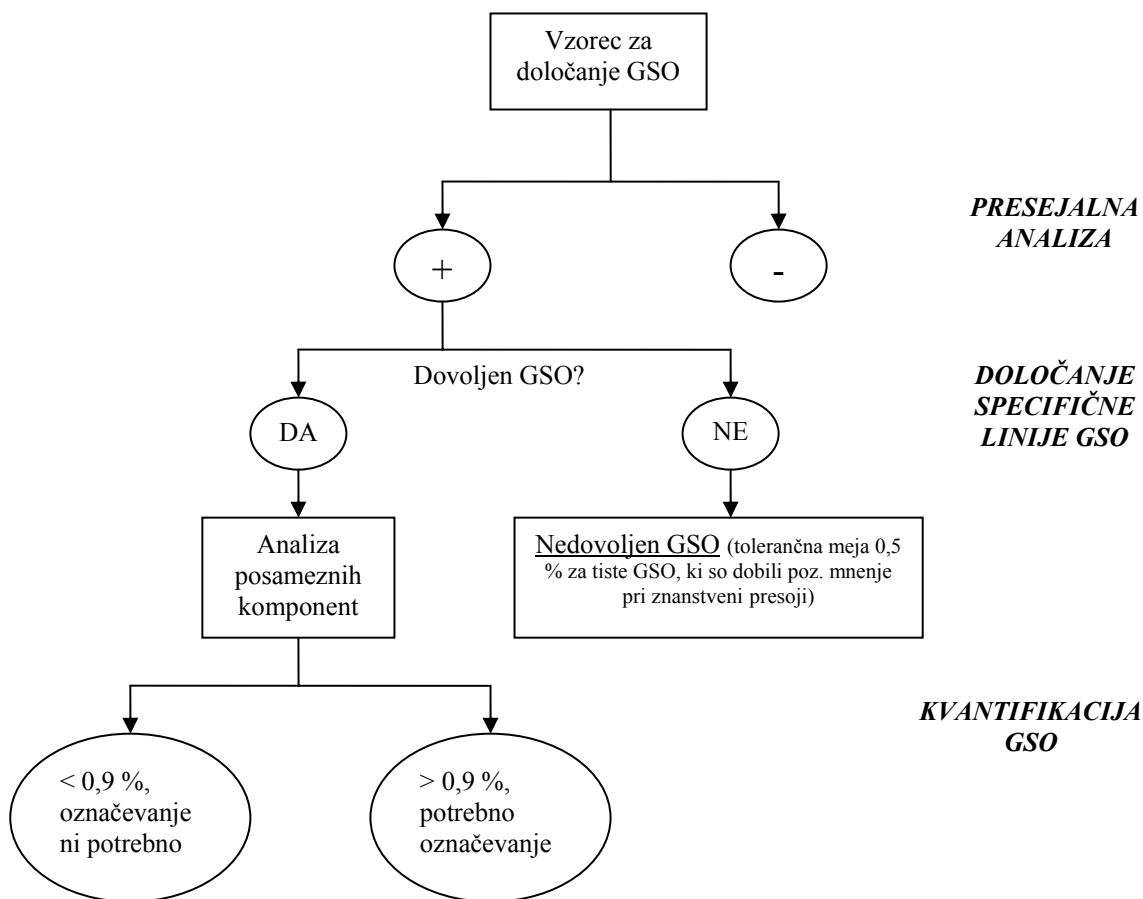
Slika 3: Shema elektrostatskih interakcij med pozitivno nabitimi DEAE skupinami anionskega izmenjevalca in negativno nabitimi fosfatnimi skupinami dvoverižne molekule DNA (Huber, 1998)

Za ločevanje in čiščenje DNA, npr. plazmidov, virusov pa tudi DNA GS-rastlin, so bili preizkušeni tudi CIM[®] QA in CIM[®] DEAE diski. Slednji omogočajo primerno kakovost osamljene DNA in so uporabni za vzorce z nizko vsebnostjo DNA, kot so različni procesirani izdelki iz koruze. Zagotavljajo enako ali celo večjo učinkovitost ter predvsem občutno hitrejšo izvedbo od do zdaj uporabljenih metod (npr. metode CTAB) za osamitev DNA iz živil rastlinskega izvora (Jerman in sod., 2005; Jungbauer, 2005).

2.8 METODOLOGIJA UGOTAVLJANJA GENSKO SPREMENJENIH ORGANIZMOV

2.8.1 Postopek ugotavljanja GS-rastlin

Splošni postopek določanja GSO, ki sledi osamitvi in morebitnem čiščenju DNA, vključuje tri stopnje oz. osnovne tipe metod: presejalno analizo, identifikacijo in kvantitativno analizo (Žel in sod., 2004).



Slika 4: Shema določanja GSO z molekularnimi metodami, v skladu z veljavno zakonodajo EU (Žel in sod., 2004)

Kot kontrolo prisotnosti DNA iskane vrste organizma (npr. rastline), z namenom določanja deleža GSO v vzorcu ali pa za preverjanje razgrajenosti tarčne DNA, izvedemo najprej **test pomnoževanja**. S PCR pomnožujemo odsek gena, ki je specifičen za določeno vrsto rastline. Za sojo je to najpogostejše *lectin* gen, ki kodira beljakovino lektin (Žel in sod., 2004; Zhang in sod., 2007)

Presejalna analiza je začetna kvalitativna analiza vzorca, ki pokaže prisotnost ali odsotnost transgena. Omogoča zaznavanje prisotnosti več različnih GS-rastlin hkrati. Temelji na določanju genskih zaporedij, ki so del rekombinantnega konstrukta. Večina dovoljenih GS-linij koruze in soje vsebuje v ta namen 35S promotor in/ali NOS terminator (Holst-Jensen in sod., 2003; Žel in sod., 2004). Omenjeni promotor in terminator sta

najbolj široko uporabljeni genski sekvenci za regulacijo transgenov in se uporabljata tudi za identifikacijo Roundup Ready[®] soje (Lipp in sod., 2001; Querci in sod., 2004). Presejalna analiza je možna z uporabo kvalitativnega PCR ali PCR v realnem času (Žel in sod., 2004).

Po končanem pozitivnem presejalnem testu je možno pomnožke PCR **potrditi**. Za potrditev lahko uporabljamo restrikcijsko analizo, hibridizacijo odtisa southern, vgnezdjeni PCR in sekveniranje. Princip restrikcijske analize je v izbiri specifičnih restrikcijskih endonukleaz in izrezu fragmenta pomnožene DNA, ki je znane velikosti. Fragmente ločimo in potrdimo z gelsko elektroforezo (Meyer, 1999). Gelska elektroforeza omogoča potovanje molekul DNA v gelu pod vplivom električnega polja; hitrost potovanja oz. prepotovana razdalja pa je odvisna od naboja in velikosti molekule (Madigan in sod., 2003).

Ker je enak genski odsek, ki ga iščemo s presejalno analizo, lahko prisoten tudi naravno ob okužbi z CaMV virusom ali pa bakterijo *A. tumefaciens*, je potrebno morebiten pozitiven rezultat presejalne analize podkrepiti z **identifikacijo**. Pri tem gre za določanje specifične dovoljene GS-linije oz. pomnoževanje t.i. transformacijskega dogodka, prav tako z eno od metod PCR. S pomočjo specifičnih oligonuklotidov pomnožujemo regije vnesenega konstrukta, ki so skupne le posamezni genski liniji in se naravno ne pojavljajo (Žel in sod., 2004). Poleg pomnoževanja specifičnega vnesenega gena, lahko pomnožujemo tudi daljše odseke DNA, npr. promotor/terminator in vnesen specifičen gen skupaj. Največjo specifičnost pa omogoča določanje odsekov na meji med vstavljenim genskim konstruktom in rastlinsko DNA. Na ta način lahko ločeno obravnavamo in nedvoumno določimo vse GS-rastline, ki nastanejo ob ločenih transformacijskih dogodkih, tudi če gre med njimi za isto rastlinsko vrsto z enakim genskim konstruktom (Žel in sod., 2004; Cankar, 2006).

Identifikaciji GSO v živilu sledi **kvantifikacija**, ki je nujna za pravilno označevanje živil v EU. Pogosto uporabljena metoda je PCR v realnem času. S pomnoževanjem odseka vrstno specifičnega gena (npr. gen *lectin*, značilen za sojo) in gena značilnega za GS-linijo, določamo število kopij genoma določene vrste rastline in nato še število kopij transgena v preiskovanem vzorcu. Delež GSO je količnik oz. razmerje med številom kopij transgena in številom kopij vrstno specifičnega gena, izračunanih v obliki haploidnih genomov. Pri tem si, na podlagi uporabe referenčnih vzorcev z znano količino GSO, pomagamo tudi z izrisom standardne krivulje (Žel in sod., 2004).

GSO določamo na dva načina. V praksi se največ uporablja testiranje na prisotnost vnesenih zaporedij DNA in v manjši meri testiranje na prisotnost izraženih proteinov, ki jih to vneseno zaporedje kodira. Pri tem so na voljo številne kvalitativne in kvantitativne metode (Schreiber, 1999; Cankar, 2006).

2.8.2 Metode zaznave rekombinantne DNA

Metode zaznave rekombinantne DNA so molekularne metode. Te temeljijo na hibridizaciji transgenega dela dvojnega DNA heliksa, katerega zaporedje poznamo, z umetno

sintetiziranim komplementarnim DNA zaporedjem. Najpogosteje uporabljene metode so različne izvedbe PCR (Ahmed, 1995; Ahmed, 2002).

2.8.2.1 Kvalitativna in vgnezdna verižna reakcija s polimerazo (PCR)

PCR v zaznavi GSO temelji na *in vitro* pomnoževanju specifičnih zaporedij tarčne oz. analizirane rekombinantne DNA, ki smo jo pred tem osamili iz celičnega matriksa. Ključni pri tem so dobro definirani reakcijski pogoji, ki so sestavljeni iz ponavljajočih se treh različnih temperatur, ki ustrezajo trem zaporednim reakcijskim stopnjam (Van den Eede in sod., 2004; Somma in Querci, 2004):

1. **denaturacija** dvoverižne DNA do enoverižnih ($\sim 94\text{ }^{\circ}\text{C}$);
2. **prileganje** predhodno ustrezno izbranih začetnih oligonukleotidov na tarčno mesto enojne DNA verige ($50 - 65\text{ }^{\circ}\text{C}$);
3. **podaljševanje** nastajajoče DNA verige, od mesta vezave začetnih oligonukleotidov, z dodajanjem prostih nukleotidov (deoksinukleozid-trifosfatov oz. dNTP) na 3' konec nastajajoče verige, s pomočjo termostabilnega encima - DNA polimeraze, v prisotnosti Mg^{2+} ionov ($\sim 72\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Omenjene tri stopnje sestavljajo en cikel. Po vsakem zaključenem ciklu služi novo nastala DNA kot osnova za naslednji cikel (Somma in Querci, 2004). V odvisnosti od izhodiščne količine tarčne DNA in dolžine pomnoženega DNA fragmenta, je število ciklov od 20 do 50, količina DNA pa se v vsakem ciklu podvoji (Van den Eede in sod., 2004).

PCR je danes široko uporabljena in zelo pomembna metoda v zaznavi GSO. Omogoča nam, da posamezen genski element, ki se v preiskovanem vzorcu nahaja v zelo majhni količini pomnožimo tolikokrat, da ga po nadaljnji analizi z gelsko elektroforezo lahko zaznamo. Kvalitativna izvedba PCR nam pove le, ali je tarčna DNA v vzorcu prisotna ali ne (Žel in sod., 2004).

Vgnezdni PCR (ang. nested PCR) je izvedba PCR, ki poveča občutljivost in specifičnost pomnoževanja tarčnega odseka DNA. Omenjena reakcija zajema dve verižni reakciji s polimerazo. Prva je enaka kvalitativnem PCR, v drugo reakcijo pa vključimo produkt pomnoževanja prve reakcije in pa začetne oligonukleotide, ki so specifični za odsek znotraj odseka, pomnoženega v prvi reakciji. Izvedba zmanjša možnost nastanka nespecifičnih pomnožkov PCR, njena slabost pa je lahko večja možnost kontaminacije (Meyer in sod., 1996; Van den Eede in sod., 2004).

2.8.2.2 Kvantitativni kompetitivni PCR

Ključni aspekt analize GS-živil je vsekakor kvantifikacija, saj predstavljajo zgornje meje za dovoljeno naključno prisotnost GSO osnovo za označevanje živil (Hübner in sod., 1999b).

Kvantitativni kompetitivni PCR (QC-PCR) je metoda, ki temelji na istočasnem pomnoževanju analizirane DNA iz vzorca in internega standarda oz. kompetitorske DNA v isti reakcijski mešanici, torej pod enakimi pogoji in z uporabo istih dostopnih nukleotidov, začetnih oligonukleotidov ter DNA polimeraze. Ker tarčna molekula in kompetitorska

DNA med seboj torej tekmujeta, naj bi bila količina nastalih pomnožkov sorazmerna začetni količini tarčne DNA oz. kompetitorske DNA. Razlika je v dolžini pomnožkov PCR, ki jih ločimo z gelsko elektroforezo. Na podlagi primerjave količine produkta pomnoževanja analizirane DNA in standarda, lahko sklepamo na relativno količino tarčne DNA. Reakcija se uporablja za določanje količine promotorja 35S in terminatorja NOS Roundup Ready® soje, v novejšem času pa jo nadomešča predvsem PCR v realnem času (Hübner in sod., 1999b; Ahmed, 2002).

Omenjena metoda nam poleg prisotnosti in deleža GSO v vzorcu, potrdi tudi morebitno prisotnost/odsotnost inhibitorjev PCR. Če se namreč med reakcijo ne pomnožita niti analizirana DNA niti standard, je to dokaz prisotnosti inhibitorjev PCR (Studer in sod., 1998).

2.8.2.3 PCR v realnem času

PCR v realnem času je kvantitativna metoda, ki nam omogoča pomnoževanje in zaznavo pomnožkov PCR med potekom reakcije. Njene prednosti so vsekakor večja občutljivost in natančnost, pa tudi neposredna zaznava, zaradi katere ni potrebna analiza pomnožkov PCR na agaroznem gelu, kar zmanjša možnost navzkrižne kontaminacije (Cankar, 2006). Temelji na sprotnem merjenju količine nastalih pomnožkov PCR, ki naj bi teoretično naraščali eksponentno. V eksponentni fazi reakcije je začetna koncentracija DNA proporcionalna številu ciklov PCR, in sicer je korelacija linearna in inverzna (Ahmed, 2000). V praksi se izkaže, da doseže reakcija med 30. in 40. ciklom plato, pogosto zaradi akumulacije in naleganja pomnožkov PCR med seboj, prisotnosti inhibitorjev ali omejene količine reagentov (Ahmed, 1995; Wittwer in sod., 1997). Nastajanje pomnožkov PCR lahko spremljamo s fluorescentnim označevanjem nastalih pomnožkov, saj je izmerjena fluorescenca sorazmerna količini nastalega pomnožka. Na osnovi izmerjene fluorescence se izriše krivulja, ki podaja odvisnost jakosti fluorescence od števila ciklov (ang. *cycle threshold* oz. *Ct*). Pri *Ct* gre torej za časovno točko, pri kateri se zazna porast fluorescence v eksponentni fazi reakcije (Cankar, 2006; Kubista in sod., 2006).

Spremljanje količine produkta nam omogočajo različni sistemi zaznave, ki jih delimo na specifične in nespecifične. Pri nespecifičnih sistemih se fluorescentno barvilo (npr. SYBR Green I) veže na dvoverižno DNA in povzroči fluorescenco, ki jo lahko merimo (Wittwer in sod., 1997).

Specifični detekcijski sistemi lahko temeljijo na uporabi dvojno označenih ali hidrolizirajočih sond, kar uporablja tudi t.i. TaqMan® tehnologija (Vaitilingom in sod., 1999). Pogosto uporabljena za označevanje sta fluorofora fluorescein in rodamin, od katerih je eden reportersko barvilo (ang. *reporter*), drugi pa dušilec (ang. *quencher*). Le-ta sta vezana na 3'- in 5'-konec hidrolizirajoče sonde, ki se prilega znotraj tarčnega DNA zaporedja. V vezanem stanju fluoroforov ne zaznamo povečane fluorescence, saj zaradi prekrivanja absorpcijskega in emisijskega spektra reporterskega barvila in dušilca, reporterskega barvila ne zaznamo. Zaradi delovanja DNA polimeraze, ki kaže močno 5'-eksonukleazno aktivnost, pride pri pomnoževanju DNA do razgradnje hibridizacijske sonde. Pri tem se uporabljena fluorofora sprostita s sonde in oddaljita, posledica pa je povečana fluorescenca, ki je proporcionalna s količino pomnožene DNA (Wittwer in sod.,

1997). Mehanizem s katerim dušilec odda energijo, ki jo je prejel od donorja imenujemo FRET (ang. *fluorescence resonance energy transfer*) efekt. Princip efekta FRET je v prenosu energije (vendar ne fotonov) med donorskim in akceptorskim kromoforom, ki sta na razdalji 10 – 100 Å (Clegg, 1995). Omenjeni mehanizem se koristi pri več tehnikah zaznave. Možna je tudi uporaba kromoforov, ki sta vezana na ločenih hibridizacijskih sondah, pomnoževanje DNA pa povzroči njuno približevanje na omenjeno ugodno razdaljo in poveča prenos energije med njima in s tem povečano fluorescenco (Wittwer in sod., 1997). Vedno bolj se pri PCR v realnem času uveljavlja tudi uporaba t.i. molekularnih svetil (ang. *molecular beacon*). To so z dvema kromoforoma označena oligonukletidna zaporedja DNA, ki pri hibridizaciji s tarčno DNA spremenijo konformacijo, približajo kromofora in povzročijo povečano fluorescenco (Kramer in Tyagi, 1996).

2.8.2.4 Hibridizacija odtisa southern

Za zaznavo rekombinantne DNA lahko uporabljamo tudi hibridizacijo odtisa southern (ang. *southern blot*). Metoda vključuje prenos osamljene rekombinantne DNA na nitrocelulozno oz. najlonsko membrano, ki mu sledi nanos radioaktivno ali neradioaktivno označene dvoverižne hibridizacijske sonde. V definiranih pogojih pride tako do hibridizacije med tarčno DNA in dobro izbrano komplementarno sondo, uspešno vezavo pa zaznamo s pomočjo radiografije, fluorimetrije ali kemiluminiscence (Ahmed, 2002). Hibridizacija odtisa southern se lahko uporablja tudi kot metoda za potrditev pomnožkov PCR (Meyer, 1999).

2.8.2.5 Mikromreže

Ena najbolj obetajočih tehnik določanja GS-rastlin je tehnika DNA mikromrež. Ta omogoča zaznavo tudi do nekaj deset tisoč predhodno označenih rekombinantnih DNA zaporedij iz vzorca hkrati (paralelna detekcija), kar je, pred zamudnimi metodami PCR in pri naraščajočem številu GSO, vsekakor prednost. Mikromrežo predstavlja podlaga, na katero so kot sonde sistematično pritrjeni oligonuklotidi, pomnožki PCR ali plazmidi, in tako omogoča obenem zaznavo presejalnih elementov kot tudi specifičnih elementov več različnih GS-rastlin (Van den Eede in sod., 2004; Bordoni in sod., 2005; Cankar, 2006). Metoda je bila preizkušena na komercialnih izdelkih iz GS-soje in/ali -koruze. Izkazala se je za zelo uspešno pri simultani zaznavi petih transformirajočih dogodkov in dveh endogenih genov (sojin *lectin* gen in koruzni *zein* gen), tudi pri izdelkih s pričakovanim nizkim deležem GSO, npr. 0,5 % (Bordoni in sod., 2005).

2.8.2.6 Biosenzorji

Za uporabo v zaznavi GSO so bili preizkušeni tudi biosenzorji, z uporabo principa površinske plazmonske resonance. Senzorji delujejo na principu hibridizacije med imobiliziranimi, za tarčne sekvence specifičnimi sondami ter tarčnimi DNA zaporedji v vzorcu. Kot tarčni sekvenci sta bila uporabljena 35S promotor in NOS terminator. Biosenzorji so se izkazali kot uporabni, z izjemo procesiranih vzorcev (toplotna razgradnja certificirane referenčne DNA 2-odstotne Roundup Ready® soje). Pri procesiranih vzorcih proste DNA sekvence, ki nastanejo pri razgradnji tarčne DNA, tekmujejo z imobiliziranimi

sondami in zasedajo vezavna mesta na tarčni DNA, kar vpliva na znižanje signala biosenzorja in otežuje ločevanje med pozitivnimi in negativnimi vzorci (Mariotti in sod., 2002).

2.8.3 Metode zaznave rekombinantnih proteinov

Metode zaznave rekombinantnih proteinov so imunološke metode. Metodologija se rutinsko uporablja za kvalitativno in kvantitativno zaznavo izraženih proteinov kot antigenov s specifičnimi protitelesi, pod pogojem, da je iskani protein poznan (Brett in sod., 1999). V odvisnosti od potrebne količine protiteles, želene specifičnosti detekcijskega sistema, tipa vzorca ter razpoložljivega časa in stroškov, se za zaznavo lahko uporabljajo tako monoklonska kot poliklonska protitelesa (Stave, 1999). Metode so uporabne predvsem zaradi visoke specifičnosti med antigenom in protitelesom, tudi ob prisotnosti nečistoč (Anklam, 2002). Slabost omenjenih metod je (Ahmed, 1995; Ahmed, 2002; Žel in sod., 2004):

- uporabnost le pri neprocesiranih vzorcih, kjer iskani protein ni razgrajen;
- možnost navzkrižnih nespecifičnih reakcij protiteles s proteini, fenoli idr. in tako lažno pozitivnih rezultatov;
- denaturacija protiteles z maščobnimi kislinami ali endogenimi encimskimi inhibitorji;
- prisotnost iskanega proteina v različnih GSO in nezmožnost opredelitve linije GSO;
- GSO, ki ne tvorijo proteinov, ki bi jih lahko uporabili kot tarčne molekule za analizo.

Najbolj uporabljeni metodi sta hibridizacija odtisa western (ang. western blot) in pa encimsko-immunska metoda (ELISA, ang. enzyme-linked immunosorbent assay). Obe se uporabljata za analizo EPSPS proteinov transgene Roundup Ready® soje (Rogan in sod., 1999; Ahmed, 2002).

2.8.3.1 Encimsko-immunska metoda (ELISA)

ELISA je visoko občutljiva kvantitativna metoda, ki je možna v več različnih izvedbah. Lahko temelji na vezavi antigena s primarnim protitelesom, ki ga predhodno vežemo na trak oz. strip (ang. lateral flow strip technology, zelo uporaben na terenu) ali pa na mikrotitersko ploščico (v laboratoriju). Na nastali kompleks se, ob prisotnosti iskanega proteina v ekstraktu rastlinskega tkiva, veže še z encimom konjugirano sekundarno protitelo, ki povzroči spremembo barve dodanega encimskega substrata. Gre za t.i. »sendvič tehniko« encimsko-detekcijskega sistema, kvantifikacija pa se izvaja s pomočjo merjenja optične gostote (Ahmed, 2002).

Ena od izvedb ELISA-e je tudi uporaba magnetnih delcev kot trdnih nosilcev. Ta so prekrita s protitelesi in se po vezavi proteinov od nevezanih reaktantov ločijo s pomočjo magnetov (Brett in sod., 1999).

2.8.3.2 Hibridizacija odtisa western

Gre za visoko specifično metodo, ki zagotavlja kvalitativne rezultate. Ti nam povedo, ali preiskovani vzorec vsebuje količino tarčnega proteina pod ali nad predhodno določenim pragom. Uporabna je predvsem za analizo netopnih proteinov (Brett in sod., 1999; Ahmed,

2002). Postopek vključuje denaturacijo vzorcev z detergenti in reducirajočimi agensi in ločevanje proteinov z elektroforezo v poliakrilamidnem gelu, z natrijevim dodecil sulfatom (SDS-PAGE). Sledi prenos proteinov na nitrocelulozno membrano in primarna obdelava s protitelesi. Zaznava je možna s pomočjo barvanja vezanih protiteles z barvilom (Coomassie, srebrov nitrat, ...); ali z dodatno vezavo z encimom konjugiranih sekundarnih protiteles in substrata za t.i. encimsko-detekcijski sistem (Ahmed, 2002).

2.8.4 Druge metode zaznave GS-rastlin

Perspektivna metoda za testiranje zrnja je tudi spektroskopija pri valovnih dolžinah blizu infrardeče svetlobe (ang. *near infrared spectroscopy* oz. NIRS), saj z njo lahko nedestruktivno ugotovimo količino vlage, olj, proteinov in vlaknin oz. spremljamo večje neznane spremembe v strukturi tkiva. S to metodo ne moremo spremljati sprememb DNA, zato je njena natančnost precej omejena. Uporablja se za ločevanje konvencionalne soje od Roudup Ready[®] soje (Ahmed, 2002; Anklam in sod., 2002).

Kot uporabne metode za zaznavo rekombinantne DNA lahko v literaturi zasledimo tudi bioluminometrične teste (Glynou in sod., 2004) in biološke metode, s katerimi GS-rastline s toleranco na herbicide lahko ločimo od divjih tipov rastlin npr. z razprševanjem ustreznega herbicida (Bertheau in sod., 2002)

2.9 PROBLEMATIKA UGOTAVLJANJA GS-ŽIVIL

Princip ugotavljanja varnosti naše prehranjevalne verige ima v splošnem dva cilja. Prvi je odkriti in odstraniti organizme in gene, ki predstavljajo potencialno nevarnost; drugi pa doseči meje zaznavanja (MZ), imenovane tudi limite detekcije (ang. LOD oz. *limit of detection*) (Heinemann in sod., 2004). MZ je, pri kvalitativni metodi za določanje GSO, najnižja raven analita, ki se lahko zanesljivo zazna, glede na znano ciljno taksonomsko specifično število kopij genomov. Pri kvantitativni metodi je meja zaznavanja količine (MZK), imenovana tudi limita kvantifikacije (ang. LOQ oz. *limit of quantification*), najnižja raven analita, ki se lahko zanesljivo količinsko opredeli, glede na znano ciljno taksonomsko specifično število kopij genomov. Če je vsebnost ciljnega GS-zaporedja pod spodnjo mejo, ki še omogoča zaznavanje količine (MZK), se rezultati izrazijo samo kvalitativno (Commission Recommendation 2004/787/EC..., 2004; Šuštar-Vozlič, 2005). MZ morajo stremeti k zaznavi vseh potencialno nevarnih organizmov ali genov, tudi pod zakonsko določeno mejo za označevanje naključno prisotnih dovoljenih ali še nedovoljenih GSO (Heinemann in sod., 2004; Deisingh in Badrie, 2005). MZ za GSO pogosto določajo meje za dovoljeno naključno prisotnost GSO v živilih (Heinemann in sod., 2004).

Za določanje praga kontaminacije živil z GSO so značilne štiri stopnje, pri katerih lahko pride do napak, ki posledično dajejo napačne rezultate analiz. Stopnje so sledeče (Heinemann in sod., 2004):

1. izbira primerne velikosti vzorca za analizo in tehnike vzorčenja;
2. izbira primerne velikosti in zagotavljanje homogenosti podvzorcev in osamitev DNA za nadaljnje analize;
3. določanje občutljivosti PCR;

4. vrednotenje rezultatov, ki bodo zagotavljali pravilne odločitve s strani oblasti in drugih strokovnjakov.

2.9.1 Vzorčenje in homogenizacija

Velikost vzorcev mora biti dovolj velika, da je metoda sposobna zaznati koncentracije GSO, ki bi lahko škodovale potrošniku. Skupaj z nepravilno metodo vzorčenja lahko namreč povzroči lažno pozitivne in negativne rezultate. Premajhni vzorci ne morejo doseči MZ, ne glede na mejo amplifikacije PCR; to je najnižjo koncentracijo za GSO značilnih sekvenc, ki jih je metoda sposobna pomnožiti s sprejemljivo natančnostjo in točnostjo. S približevanjem povprečnega števila genomov MZ se povečuje tudi možnost lažno negativnih rezultatov. Pri vzorčenju se mora izključiti možnost zunanje kontaminacije (npr. kontaminacija GS-sojinih semen z zemljo). V ta namen je pomembno identificirati in določiti vse, ki so imeli opravka z vzorci (proizvajalec semen, izvoznik, kmet, kupec); načine kultivacije; rezultate morebitnih predhodnih analiz, vključno s certifikati živila. Problem se pojavi, ko so rezultati testiranj s pogodbo zaščiteni s strani proizvajalca (Heinemann in sod., 2004).

Homogenost vzorcev, torej enakomerna porazdelitev GSO v vzorcu, je pomembna pri določevanju količine GSO v mešanem vzorcu (vsebuje npr. GS-semena in običajna semena) in izračunih minimalne zahtevane velikosti vzorca. Zaradi nepopolnega mletja vzorcev, je priporočljivo določiti intervale zaupanja, ki vključujejo možnost nehomogenih vzorcev (Heinemann in sod., 2004).

2.9.2 Količina in kakovost DNA

Tekom osamitve DNA iz surovih ali celo že toplotno obdelanih živil, ki vsebujejo nizek odstotek tarčnih GS-sekvenc (npr. 0,1 %), ki so nato porazdeljene še med PCR epruvete, dobimo zelo nizko končno število genov, ki se pomnožujejo. Večina metod za ekstrakcijo DNA omogoča pridobitev približno 50 – 100 µL raztopine DNA (Hübner in sod., 2001). V praksi, določanje 35S promotorja omogoča zaznavo GS-živil v območju vsebnosti 0,01 – 0,1 %. Za PCR v splošnem potrebujemo 100 – 200 ng DNA (Kay in sod., 2001); 200 ng osamljene DNA pa pri kontaminaciji 0,1 % vsebuje v povprečju le 0,2 ng tarčne sekvence, kar na reakcijsko PCR epruveto znaša le približno 36 tarčnih molekul (Hübner in sod., 2001). Nizka koncentracija DNA je prvi omejujoč faktor za zanesljivo določanje GS-živil (Heinemann in sod., 2004). Rešitev bi na stopnji osamitve lahko bila uporaba omenjenih anionsko izmenjevalnih CIM[®] monolitnih kolon z diski iz DEAE ali QA s katero bi DNA skoncentrirali (Jerman in sod., 2005).

Izraz kakovost DNA se navezuje na stopnjo razgrajenosti DNA (fragmenti velikosti manj kot 400 bp) in na prisotnost inhibitorjev PCR, torej čistost (Meyer, 1999). DNA v toplotno obdelanih živilih je pogosto precej razgrajena. Na razgradnjo DNA vpliva med drugim dolgotrajna toplotna obdelava živil in nizek pH (Gryson in sod., 2002). Kar se tiče čistosti, je kritična predvsem prisotnost oz. ko-ekstrakcija inhibitorjev PCR. To so pogosto proteini, polisaharidi in fenolne snovi ter ostanki ekstrakcijskih kemikalij, kot npr. SDS, fenol, etanol, EDTA, NaCl, urea, kloroform, izopropanol, proteinaza K, CTAB ipd. Njihova prisotnost lahko vodi do slabšega pomnoževanja in s tem kvantifikacije DNA ter povzroča

lažno negativne rezultate (Rossen in sod., 1992; Van den Eede in sod., 2004; Lipp in sod., 2005).

2.9.3 PCR

Količina in kakovost DNA sta kritična faktorja za nadaljnjo uporabo DNA, npr. v verižni reakciji s polimerazo (Van den Eede in sod., 2004). Za metodo PCR se priporoča, da se za kontrolo in vsako reakcijo posebej določi meja amplifikacije. Specifičnost začetnih oligonukleotidov mora biti točno določena (Heinemann in sod., 2004), saj le-ti lahko predstavljajo problem PCR. Izkazalo se je, da je v uporabi s strani GS-poljščin namreč najmanj 8 različic 35S promotorja, torej imajo tudi komercialni konstrukti z identičnimi imeni lahko različne DNA sekvence (Anklam, 2002; Matsuoka in sod., 2002).

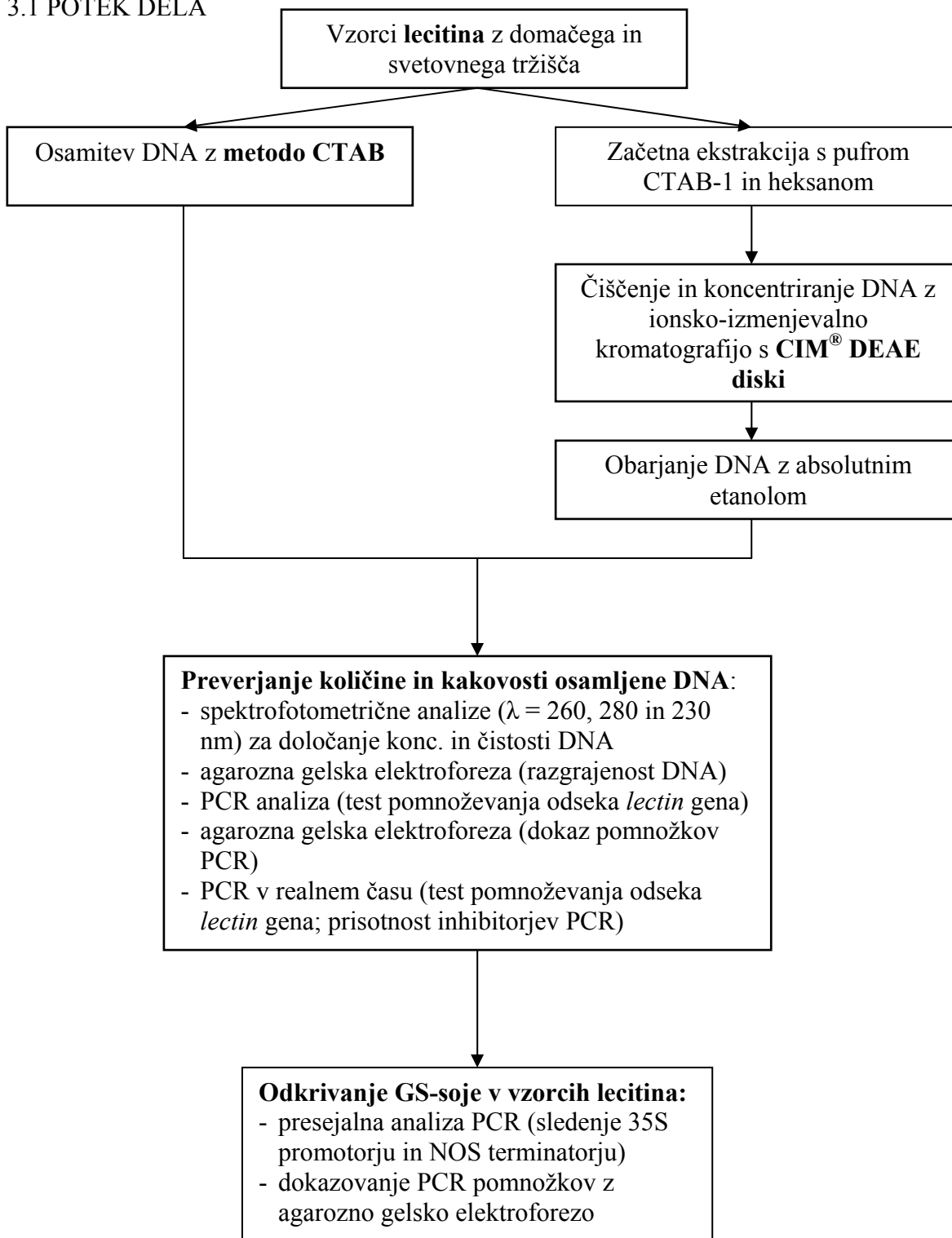
Problem PCR metode je v tem, da večkrat podcenjuje vsebnost neznanih transgenih organizmov. V primeru, da so le-ti hibridi iste vrste organizma z več vstavljenimi konstrukti, se pojavijo dodatne komplikacije, saj zaznava enega rekombinantnega konstrukta zamaskira ostale (Heinemann in sod., 2004).

Občutljivost PCR se, kot že omenjeno, zmanjšuje s prisotnostjo inhibitorjev reakcije v vzorcu DNA; nizko količino osamljene DNA, poleg tega pa še s spremembo strukture fragmenta, ki bo pomnožen. Mehanizmi inhibicije so domnevno razgradnja ali vezava nukleinskih kislin, inaktivacija ali razgradnja polimeraze ter sprememba pogojev PCR (Wilson, 1997). Ugotavljanje vpliva PCR inhibitorjev se izvaja z dodatkom različnih standardnih kontrol. Ena izmed možnosti preverjanja prisotnosti inhibitorjev PCR v realnem času, so tudi serijske razredčitve vzorcev (Pasloske in sod., 1998; Stahlberg in sod., 2003).

Večji problem predstavljajo spremembe tarčnih sekvenc. Znanje s področja rekombinantnih sekvenc, njihovih struktur in stabilnosti, je še relativno novo. Obstaja možnost, da se iskana DNA sekvenca GSO loči od ostalih delov rekombinantnega konstrukta, zato je še toliko bolj priporočljiva uporaba več začetnih oligonukleotidov, torej zaznava več delov genskega konstrukta (Hübner in sod., 2001; Anklam, 2002). Delno rešitev problema predstavlja uporaba več različnih začetnih oligonukleotidov, ki so sposobni bolj učinkovito zaznati različne tarčne DNA sekvence. Ne moremo pa izključiti možnosti, da lahko med postopki pride do rekombinacij, ki povzročijo spremembe v strukturi tarčnih sekvenc. Omenjene spremembe se zabeležijo le, če gre za daljše inserte, ki se kasneje tudi izrazijo, vse ostale spremembe na žalost pogosto ostajajo neregistrirane. Takšni neregistrirani primeri onemogočajo uspešno delovanje strokovnjakov in oblasti. Še bolj pomembno pa je, da se s temi nepravilnostmi povečuje tveganje za naključno razširjanje potencialno škodljivih GSO. Problemi so na tej stopnji najlažje rešljivi že z uporabo krajših začetnih oligonukleotidov in zahtevo po objavljanju vseh rezultatov testiranj (Heinemann in sod., 2004).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 5: Shema poteka poskusov osamitve DNA GS-soje iz vzorcev lecitina

3.2 MATERIAL

3.2.1 Vzorci

Za analize odkrivanja GS-soje smo, preko nekaterih slovenskih podjetij, pridobili čim bolj različne vzorce sojinega lecitina, ki so namenjeni uporabi v živilstvu. Preglednica 3 navaja seznam analiziranih vzorcev lecitina, vključno z referenčnima vzorcema pšeničnega lecitina in lecitina pire, ki smo ju uporabili za negativno kontrolo prisotnosti sojine DNA. Navedeni so podatki, ki smo jih uspeli pridobiti.

Preglednica 3: Seznam analiziranih vzorcev lecitina, njihov izvor, dobavitelj, pridobivanje in uporaba

Zap. št. vzorca	Naziv vzorca*	Izvor lecitina	Dobavitelj vzorca	Pridobivanje lecitina	Izvor rastline	Uporaba lecitina
1	Sojin lecitin 2	soja (tekoči)	Mlinotest d.d.	Hrvaška	NP	NP
2	Lecitin pšenica	pšenica (v prahu)	Mlinotest d.d.	NP	NP	NP
3	Lecitin pira	pira (v prahu)	Mlinotest d.d.	NP	NP	NP
4	Soja proteini	soja (tekoči)	Mlinotest d.d.	Srbija	Soja UITA (?)	NP
5	So lec	soja (tekoči)	Mlinotest d.d.	NP	NP	NP
6	Sojin lecitin	soja (tekoči)	Žito Gorenjka d.d.	Italija	Brazilija	emulgator (čokolada)
7	Degussa lecitin	soja (tekoči)	Krka d.d.	NP	NP	priprava gojišč za mikroorg.
8	Ultrafiltriran soja lecitin (Ultralec)	soja (v granulah)	Brenntag d.o.o.	Nizozemska	NP	emulgator (hrana za dojenčke, farmacevtski proizvodi, mlečni izdelki, ...)

Opombe: temnejša polja (vzorci št. 2 in 3) - referenčna vzorca (pričakovana odsotnost sojine DNA)

*Vsi vzorci, z izjemo vzorca št. 8, so bili zapakirani v neoriginalni embalaži

NP – ni podatka

3.2.2 Referenčni vzorci

Referenčne vzorce je priskrbelo podjetje Mlinotest d.d. ter Nacionalni inštitut za biologijo v Ljubljani (NIB). Vzorci so bili v prahu (vzorci št. 2 in 3) ali pa v obliki že osamljene DNA za analize PCR.

Kot referenčna vzorca za negativno kontrolo, s pričakovano odsotnostjo sojine DNA, smo uporabili (Mlinotest d.d.):

- lecitin pšenice (**vzorec št. 2**)
- lecitin pire (**vzorec št. 3**)

Tekom analiz se je izkazalo, da sta vzorca kontaminirana s sojino DNA in torej nista zanesljivi negativni kontroli, zato smo ju obravnavali kot vse ostale vzorce (preglednica 3).

Pri analizah kvalitativnega PCR in PCR v realnem času za odkrivanje DNA soje (*lectin* gen) smo uporabili:

- negativna kontrola:
 - vzorec DNA koruze – invertaza pozitivno, lektin negativno, CaMV 35S promotor negativno, NOS terminator negativno (NIB, **ref. vzorec B**)
- pozitivna kontrola:
 - vzorec DNA konvencionalne soje – lektin pozitivno, CaMV 35S promotor negativno, NOS terminator negativno (NIB, **ref. vzorec A**)

Pri analizah kvalitativnega PCR za odkrivanje GS-soje, pa smo uporabili:

- negativna kontrola:
 - vzorec DNA konvencionalne soje – lektin pozitivno, CaMV 35S promotor negativno, NOS terminator negativno (NIB, **ref. vzorec A**)
- pozitivna kontrola:
 - vzorec DNA GS-soje (Roundup Ready[®] soja) – lektin pozitivno, RRS pozitivno (NIB, **ref. vzorec C**)

Kot referenčni vzorec preverjanja delovanja metode za osamitev DNA s pomočjo CIM[®] DEAE diskov, smo uporabili vzorec DNA iz lososovih mod ($\gamma_{\text{DNA}} = 0,5 \text{ g/L}$, BIA Separations d.o.o).

3.2.3 Kemikalije

- **Raztopine in reagenti za osamitev DNA z metodo CTAB in osamitev DNA s pufrom CTAB-1 in heksanom**
 - pufer CTAB-1
 - 20 g/L CTAB (Acros organics, Belgija, Kat. št. 227161000)
 - 1,4 M NaCl (Merck, Nemčija, Kat. št. 1.06404.1000)
 - 0,1 M Tris HCl (Sigma, Nemčija, Kat. št. T3253)
 - 20 mM EDTA (Kemika, Hrvaška, Kat št. 1136808)
 - pufer CTAB-2
 - 5 g/L CTAB
 - 0,04 M NaCl (Merck, Nemčija, Kat. št. 1.06404.1000)
 - 1,2 M NaCl
 - 7 g NaCl (Merck, Nemčija, Kat. št. 1.06404.1000)
 - sterilna destilirana voda
 - 70 % etanol
 - absolutni etanol (Merck, Nemčija, Kat. št. 1.00983.1000)
 - kloroform (Merck, Nemčija, Kat. št. 1.02445.1000)
 - izopropanol (Merck, Nemčija, Kat. št. 1.09634.1000)
 - heksan (Merck, Nemčija, Kat. št. 1.04367.1000)

Pufra CTAB-1, CTAB-2 in 1,2 M raztopino NaCl smo pripravili z destilirano vodo. Uravnali smo pH na 8 z 1 M NaOH (Merck, Nemčija, Kat. št. 1.06498.1000) in jih sterilizirali s toploto 20 min pri temperaturi 120 °C in nadtlaku 1,2 bar. Hranili smo jih na temperaturi 4 °C. 70-odstotni etanol smo prefiltrirali skozi filter s premerom por 0,2 µm.

- **Raztopine in reagenti za kromatografijo**

- nanašalni pufer: 50 mM Tris (Merck, Nemčija, Kat št. 1.08382.1000)
+ 0,25 M NaCl (Merck, Nemčija, Kat. št. 1.06404.1000)
- elucijski pufer : 50 mM Tris (Merck, Nemčija, Kat št. 1.08382.1000)
+ 2,0 M NaCl (Merck, Nemčija, Kat. št. 1.06404.1000)

Pufra smo pripravili z destilirano vodo. Uravnali smo pH na 8 z 1 M HCl (Merck, Nemčija, Kat. št. 1.00319.1000) ter prefiltrirali skozi filter s premerom por 0,45 µm.

- **Raztopine in reagenti za obarjanje frakcij DNA, osamljene in koncentrirane s CIM® DEAE diski**

- absolutni etanol (Merck, Nemčija, Kat. št. 1.00983.1000)
- 70-odstotni etanol
absolutni etanol (Merck, Nemčija, Kat. št. 1.00983.1000)

- **Reagenti za PCR**

- PCR pufer 10 X (Invitrogen, Kalifornija (ZDA), Kat. št. 11508-017)
- 50 mM Raztopina MgCl₂ (Invitrogen, Kalifornija (ZDA), Kat. št. 11508-017)
- založna raztopina deoksinukleozidtrifosfatov (Invitrogen, Kalifornija (ZDA), Kat. št. 11508-017)
- Taq DNA polimeraza 5 U/µL (Invitrogen, Kalifornija (ZDA), Kat. št. 11508-017)
- začetni oligonukleotidi:
 - Liofilizirani GMO3 (Invitrogen, Kalifornija (ZDA), Kat. št. X0854H08) in GMO4 (Invitrogen, Kalifornija (ZDA), Kat. št. X0854H06)
 - 10 µM raztopini p35S-cf3 in p35S-cr4 (MWG, Nemčija)
 - 10 µM raztopini HA-nos 118-f in HA-nos 118-r (MWG, Nemčija)
- voda za PCR

Liofilizirane začetne oligonukleotide smo raztopili v ustrezni količini sterilne destilirane vode za PCR, da smo pripravili založne 100 µM raztopine, ki smo jih nato poljubno redčili.

- **Raztopine in kemikalije za elektroforezo**

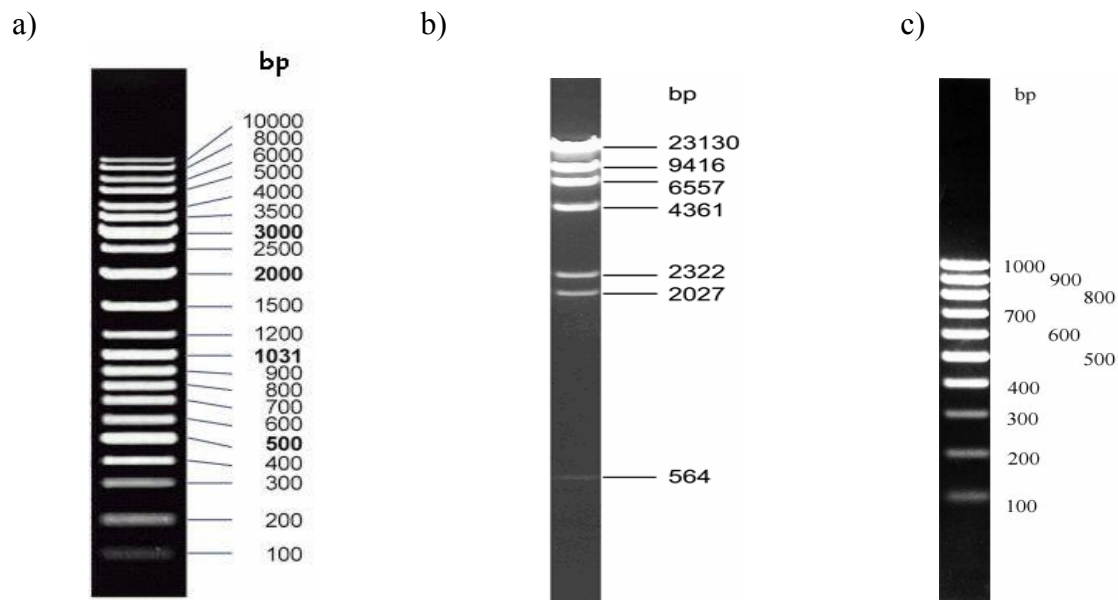
- pufer TAE (50 X)
 - 242 g/L Tris (Merck, Nemčija, Kat. št. 1.08382.0500)
 - 57,1 mL CH₃COOH (Merck, Nemčija, Kat. št. 1.00063.1000)
 - 37,2 g/L EDTA (Kemika, Hrvaška, Kat. št. 1136808)
- nanašalni pufer za elektroforezo (6 X) (Fermentas, Canada, Kat. št. R0631)
 - 10 mM Tris-HCl (pH 7,6)
 - 0,03-odstotni ksilen cianol FF
 - 60-odstotni glicerol
 - 60 mM EDTA
- agaroz (Sigma, Nemčija, Kat. št. A9539)

- molekularni označevalci velikosti DNA

Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, Kanada, Kat. št. SM0331)

λ / HindIII (Promega, Wisconsin (ZDA), Kat. št. G1711)

100 bp (Fermentas, Kanada, Kat. št. SM0241)



Slika 6: Pri agarozni gelski elektroforezi uporabljeni molekularni označevalci velikosti DNA. **a)** Molekularni označevalec Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (0,5 mg DNA/mL, 1-odstotni agarozni gel) (GeneRuler™..., 2006); **b)** Molekularni označevalec λ / HindIII (0,5 mg DNA/mL, 1-odstotni agarozni gel) (DNA ladders, 2006a); **c)** Molekularni označevalec 100 bp (0,2 mg DNA/mL, 1,7-odstotni agarozni gel) (DNA ladders, 2006b)

Pufer TAE (50-kratni) smo pripravili z destilirano vodo. Uravnali smo pH na 8,5 z 1 M NaOH ali HCl. Za elektroforezo smo potrebovali 1-kratno delovno raztopino pufra TAE.

• Reagenti za PCR v realnem času

- TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, New Jersey (ZDA), Kat. št. 4304437)
- Liofolizirani začetni oligonukleotidi TM-*lectin*-F in TM-*lectin*-R (Applied Biosystems, Velika Britanija)
- Hibridizacijska sonda LectinTamra, označena s kromoforom FAM, kot donorjem in TAMRA, kot akceptorjem (Applied Biosystems, Velika Britanija)

3.2.4 Aparature in naprave

Pri delu smo uporabljali standardno laboratorijsko opremo, poleg te pa še v nadaljevanju navedene aparature.

- **Tehnice**
 - Sartorius E 12000 S
 - Sartorius A 200 S
- **Centrifuge**
 - Eppendorf 5415C (za 1,5 in 2 mL centrifugirke, do 14000 vrt./min)
 - Centric 322A (za 50 mL centrifugirke, do 4000 vrt./min)
 - Sigma SK30 (z možnostjo reguliranja temperature)
- **UV-VIS spektrofotometer**
 - Pharmacia Biotech Ultraspec[®] 2000
 - kvarčne kivete volumna 0,5 mL
- **Sistem za HPLC**
 - dve črpalki KNAUER
 - dinamična mešalna komora KNAUER
 - injektor NIBEST in injekcijske zanke volumna 10, 15, 20, 30, 50, 100, 500 in 1000 µL
 - spektrofotometrični detektor KNAUER z nastavljivo valovno dolžino
 - program EUROCHROM 2000 za operacijski sistem WINDOWS
 - CIM[®] disk v ohišju (DEAE, V = 340 µL)
 - injekcijske brizge volumna 100, 500 in 1000 µL za injeciranje vzorca
- **Eletroforeza**
 - Bio-Rad Power Pac 3000 (U = 60 - 100 V)
 - Consort E455 (U = 60 - 100 V)
 - elektroforetske kadičke:
 - mala (Bio-Rad Mini-Sub[®] Cell GT)
 - srednja (Hoefer[™] HE 99X)
 - velika (Bio-Rad Sub-Cell[®] GT)
 - sistem za slikanje in obdelavo elektroforetskih gelov Bio-Rad Gel Doc 2000, programska oprema Quantity One
- **Naprava za PCR**
 - Bio-Rad PCR i-cycler 3.021
- **Naprava za PCR v realnem času**
 - Applied Biosystems ABI PRISM 7900 HT
- **Ostale naprave**
 - termoblok JULABO EM (65 °C)

3.3 METODE

3.3.1 Vzorčenje

Zaradi zahtevane relativno velike začetne mase posameznega vzorca (10 g), za uspešno osamitev zadostne količine DNA, osamitev nismo izvajali v paralelnih izvedbah. Vzorce

sojinega lecitina ter referenčne vzorce pšeničnega lecitina in lecitina pire smo po večini prejeli v neoriginalnih embalažah, in jih nato ločeno vzorčili za osamitev z metodo CTAB ter za osamitev s pomočjo CIM[®] DEAE diskov.

3.3.2 Metoda CTAB

Izvirno metodo CTAB, za osamitev DNA iz rastlinskega materiala in rastlinskih živil sta razvila Murray in Thompson (1980), za osamitev DNA iz živil v postopku odkrivanja vsebnosti GSO, pa jo med drugimi opisujejo tudi Lipp in sod. (1999, 2001). Pri našem delu, smo metodo CTAB uporabili kot referenčno metodo, ki nam je olajšala primerjavo z osamitvijo s CIM[®] DEAE diski na več področjih. Glede na težavnost osamitve DNA iz sojinega lecitina, ki predstavlja zelo viskozen matriks, smo izvorni metodi CTAB dodali še začetno ekstrakcijo s heksanom, ki jo opisujejo tudi Wurz in sod. (1998). Heksan zadovoljivo odstrani večje količine fosfolipidov v vzorcu, in olajša nadaljnjo ekstrakcijo (Terry in sod., 2002). Vsakemu vzorcu smo, z namenom lažje ekstrakcije, v prvih fazi osamitve dodali tudi 10 mL sterilne destilirane vode. Kot kontrolo osamitve (v nadaljevanju na slikah agaroznih gelov označeno kot K), ki nam je dala informacijo o morebitni navzkrižni kontaminaciji s sojino DNA med vzorci tekom osamitve, smo namesto vzorca uporabili 10 ml sterilne destilirane vode.

V našem poskusu smo DNA osamili po naslednjem prilagojenem postopku:

1. V sterilno 50 mL-centrifugirko zatehtamo 10 g vzorca;
2. dodamo 10 mL pufra CTAB-1 in 20 mL heksana ter premešamo, da dobimo homogeno raztopino;
3. dodamo še 10 mL sterilne destilirane vode in zopet premešamo na vrtničnem mešalu;
4. inkubiramo 30 min pri 65 °C; previdno premešamo na vrtničnem mešalu 3 – 4-krat med inkubacijo;
5. centrifugiramo 10 min pri 4000 vrt./min;
6. spodnjo vodno fazo prenesemo v novo centrifugirko (oz. odstranimo zgornjo heksansko fazo);
7. dodamo 20 mL heksana in premešamo, da dobimo homogeno raztopino;
8. centrifugiramo 10 min pri 4000 vrt./min;
9. spodnjo vodno fazo prenesemo v novo centrifugirko z 20 mL kloroforma in mešamo 30 s (delamo hitro, da kloroform ne poškoduje polipropilenskih centrifugirk!);
10. centrifugiramo 30 min pri 4000 vrt./min;
11. supernatant prenesemo v novo centrifugirko z 20 mL kloroforma in mešamo 30 s (delamo hitro, da kloroform ne poškoduje polipropilenskih centrifugirk!);
12. centrifugiramo 20 min pri 4000 vrt./min;
13. supernatant prenesemo v novo centrifugirko;
14. dodamo 2 volumna obarjalnega pufra CTAB-2 in premešamo s pipeto;
15. inkubiramo 60 min pri sobni temperaturi;
16. centrifugiramo vsaj 30 min pri 4000 vrt./min;
17. odpipetiramo oz. odlijemo supernatant;
18. peletu dodamo 700 µL 1,2 M NaCl in premešamo s pipeto, da se oborina raztopi;
19. raztopino prenesemo v 1,5 mL-mikrocentrifugirko;
20. dodamo ekvivalentno količino kloroforma (700 µL) in mešamo 30 s;
21. centrifugiramo 10 min pri 13000 vrt./min;

22. supernatant prenesemo s pipeto v novo mikrocentrifugirko;
23. dodamo 0,6 volumna izopropanola in nežno mešamo z obračanjem mikrocentrifugirke;
24. centrifugiramo 10 min pri 13000 vrt./min;
25. odpipetiramo supernatant.;
26. peletu dodamo 500 μ L 70-odstotnega etanola in previdno premešamo z obračanjem mikrocentrifugirke;
27. centrifugiramo 10 min pri 13000 vrt./min;
28. odpipetiramo ves supernatant in pelet posušimo na zraku (v laminariju in ob prižganem gorilniku!);
29. pelet raztopimo v 100 μ L sterilne destilirane vode;
30. raztopine shranimo pri temperaturi -20 °C.

Zaradi primanjkovanja vzorca, nismo uspeli osamiti DNA iz vzorcev št. 1 in 4. Slednja sta bila uporabljena le za osamitev DNA s pomočjo CIM[®] DEAE diskov. Začetne količine ostalih vzorcev so bile 10 g, z izjemo vzorca št. 8. Pri vzorcu št. 8 smo zaradi narave vzorca oz. optimizacije metode ločeno osamili DNA iz 5 g sojinega lecitina v dveh 50 mL-centrifugirkah. Po stopnji 8 (glej predhodno opisani prilagojeni postopek osamitve DNA z metodo CTAB) smo ekstrakta vzorca št. 8 združili v eno centrifugirko in nadaljevali po enakem postopku, kot pri ostalih vzorcih. Točne izhodiščne mase vzorca, iz katerih smo osamili DNA, so navedene v preglednici 4.

Preglednica 4: Izhodiščne mase vzorcev, iz katerih smo osamili DNA z metodo CTAB in približni volumni ekstraktov po stopnji 8

Zap. št. vzorca	Izhodiščna masa vzorca (g)	Približni volumen ekstrakta po stopnji 8* (mL)
1	NP	NP
2	10	10
3	10	6,5
4	NP	NP
5	10	7,6
6	10	17
7	10	7,5
8	2 centrifugirki po 5 g	3,5

Opombe: * glej predhodno opisani prilagojeni postopek osamitve DNA z metodo CTAB

NP - ni podatka, analize niso bile opravljene

3.3.3 Začetna ekstrakcija DNA s pufrom CTAB-1 in dodatkom heksana

Ekstrakcijo DNA s pufrom CTAB-1 in heksanom smo uporabili kot začetno metodo priprave ekstrakta. Postopek je enak začetnim stopnjam predhodno opisane metode CTAB (glej poglavje 3.3.2) in naj bi olajšal nanos vzorca na CIM[®] DEAE diske. Vsakemu vzorcu smo, z namenom lažje ekstrakcije, za nadaljnjo osamitev na CIM[®] DEAE diskih, v prvi fazi dodali tudi 10 mL sterilne destilirane vode.

Začetna ekstrakcija DNA je potekala po naslednjem prilagojenem postopku:

1. v sterilno 50 mL-centrifugirko zatehtamo 10 g vzorca;
2. dodamo 10 mL pufru CTAB-1 in 20 mL heksana ter premešamo da dobimo homogeno raztopino;

3. dodamo še 10 mL sterilne destilirane vode in zopet premešamo na vrtničnem mešalu;
4. inkubiramo 30 min pri 65 °C; previdno premešamo na vrtničnem mešalu 3 – 4 krat med inkubacijo;
5. centrifugiramo 10 min pri 4000 vrt./min;
6. spodnjo vodno fazo prenesemo v novo centrifugirko (oz. odstranimo zgornjo heksansko fazo);
7. dodamo 20 mL heksana in premešamo, da dobimo homogeno raztopino;
8. centrifugiramo 10 min pri 4000 vrt./min;
9. spodnjo vodno fazo prenesemo v novo centrifugirko (oz. odstranimo zgornjo heksansko fazo);
10. raztopino DNA prefiltriramo skozi filter s premerom por 0,45 µm.

Zaradi primanjkovanja vzorca sta se izhodiščni masi vzorcev, iz katerih smo osamili DNA, pri vzorcih št. 1 in 4, razlikovali od izhodiščnih mas ostalih vzorcev. Razlika pri izhodiščni masi vzorca št. 8 je posledica optimizacije metode. Osamitev iz večje izhodiščne mase sojinega lecitina v eni centrifugirki namreč ni dala zadostne tekoče faze (raztopina DNA v pufru CTAB-1 in vodi), potrebne za nanos na CIM[®] DEAE diske, zato smo vzorec razdelili na več ekvivalentnih podenot, kot to predlagajo tudi Zimmermann in sodelavci (1998). Točne izhodiščne mase vzorcev, dobljeni volumni ekstraktov in na CIM[®] DEAE diske nanešene količine ekstraktov, so prikazane v preglednici 5.

Pridobljene ekstrakte vzorcev smo kot rečeno, v različnih volumnih, nanašali na CIM[®] DEAE diske. Na diske nismo nanegli celotnega volumna ekstrakta, ker to ali ni bilo potrebno, ali pa bi s tem presegli mejo zaznave spektrofotometričnega detektorja, v okviru HPLC sistema. Preostali ekstrakt smo med nanosi shranjevali pri temperaturi 5 °C.

Preglednica 5: Izhodiščne mase vzorca, dobljeni volumni ekstraktov in nanešeni volumni ekstraktov za čiščenje in koncentriranje na CIM[®] DEAE diskih

Zap. št. vzorca	Izhodiščna masa lecitina (g)	Dobljeni volumen ekstrakta (mL)	Na diske nanešen volumen ekstrakta (µL)
1	6,72	4,6	4500
2	10	10	75
3	10	6,5	75
4	4,3	8	7500
5	10	7,6	7500
6	10	17	7500
7	10	7,5	7500
8	4 centrifugirke po 5 g	7,1	7000

3.3.4 Osamitev DNA z ionsko-izmenjevalno kromatografijo s CIM[®] DEAE diski

Analize na sistemu HPLC smo opravili na podjetju BIA Separations d.o.o v Ljubljani. S pomočjo sistema HPLC, natančneje ionsko-izmenjevalne kromatografije, smo ločevali DNA soje, pšenice ali pire (slednji dve sta predstavljali negativno kontrolo vsebnosti DNA soje) iz ekstrakta vzorca sojinega, pšeničnega lecitina ali lecitina pire.

Ekstrakte smo pripravili po postopku, opisanem v poglavju 3.3.3. Zaradi postopka začetne ekstrakcije DNA iz vzorcev s pufrom CTAB-1 in heksanom (poglavje 3.3.3), je problem

predstavljala predvsem visoka molarna koncentracija NaCl v pufru CTAB-1 (1,4 M NaCl). Ta bi lahko pri večanju volumna nanesenega ekstrakta onemogočala izmenjavo molekul DNA med mobilno in stacionarno fazo. Na diske nanešene ekstrakte smo zato, z razlogom izogibanja neustreznosti molarni koncentraciji NaCl, še dodatno redčili z destilirano vodo v razmerju 3:1 (Jerman in sod., 2005).

Kot začetno preverjanje ustreznosti postavljene HPLC metode, smo uporabili ločevanje genomske DNA lososovih mod iz standardne vodne raztopine ($\gamma_{\text{DNA}} = 0,5 \text{ g/L}$) in opravili nekaj predposkusov na ločevanju DNA iz ekstrakta pšeničnega lecitina in ekstrakta enega od vzorcev sojinega lecitina.

Kromatografske separacije so potekale pri naslednjih pogojih (Jerman in sod., 2005):

- kromatografska kolona s CIM[®] DEAE diskom;
- pH = 8;
- linearni gradient NaCl (v Tris pufru) od 0,25 do 2 M;
- sobna temperatura;
- uporabljen volumen vzorca od 75 do 7500 μL (neredčeno), ki smo mu dodali destilirano vodo, da smo dosegli redčitev 3:1 (3 volumske enote ekstrakta in 1 volumska enota vode) za doseg večjega izkoristka osamitve.

Frakcije z DNA smo zbirali v 1,5 mL centrifugirkah in jih dalje obdelali po naslednjem prilagojenem postopku za oboritev DNA (Jerman in sod., 2005):

1. dodamo 2-kratni volumen absolutnega etanola;
2. inkubiramo 30 min na ledu;
3. centrifugiramo 10 min pri 13000 vrt./min;
4. odlijemo supernatant;
5. dodamo 0,5 mL 70-odstotnega etanola in premešamo s pipeto;
6. centrifugiramo 10 min pri 13000 vrt./min;
7. odlijemo supernatant in pelet raztopimo v 100 μL sterilne destilirane vode.

3.3.5 Spektrofotometrične analize

Določali smo koncentracijo nukleinskih kislin v vodnih raztopinah, dobljenih pri osamitvi DNA iz vzorcev lecitina z metodo CTAB (glej poglavje 3.3.2.). Poleg tega smo s to metodo določali tudi koncentracijo nukleinskih kislin v vodnih raztopinah DNA, osamljenih s pomočjo CIM[®] DEAE diskov ter dalje obdelanih po zgoraj opisanem postopku za oboritev DNA. 5 μL raztopine DNA smo zmešali s 495 μL destilirane vode in nato v kvarčnih kivetah izmerili absorbanco vzorcev pri valovnih dolžinah 260, 280 in 230 nm. Absorpcijski maksimum nukleinskih kislin je namreč pri 260 nm, proteinov pri 280 nm, pri 230 nm pa maksimalno absorbirajo nečistoče, kot so polisaharidi, peptidi, etanol in EDTA. Za dvoverižno DNA velja, da ima 50 ng/ μL DNA, pri valovni dolžini 260 nm, vrednost absorbance enako 1. Koncentracijo DNA smo izračunali po naslednji enačbi (Rapley, 2005):

$$\gamma_{\text{DNA}} = A_{260} \times R \times F \quad (\text{ng}/\mu\text{L}) \quad \dots (1)$$

R = redčitveni faktor; F = faktor DNA (50 ng/ μL)

Iz razmerja med absorbancama pri valovnih dolžinah 260 in 280 nm ter razmerja med absorbancama pri valovnih dolžinah 260 in 230 nm smo sklepali na čistost DNA. Velja, da ima raztopina čiste DNA vrednost prvega razmerja približno 1,8. Če je vrednost precej večja, lahko sklepamo na večje količine RNA v vzorcu; če pa je vrednost manjša, je vzorec onesnažen s proteini. Vrednost drugega razmerja, je za raztopino čiste DNA večja od 2,2 (Karcher, 1994; Somma, 2004; Rapley, 2005).

3.3.6 Kvalitativni PCR

S kvalitativnim PCR smo, za vsak posamezen vzorec DNA, izvedli test pomnoževanja. Gre za reakcijo z začetnima oligonukleotidoma, ki sta specifična za odsek za sojo specifičnega *lectin* gena (*Le1*). Z reakcijo smo skušali potrditi prisotnost sojine DNA in s tem ustreznost vzorca za nadaljnjo presejalno PCR analizo. Presejalna analiza je vključevala reakciji PCR s parom začetnih oligonukleotidov, ki sta specifična za odsek CaMV 35S promotorja; in drugim parom začetnih oligonukleotidov, ki sta specifična za NOS terminator gena za nopalin sintazo s Ti plazmida bakterije *Agrobacterium tumefaciens*. Omenjeni promotor in terminator sta najbolj široko uporabljeni genski sekvenci za regulacijo transgenov in sta del rekombinantnih genskih konstruktov. Uporabljata se tudi za identifikacijo v EU dovoljene Roundup Ready[®] soje (Lipp in sod., 2001; Querci in sod., 2004).

Zaporedja začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabili v analizah PCR, so naslednja (Querci in sod., 2004):

- Pomnoževanje odseka *lectin* gena:
GMO3: 5'-GCCCTCTACTCCACCCCCATCC-3' (22 bp)
GMO4: 5'-GCCCATCTGCAAGCCTTTTGTG-3' (23 bp)
Pomnožen odsek, ki je specifičen za sojin *lectin* gen, je dolg 118 bp.
- Pomnoževanje odseka CaMV 35S promotorja:
p35S-cf3: 5'-CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG-3' (21 bp)
p35S-cr4: 5'-TCCTCTCCAAATGAAATGAACTTCC-3' (25 bp)
Pomnožen odsek, ki je specifičen za CaMV 35S promotor, je dolg 123 bp.
- Pomnoževanje odseka NOS terminatorja:
HA-nos 118-f: 5'-GCATGACGTTATTTATGAGATGGG-3' (24 bp)
HA-nos 118-r: 5'-GACACCGCGCGCGATAATTTATCC-3' (24 bp)
Pomnožen odsek, ki je specifičen za NOS terminator, je dolg 118 bp.

Reakcije PCR so potekale pri pogojih, ki jih kažejo preglednice 6, 7 in 8.

Preglednica 6: Pogoji PCR za pomnoževanje odseka *lectin* gena (Querici in sod., 2004)

Reagenti	Končna konc.	Časovni in temperaturni potek reakcije	
voda za PCR	/	1. začetna denaturacija 2. denaturacija prileganje zač. olig. podaljševanje št. ciklov 3. končno podaljševanje 4. ohlajanje	3 min pri 95 °C 30 s pri 95 °C 30 s pri 63 °C 30 s pri 72 °C 40 3 min pri 72 °C ∞ pri 4 °C
PCR pufer 10 X	1 X		
50 mM MgCl ₂	2,5 mM		
2,5 mM dNTP	0,2 mM		
20 μM zač. oligonukl. GMO3	0,5 μM		
20 μM zač. oligonukl. GMO4	0,5 μM		
Taq DNA polimeraza 5 U/μL	0,025 U/μL		
vzorec DNA	2 μL		
Končni volumen	50 μL		

Preglednica 7: Pogoji PCR za pomnoževanje odseka CaMV 35S promotora (Querici in sod., 2004)

Reagenti	Končna konc.	Časovni in temperaturni potek reakcije	
voda za PCR	/	1. začetna denaturacija 2. denaturacija prileganje zač. olig. podaljševanje št. ciklov 3. končno podaljševanje 4. ohlajanje	3 min pri 95 °C 25 s pri 95 °C 30 s pri 62 °C 45 s pri 72 °C 50 7 min pri 72 °C ∞ pri 4 °C
PCR pufer 10 X	1 X		
50 mM MgCl ₂	2,5 mM		
2,5 mM dNTP	0,2 mM		
10 μM zač. oligonukl. p35S-cf3	0,5 μM		
10 μM zač. oligonukl. p35S-cr4	0,5 μM		
Taq DNA polimeraza 5 U/μL	0,025 U/μL		
vzorec DNA	2 μL		
Končni volumen	50 uL		

Preglednica 8: Pogoji PCR za pomnoževanje odseka NOS terminatorja (Querici in sod., 2004)

Reagenti	Končna konc.	Časovni in temperaturni potek reakcije	
voda za PCR	/	1. začetna denaturacija 2. denaturacija prileganje zač. olig. podaljševanje št. ciklov 3. končno podaljševanje 4. ohlajanje	3 min pri 95 °C 25 s pri 95 °C 30 s pri 62 °C 45 s pri 72 °C 50 7 min pri 72 °C ∞ pri 4 °C
PCR pufer 10 X	1 X		
50 mM MgCl ₂	2,5 mM		
2,5 mM dNTP	0,2 mM		
10 μM zač. oligonukl. HA-nos 118-f	0,5 μM		
10 μM zač. oligonukl. HA-nos 118-r	0,5 μM		
Taq DNA polimeraza 5 U/μL	0,025 U/μL		
vzorec DNA	2 μL		
Končni volumen	50 μL		

Pri posameznem PCR smo ustrezno količino reagentov, v vrstem redu, kot so navedeni v preglednicah 6, 7 in 8, zamešali v ustrezno količino vode za PCR. Tako smo dobili skupno reakcijsko mešanico. To smo rahlo premešali na vrtničnem mešalu in s pipetiranjem. Nato smo mešanico razdelili v 0,2 mL-PCR mikrocentrifugirke, in sicer v vsako po 48 μL mešanice. Na koncu smo v vsako PCR mikrocentrifugirko dodali še 2 μL ustrezne raztopine DNA iz vzorca, kontrole osamitve (v primeru vzorca, osamljenega po metodi CTAB), pozitivne kontrole, negativne kontrole ali vode za negativno kontrolo reakcijske mešanice za PCR (v nadaljevanju na slikah agaroznih gelov označeno kot N). Mešanice smo rahlo premešali na vrtničnem mešalu in jih vstavili v PCR aparaturo. Po končani reakciji smo vzorce rahlo premešali na vrtničnem mešalu in jih analizirali z agarozno gelsko elektroforezo v 2,5-odstotnem gelu, po postopku opisanem v poglavju 3.3.7.

3.3.7 Agarozna gelska elektroforeza

Agarozno gelsko elektroforezo smo, pred PCR, izvedli z namenom grobe ocenitve količine osamljene DNA ter stopnje njene razgrajenosti. Po končanem PCR smo s to metodo analizirali pomnožke PCR. V prvem primeru smo uporabljali 1,5-odstotni gel, v drugem pa 2,5-odstotnega (Querci in sod., 2004). Princip priprave gela je prikazan v preglednici 9.

Preglednica 9: Priprava ustreznega agaroznega gela za elektroforezo

Zamreženost gela (%)	Gel	Količina agaroze (g)	Količina pufru TAE 1 X (mL)
1,5	mali (8 jamic)	0,45	30
	srednji (15 – 30 jamic)	2,25	150
	veliki (20 – 40 jamic)	2,55	170
2,5	mali (8 jamic)	0,75	30
	srednji (15 – 30 jamic)	3,75	150
	veliki (20 – 40 jamic)	4,25	170

Gel smo v obeh primerih pripravili tako, da smo ustrezno količino agaroze umešali v ustrezen volumen predhodno pripravljenega 1-kratnega pufru TAE. Suspenzijo agaroze smo zaklejšali v mikrovalovni pečici, dokler ni postala bistra. Nato smo gel ohladili do približno 60 °C, ga razlili v ustrezen model ter namestili glavniček. Ohlajen gel smo z modelom vred vstavili v ustrezno elektroforetsko kadičko, ga zalili z 1-kratnim pufrom TAE, v jamice pa nanесли vzorce. Vzorci so bili predhodno pripravljeni v mikrotiterski ploščici (3 µL raztopine DNA ali pomnožka PCR, 5 µL sterilne destilirane vode in 2 µL nanašalnega pufru). Pogoji elektroforeze so prikazani v preglednici 10.

Preglednica 10: Pogoji agarozne gelske elektroforeze

Elektrof. kadička	Zamreženost gela (%)	Približen čas trajanja in napetost
mala	1,5	60 min pri napetosti 60 – 100 V
srednja	2,5	180 min pri napetosti 60 V
velika	1,5	180 min pri napetosti 60 V
	2,5	210 min pri napetosti 60 V

Po končani elektroforezi smo gel obdelali tako, da smo ga 10 min namakali v raztopini etidijevega bromida in nato še 10 min v destilirani vodi. Slikali smo ga z uporabo UV-transiluminatorja in računalniškega programa Quantity One.

3.3.8 PCR v realnem času

Analize PCR v realnem času so bile opravljene na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani. Namen je bil preverjanje kakovosti DNA, ki smo jo predhodno osamili z metodo CTAB in s pomočjo ionsko-izmenjevalne kromatografije s CIM® DEAE diski. Zanimala nas je predvsem prisotnost inhibitorjev v vzorcih osamljene DNA. V ta namen smo za vsak posamezen vzorec uporabili neredčeno in 10-krat redčeno varianto. Poskus smo izvedli v paralelnih izvedbah. Pomnoževali smo odsek *lectin* gena, specifičnega za sojino DNA.

Zaporedja uporabljenih začetnih oligonukleotidov in hibridizacijske sonde so naslednja (NIB):

TM-*lectin*-F: 5'-TCCACCCCCATCCACATTT-3' (19 bp)

TM-*lectin*-R: 5'-GGCATAGAAGGTGAAGTTGAAGGA-3' (24 bp)

Hibrid. sonda: 6-FAM-AACCGGTAGCGTTGCCAGCTTCG-TAMRA (23 bp)

Preglednica 11: Pogoji PCR v realnem času, za pomnoževanje odseka *lectin* gena (NIB)

Reagenti	Končna konc.	Časovni in temperaturni potek reakcije
TaqMan [®] Master Mix	1 X	2 min pri 50 °C 10 min pri 95 °C 50 ciklov: 15 s pri 95 °C 1 min pri 60 °C
2 µM hibrid. sonda	0,2 µM	
9 µM zač.olig. TM- <i>lectin</i> -F	0,9 µM	
9 µM zač.olig. TM- <i>lectin</i> -R	0,9 µM	
vzorec DNA	2 µL	
Končni volumen	10 µL	

Ustrezno količino reagentov smo, v vrstem redu, kakršnem so navedeni v preglednici 11, zmešali v mikrotitrski ploščici. Tako smo dobili skupno reakcijsko mešanico. Na koncu smo v vsako ustrezno luknjico mikrotitrške ploščice dodali še 2 µL ustrezne raztopine DNA (ekstrakt vzorca), pozitivne kontrole ali negativne kontrole. Mešanice za PCR smo rahlo premešali in jih vstavili v PCR aparaturu. PCR v realnem času je potekal pri pogojih, ki so podani v preglednici 11.

PCR v realnem času nam je dal nazorne številčne kot tudi slikovne rezultate. Na podlagi razlik med 10-krat redčenima in neredčenima paralelnima vzorcema izračunanih vrednosti ΔC_t , smo lahko sklepali na morebitno inhibicijo reakcije v neredčenih vzorcih. Iz primerjave dobljenih vrednosti C_t (točka, kjer krivulja seka fluorescenčni prag zaznave) za vzorce, osamljene z metodo CTAB in s pomočjo CIM[®] DEAE diskov smo skušali sklepati tudi na razliko v začetnih količinah DNA pred PCR v realnem času.

4 REZULTATI

Izhajajoč iz cilja naloge, ki predvideva postavitve metode oz. osamitev DNA GS-soje iz sojinega lecitina smo analizirali vzorce sojinega lecitina. Razlog za tako odločitev je vezan na vse večjo uporabo aditivov v živilstvu, ki vključujejo izdelke, pripravljene iz soje. Zakonodaja EU zahteva jasno označevanje GS-živil. Zaradi agresivnih postopkov za pridobivanje lecitina, je mogoče pričakovati, da se bo izvor lecitina iz GS-soje zabilisal.

Analize smo opravljali na šestih različnih vzorcih sojinega lecitina ter referenčnih vzorcih lecitina pire in pšenice. Izvedli smo osamitev DNA iz vzorcev sojinega lecitina z začetno ekstrakcijo DNA s pufrom CTAB-1 in dodatkom heksana ter dodatno čiščenje in koncentriranje DNA z ionsko-izmenjevalno kromatografijo s CIM[®] DEAE diski; kot referenčno metodo smo uporabili metodo CTAB. Sledile so ločene analize vzorcev za preverjanje količine in kakovosti osamljene DNA in primerjave med uspešnostjo uporabljenih metod osamitve. V ta namen smo izvedli spektrofotometrične meritve, s katerimi smo določali koncentracijo in čistost nukleinskih kislin; agarozno gelsko elsktroforezo za določanje razgrajenosti DNA; kvalitativni PCR in PCR v realnem času za dokaz za sojo specifičnega odseka *lectin* gena ter PCR v realnem času za dokaz prisotnosti inhibitorjev PCR in grobe relativne primerjave v količini osamljene DNA med metodama. Na koncu smo s kvalitativnim PCR izvedli tudi presejalno analizo za določanje prisotnosti DNA GS-soje v preiskovanih vzorcih. Zaradi pomanjkanja vzorcev so bile analize opravljene le enkrat in deloma okrnjene. Osamitev DNA iz vzorcev z metodo CTAB smo opravili v laboratorijih Katedre za biotehnologijo, na Oddelku za živilstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Analize, povezane z uporabo HPLC sistema, so potekale v laboratorijih podjetja BIA Separations d.o.o v Ljubljani. Analize PCR v realnem času so potekale na Oddelku za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo, na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani.

V nadaljevanju so predstavljeni rezultati, pridobljeni v času od 22. junija do 29. septembra 2006, ko je bilo opravljenih približno 230 ur laboratorijskega dela.

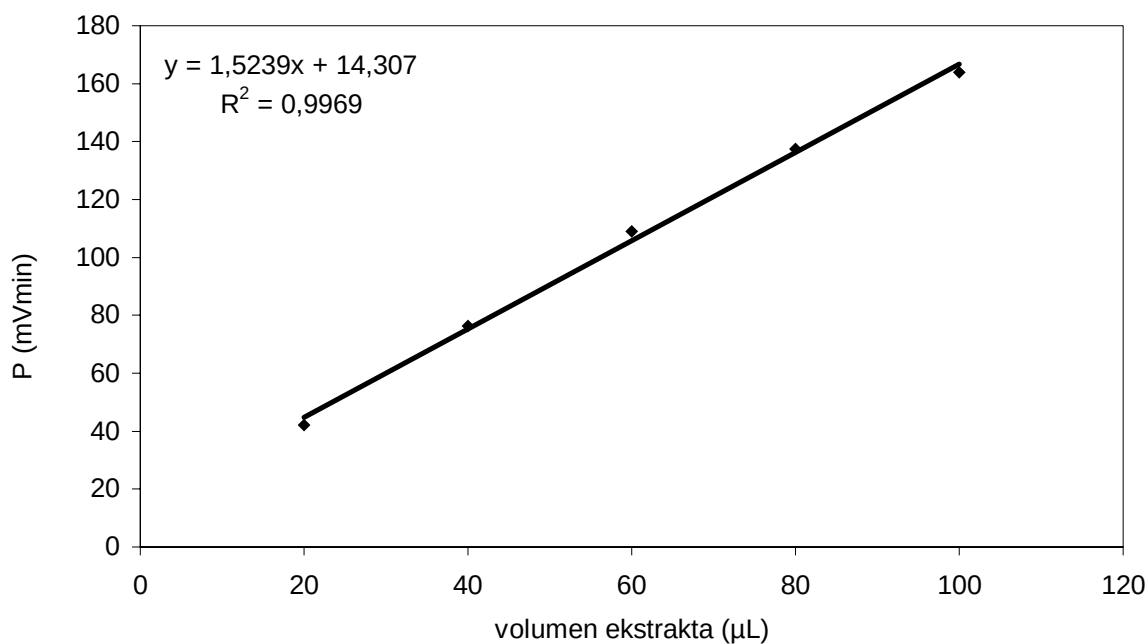
4.1 OSAMITEV DNA Z IONSKO-IZMENJEVALNO KROMATOGRAFIJO S CIM[®] DEAE DISKI

Pri našem delu smo skušali iz 6 vzorcev sojinega lecitina ter vzorca pšeničnega lecitina in lecitina pire (referenčna vzorca za neg. kontrolo), osamiti zadostno količino DNA, za uspešno uporabo v nadaljnjih analizah kvalitativnega PCR in PCR v realnem času, za izvedbo testa pomnoževanja odseka *lectin* gena in nato še presejalne analize za določanje GS-soje. Osamitev smo izvedli z začetno ekstrakcijo DNA s pufrom CTAB-1 in dodatkom heksana. Sledilo je čiščenje in koncentriranje DNA z ionsko-izmenjevalnimi CIM[®] DEAE diski.

4.1.1 Optimizacija pogojev ločevanja

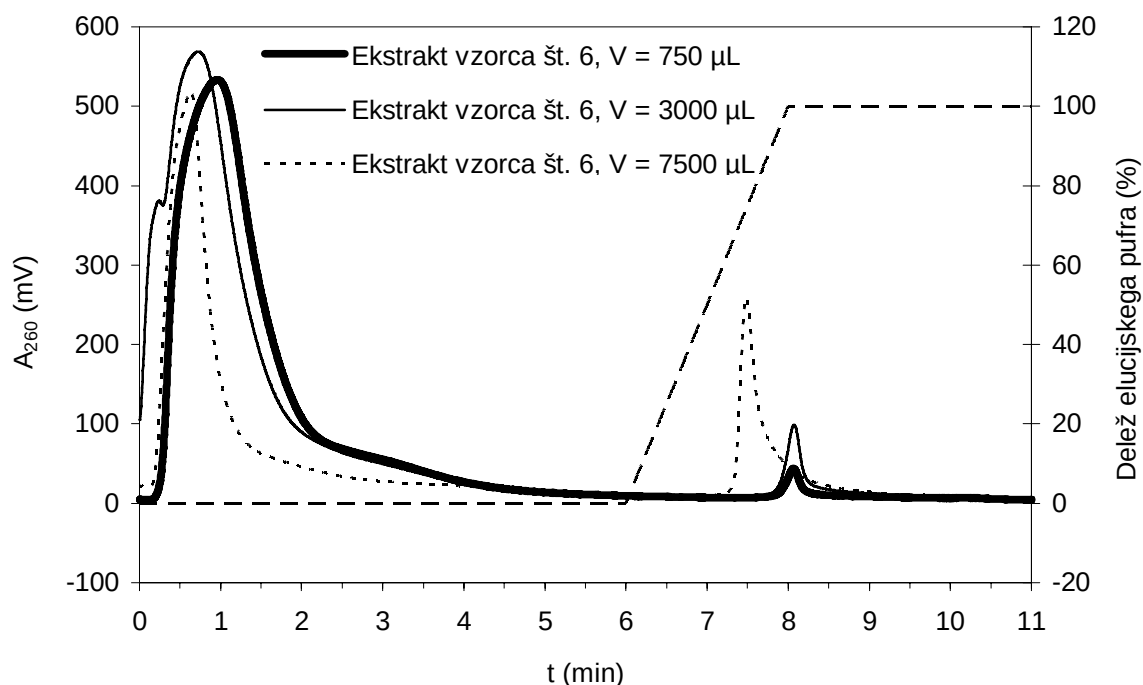
V predposkusih smo skušali optimizirati HPLC program, izbrane pogoje in delovanje CIM[®] DEAE diska, za ločevanje DNA od nečistoč. To smo storili tako, da smo iz standardne vodne raztopine poskusili ločiti lososovo genomsko DNA iz mod (priloga A1). Ugotovili smo, da so pogoji ustrezni in da je vrh ustrezne oblike in površine, ki se povečuje z večanjem količine nanešenega ekstrakta.

Nadaljevali smo z osamitvijo DNA iz ekstrakta pšeničnega lecitina po enakem programu ločevanja. Preverili smo odvisnost površine kromatografskih vrhov od nanešene količine ekstrakta, za ekstrakte do 100 µL (slika 7). Za poskus smo uporabili ekstrakt vzorca št. 2 (pšenični lecitin), ki smo ga imeli največ in je dal zadovoljiv signal na kromatogramu že pri majhnih nanešenih količinah ekstrakta. Osamitev in pogoji kromatografije so se izkazali za uspešne. Korelacija med površino vrha in nanešeno količino ekstrakta je bila linearna.

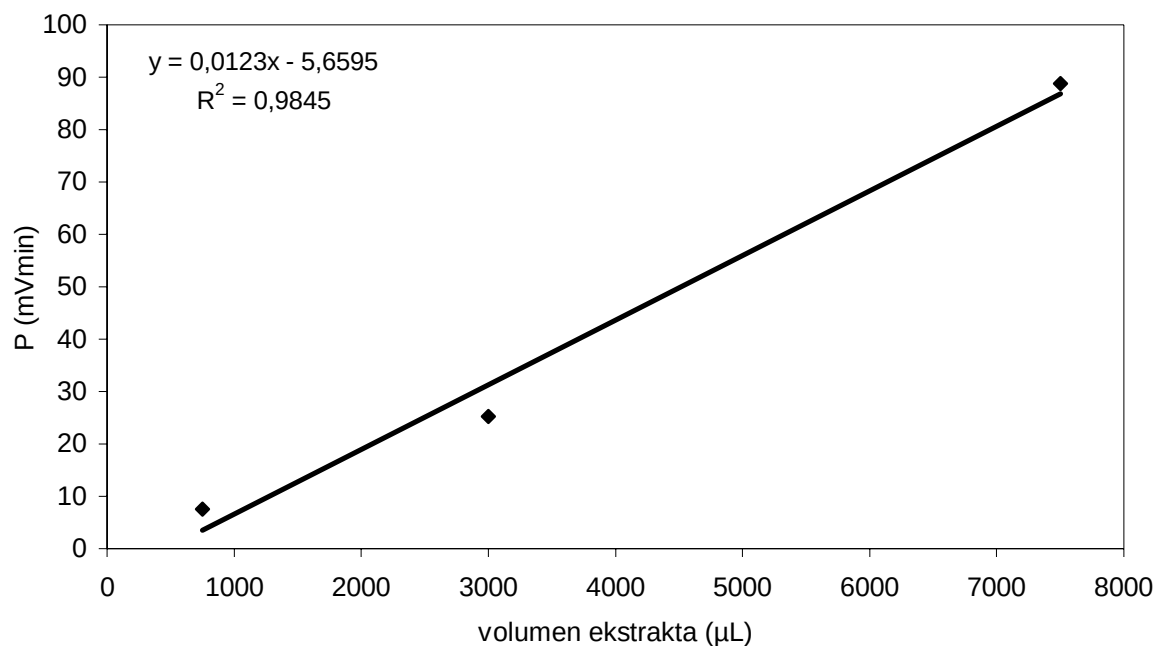


Slika 7: Površine kromatografskih vrhov v odvisnosti od nanešene količine ekstrakta vzorca št. 2 - pšenični lecitin (CIM[®] DEAE; pH = 8; Φ_v = 1 mL/min; gradient NaCl = 0,25 – 2 M)

Poskuse smo nadaljevali z ekstrakti, pripravljenimi iz sojinega lecitina po postopku, opisanem v poglavju 3.3.3. Metodo smo, glede na pričakovano visoko količino nečistoč prilagodili tako, da smo podaljšali začetni čas spiranja nečistoč s 4 min (priloga A1) na 6 min. Postopna zamenjava nanašalnega z elucijskim pufrom je torej potekala med šesto in osmo minuto poteka metode. Postopoma smo povečevali injekcijski volumen in pri tem preverili odvisnost površine in oblike kromatografskega vrha od nanešene količine ekstrakta in pri tem ugotovili, da se signal pričakovano povečuje dokaj linearno (slika 9) in je pravilne oblike (slika 8). Količino nanešenega ekstrakta smo povečevali, dokler nismo na spektrofotometričnem detektorju HPLC sistema dosegli signala v višini približno 200 mV. Pri tem smo upoštevali dejstvo, da je količina DNA v sojinem lecitinu zaradi postopka pridobivanja lecitina majhna (Zimmermann in sod., 1998). V kolikor nam zmanjšana zaloga vzorcev poskusov ni več dopuščala, smo se bili primorani z doseženim signalom zadovoljiti.



Slika 8: Odvisnost višine in oblike kromatograma od nanešene količine ekstrakta vzorca št. 6 (sojin lecitin), osamljenega s CIM® DEAE diski (raztopina DNA v pufu CTAB-1 in vodi; nanešen volumen ekstrakta je 750, 3000 in 7500 µL; ekstrakt redčimo z destilirano vodo v razmerju 3:1 (skupni injekcijski volumni 1000, 4000 in 10000 µL); pH = 8, $\Phi_v = 1$ mL/min; gradient NaCl = 0,25 – 2 M; inj. zanki 500 µL (za nanos 10000 µL inj. volumna) in 1000 µL (za nanos 1000 in 4000 µL inj. volumna))

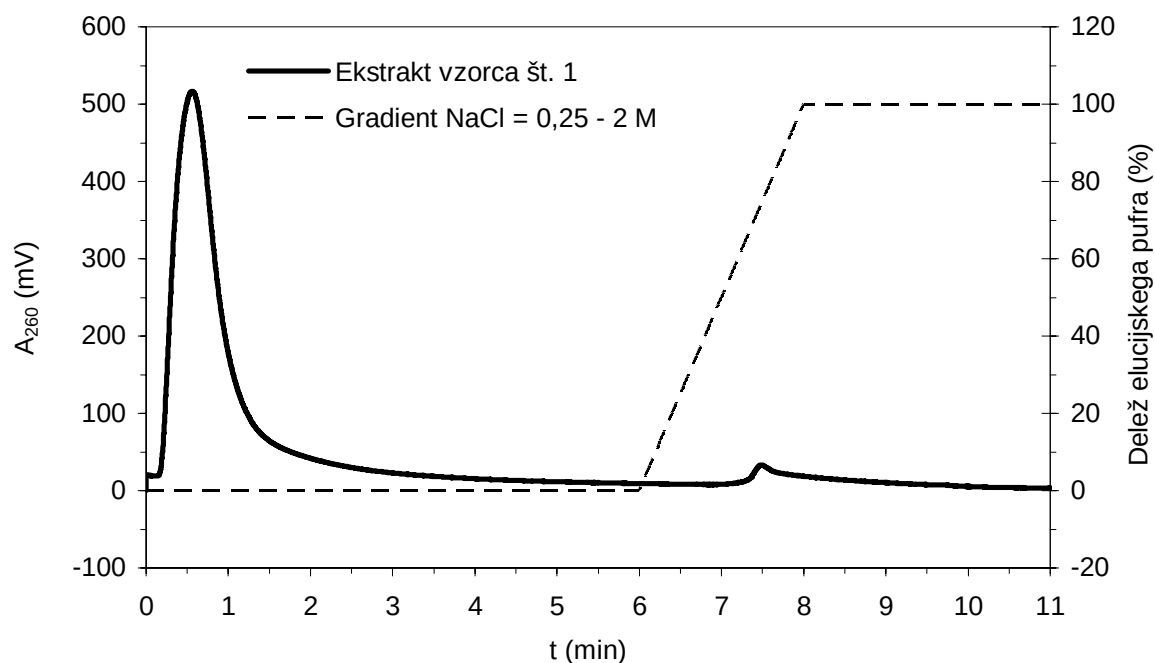


Slika 9: Površine kromatografskih vrhov v odvisnosti od nanešene količine ekstrakta vzorca št. 6 – sojin lecitin (CIM® DEAE; pH = 8; $\Phi_v = 1$ mL/min; gradient NaCl = 0,25 – 2 M)

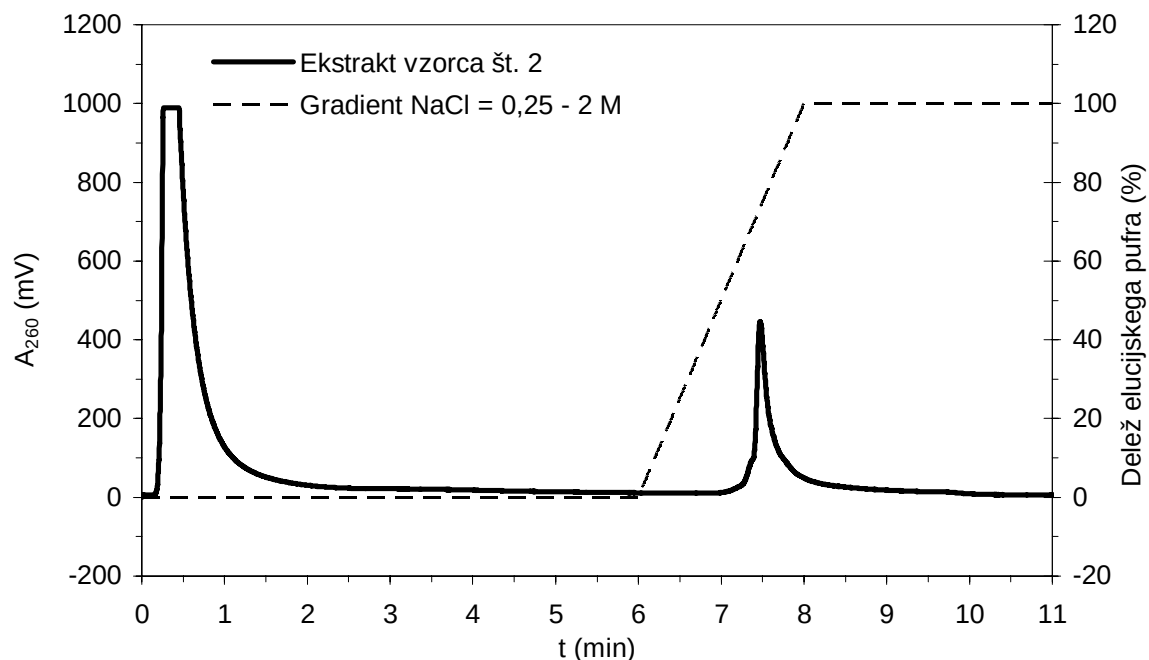
4.1.2 Osamitev DNA iz ekstraktov

Rezultate, ugotovljene med optimizacijo metode smo uporabili kot izhodišče za vse ostale ekstrakte sojinega lecitina, ki smo ga skušali torej nanašati v čim večji količini, da bi pridobili čim večjo količino DNA.

Slike 10 do 17 prikazujejo kromatograme osamitve DNA iz ekstraktov vzorcev št. 1 - 8, katerih pridobljene frakcije z DNA smo shranili za nadaljnje analize. Vrhovi, ki prikazujejo spiranje DNA z diska (2. vrh na slikah) so pravih oblik, z izjemo vzorca št. 3 (lecitin pire) ki vsebuje večjo količino nečistoč, ki se predhodno niso uspele popolnoma odstraniti. Pod izbranimi pogoji: pH 8, pretok 1 ml/min ter gradient NaCl v tris pufru 0,25 – 2 M, ki poteka od šeste do osme minute poteka ločevanja, smo s CIM® DEAE diski osamili DNA iz 4500 µL (vzorec št. 1, slika 10), 7000 µL (vzorec št. 8; slika 17) in 7500 µL (vzorci št. 4, 5, 6 in 7; slike 13, 14, 15 in 16) ekstraktov vzorcev sojinega lecitina ter iz 75 µL ekstrakta pšeničnega lecitina (vzorec št., 2; slika 11) in lecitina pire (vzorec št. 3; slika 12). Ekstrakta vzorcev št. 1 in 7 kažeta nekoliko nižje signale od ostalih.

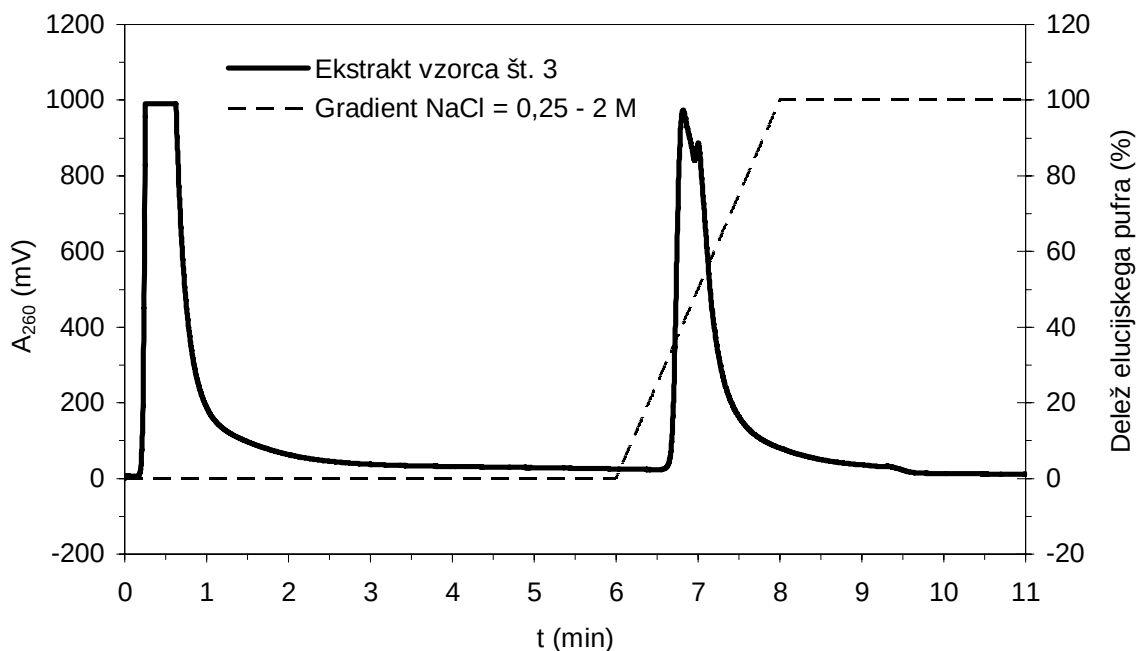


Slika 10: Kromatogram osamitve DNA iz ekstrakta vzorca št. 1 (sojin lecitin) s CIM® DEAE diski (raztopina DNA v pufru CTAB-1 in vodi; nanešen volumen ekstrakta je 4500 μL ; ekstrakt redčimo z destilirano vodo v razmerju 3:1 (injekcijski volumen 6000 μL); pH = 8; $\Phi_v = 1$ mL/min; gradient NaCl = 0,25 – 2 M; 500 μL inj. zanka)

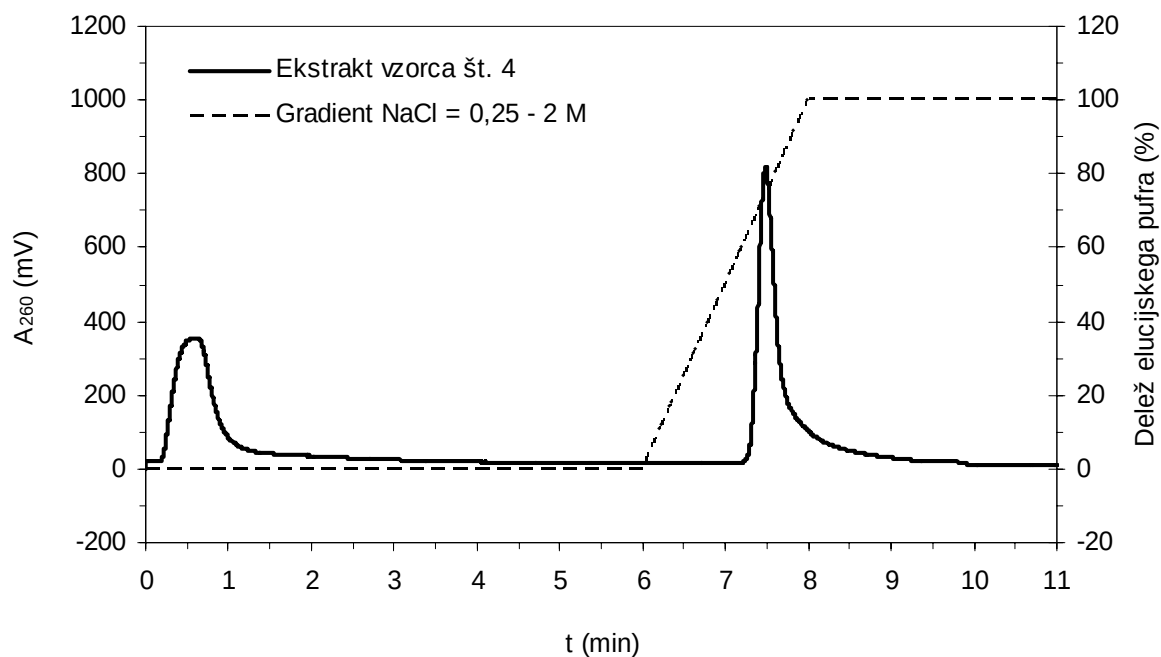


Slika 11: Kromatogram osamitve DNA iz ekstrakta vzorca št. 2 (pšenični lecitin) s CIM® DEAE diski (raztopina DNA v pufru CTAB-1 in vodi; nanešen volumen ekstrakta je 75 μL ; ekstrakt redčimo z destilirano vodo v razmerju 3:1 (injekcijski volumen 100 μL), pH = 8; $\Phi_v = 1$ mL/min; gradient NaCl = 0,25 – 2 M; 500 μL inj. zanka)

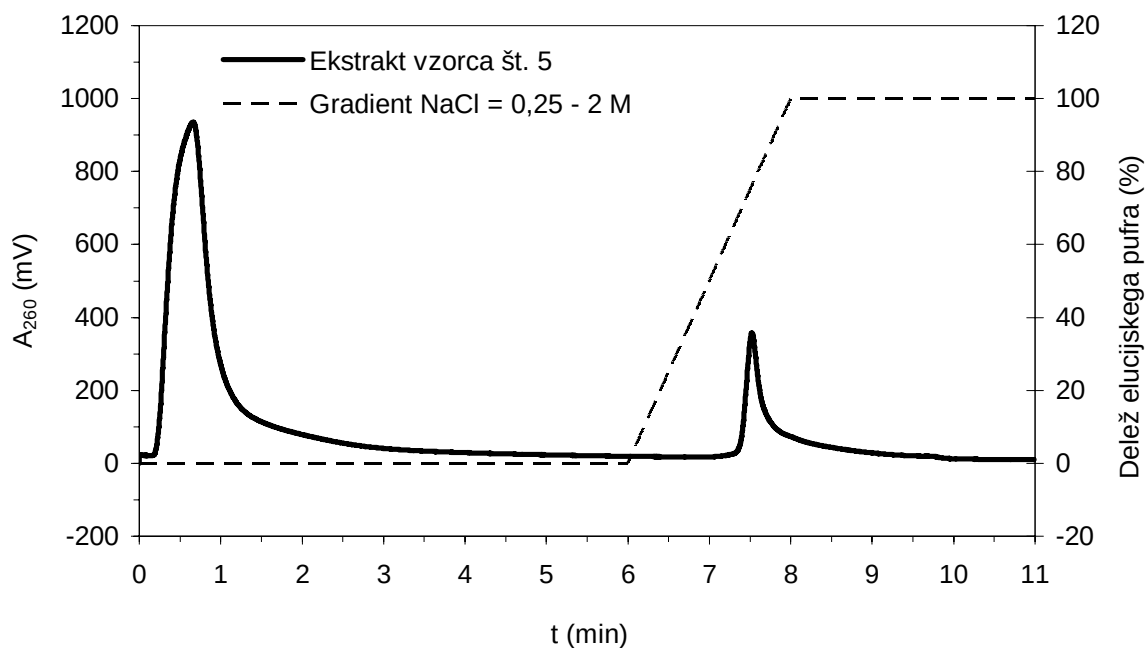
bila prisotna velika količina DNA (glej poglavje 4.2.2, slika 23).



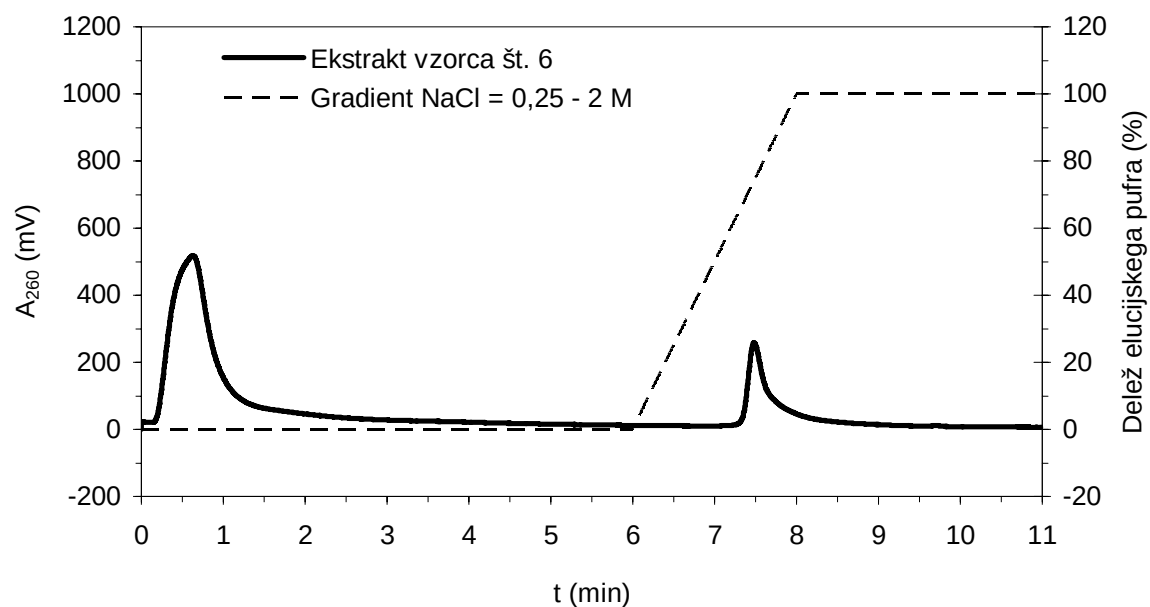
Slika 12: Kromatogram osamitve DNA iz ekstrakta vzorca št. 3 (lecitin pire) s CIM[®] DEAE diski (raztopina DNA v pufru CTAB-1 in vodi; nanesešen volumen ekstrakta je 75 µL; ekstrakt redčimo z destilirano vodo v razmerju 3:1 (injekcijski volumen 100 µL), pH = 8, $\Phi_v = 1$ mL/min; gradient NaCl = 0,25 – 2 M; 100 µL inj. zanka)



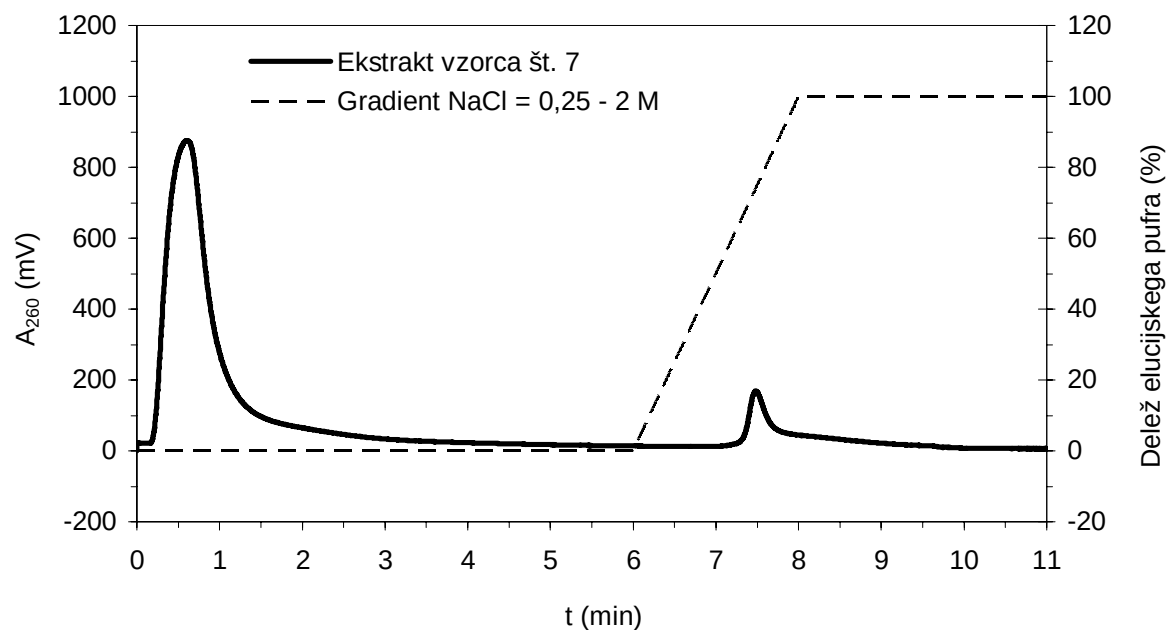
Slika 13: Kromatogram osamitve DNA iz ekstrakta vzorca št. 4 (sojin lecitin) s CIM® DEAE diski (raztopina DNA v pufu CTAB-1 in vodi; nanešen volumen ekstrakta je 7500 μ L; ekstrakt redčimo z destilirano vodo v razmerju 3:1 (injekcijski volumen 10000 μ L), pH = 8, Φ_v = 1 mL/min; gradient NaCl = 0,25 – 2 M; 500 μ L inj. zanka)



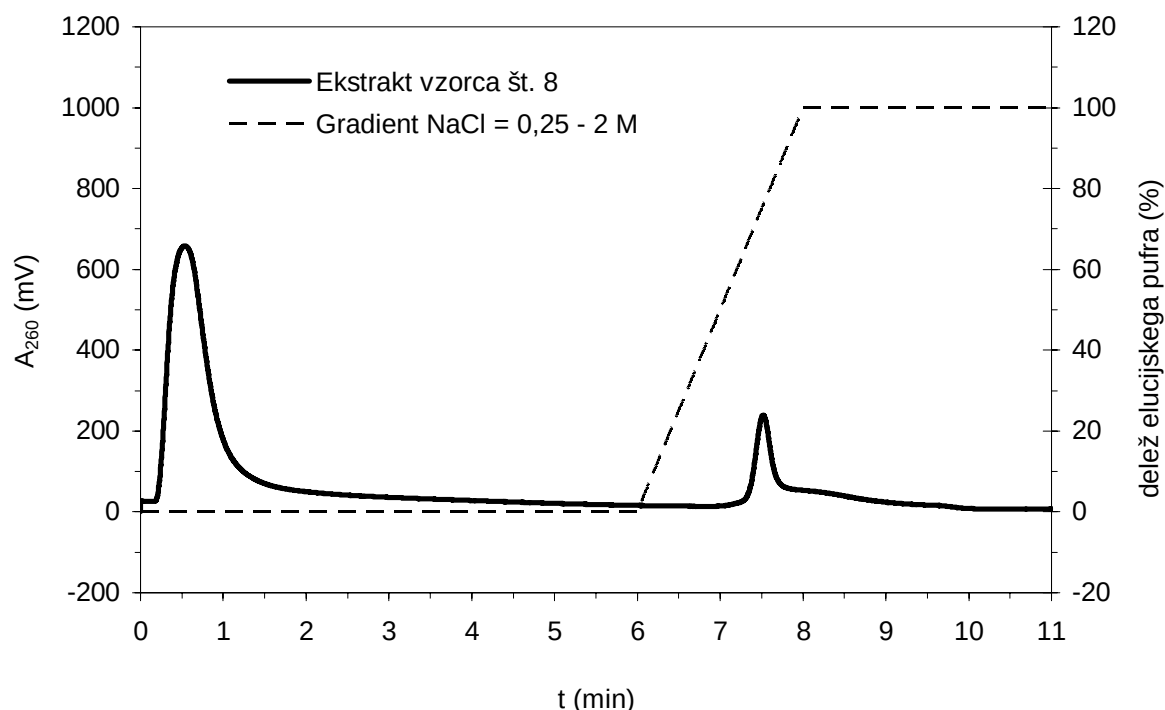
Slika 14: Kromatogram osamitve DNA iz ekstrakta vzorca št. 5 (sojin lecitin) s CIM® DEAE diski (raztopina DNA v pufu CTAB-1 in vodi; nanešen volumen ekstrakta je 7500 μ L; ekstrakt redčimo z destilirano vodo v razmerju 3:1 (injekcijski volumen 10000 μ L), pH = 8, Φ_v = 1 mL/min; gradient NaCl = 0,25 – 2 M; 500 μ L inj. zanka)



Slika 15: Kromatogram osamitve DNA iz ekstrakta vzorca št. 6 (sojin lecitin) s CIM[®] DEAE diski (raztopina DNA v pufu CTAB-1 in vodi; nanešen volumen ekstrakta je 7500 μ L; ekstrakt redčimo z destilirano vodo v razmerju 3:1 (injekcijski volumen 10000 μ L), pH = 8, Φ_v = 1 mL/min; gradient NaCl = 0,25 – 2 M; 500 μ L inj. zanka)



Slika 16: Kromatogram osamitve DNA iz ekstrakta vzorca št. 7 (sojin lecitin) s CIM[®] DEAE diski (raztopina DNA v pufu CTAB-1 in vodi; nanešen volumen ekstrakta je 7500 μ L; ekstrakt redčimo z destilirano vodo v razmerju 3:1 (injekcijski volumen 10000 μ L), pH = 8, Φ_v = 1 mL/min; gradient NaCl = 0,25 – 2 M; 500 μ L inj. zanka)



Slika 17: Kromatogram osamitve DNA iz ekstrakta vzorca št. 8 (sojin lecitin) s CIM® DEAE diski (raztopina DNA v pufru CTAB-1 in vodi; nanešen volumen ekstrakta je 7000 μL ; ekstrakt redčimo z destilirano vodo v razmerju 3:1 (injekcijski volumen 9334 μL), pH = 8, Φ_v = 1 mL/min; gradient NaCl = 0,25 – 2 M; 500 μL inj. zanka)

Frakcije z DNA (2. vrh na slikah 10 – 17), ki smo jih zbirali v mikrocentrifugirke, smo kasneje analizirali spektrofotometrično, na agarozni gelski elektroforezi ter z analizami PCR.

4.2 PREVERJANJE KONCENTRACIJE IN KAKOVOSTI OSAMLJENE DNA

4.2.1 Spektrofotometrične analize

Po osamitvi DNA iz vzorcev lecitina smo ekstraktom izmerili absorbanco pri valovni dolžini 260 nm, 280 in 230 nm. S pomočjo izmerjene absorbance pri valovni dolžini 260 nm smo določili koncentracijo nukleinskih kislin (NK). Iz izračunanega razmerja med absorbancama pri valovnih dolžinah 260 in 280 nm ter 260 in 230 nm, smo sklepali na čistost osamljene DNA.

Izračunane koncentracije NK v vzorcih prikazuje preglednica 12. Meritve so pokazale, da dobimo pri obeh metodah v ekstraktih zaznavne koncentracije NK. Rezultati zaradi prisotnosti nečistoč v ekstraktih verjetno niso popolnoma pravilni, kar smo v nadaljevanju dokazali tudi z analizami PCR v realnem času. Koncentracije NK v ekstraktih vzorcev sojinega lecitina, osamljenih z **metodo CTAB**, variirajo od 20 pa do 1550 ng / μL (preglednica 12). Izstopa vzorec št. 6, ki ima v primerjavi z ostalimi ekstrakti sojinega lecitina zelo visoko koncentracijo DNA. Za vzorca št. 1 in 4 ni podatka, saj zaradi primanjkovanja vzorca nismo uspeli izvesti osamitve in posledično tudi ne spektrofotometričnih meritev. Pri metodi osamitve DNA s pomočjo **CIM® DEAE diskov**

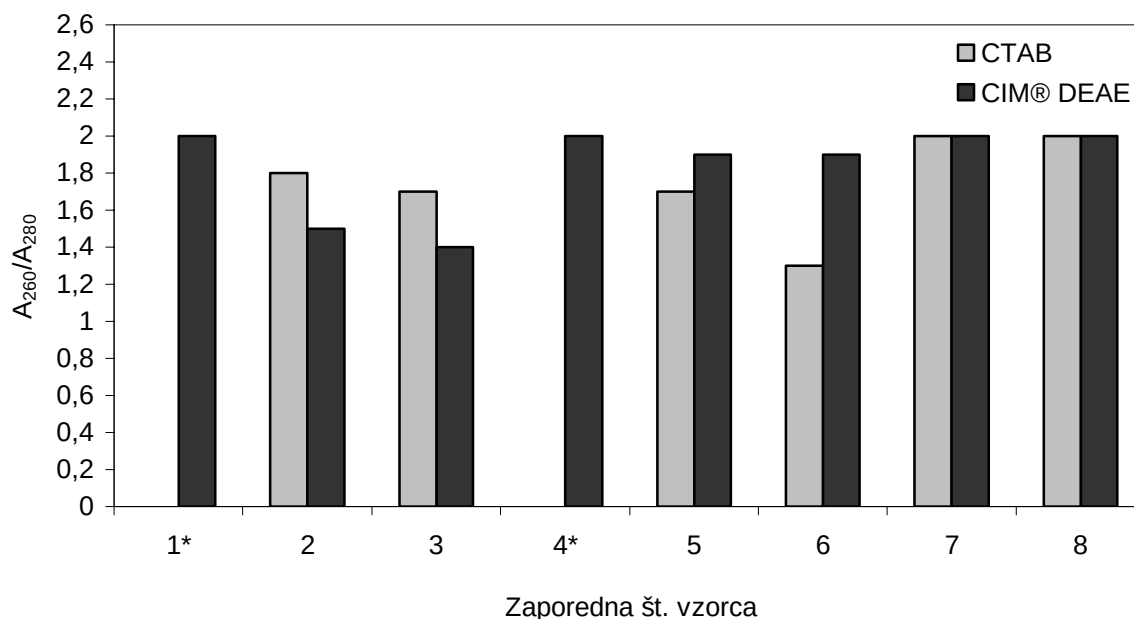
smo ugotovili, da koncentracije NK v ekstraktih vzorcev sojinega lecitina (vzorci št. 1, 4, 5, 6, 7, in 8) variirajo od 20 pa do 315 ng/ μ L (preglednica 12). Z izjemo vzorca št. 6 so koncentracije večje, kot pri ekstraktih osamljenih z metodo CTAB. Pri vzorcu št. 3, smo ločeno analizirali frakciji 3a in 3b. Čeprav tudi frakcija 3a kaže visoko koncentracijo NK, pa smo v nadaljnjih poskusih ugotovili, da ne vsebuje DNA.

Preglednica 12: Rezultati spektrofotometričnega določanja koncentracije nukleinskih kislin v ekstraktih, osamljenih z metodo CTAB in/ali s CIM[®] DEAE diski ($\lambda = 260$ nm)

Zap. št. vzorca	γ_{NK} (ng/ μ L) (1)	
	CTAB	CIM [®] DEAE
1	NP	20
2	8130	185
3a	870	350*
3b		345*
4	NP	315
5	25	105
6	1550	105
7	20	50
8	20	60

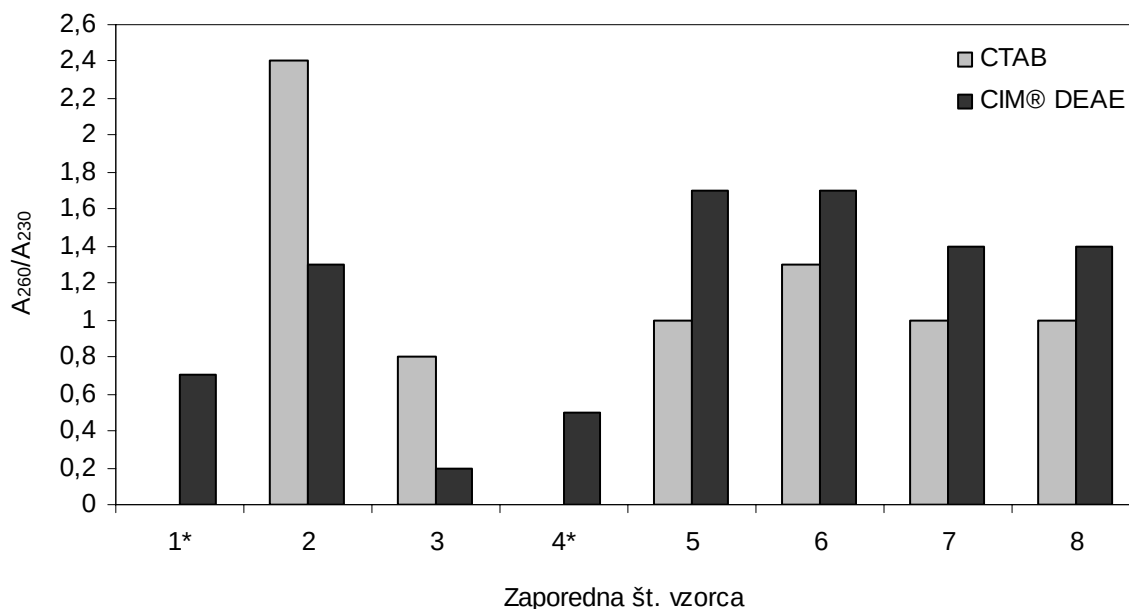
Opombe: * Pri vzorcu št. 3 gre pri metodi osamitve s CIM[®] DEAE diski za ločeno ulovljeni frakciji z DNA
NP – ni podatka

Slika 18 prikazuje vrednosti razmerij med absorbancama, merjenima pri valovnih dolžinah 260 in 280 nm. Vrednosti razmerij so za vzorce št. 3, 5 in 6, osamljene z **metodo CTAB**, pod vrednostjo 1,8, kar nakazuje rahlo onesnaženje DNA s proteini, z izjemo vzorca št. 6, ki je precej bolj onesnažen. Vzorca št. 2, 7 in 8 naj bi bili relativno čisti. Za vzorce, osamljene s **CIM[®] DEAE diski**, so vrednosti razmerij med 1,8 in 2, kar nakazuje na relativno čistost osamljene DNA oz. morda le rahlo onesnaženja z RNA. Izjema sta le vzorca št. 2 in 3 (pšenični lecitin in lecitin pire), ki imata vrednost razmerja krepko pod 1,8 torej sta ekstrakta močno onesnažena s proteini.



Slika 18: Vrednosti izračunanih razmerij A_{260}/A_{280} za določanje čistosti DNA, osamljene z metodo CTAB in s pomočjo CIM® DEAE diskov (spektrofotometrične meritve pri $\lambda = 260$ in 280 nm). Opomba: * - analize za vzorce, osamljene z metodo CTAB, niso bile opravljene

Slika 19 prikazuje vrednosti razmerij med absorbancama, merjenima pri valovnih dolžinah 260 in 230 nm. Vrednosti so tako za vzorce, osamljene z **metodo CTAB**, kot za vzorce, osamljene s **CIM® DEAE diski**, večinoma pod vrednostjo 2,2. Vrednosti nakazujejo onesnaženje z nečistočami, kar lahko pomeni, da je koncentracija DNA v vzorcih precejšnja.

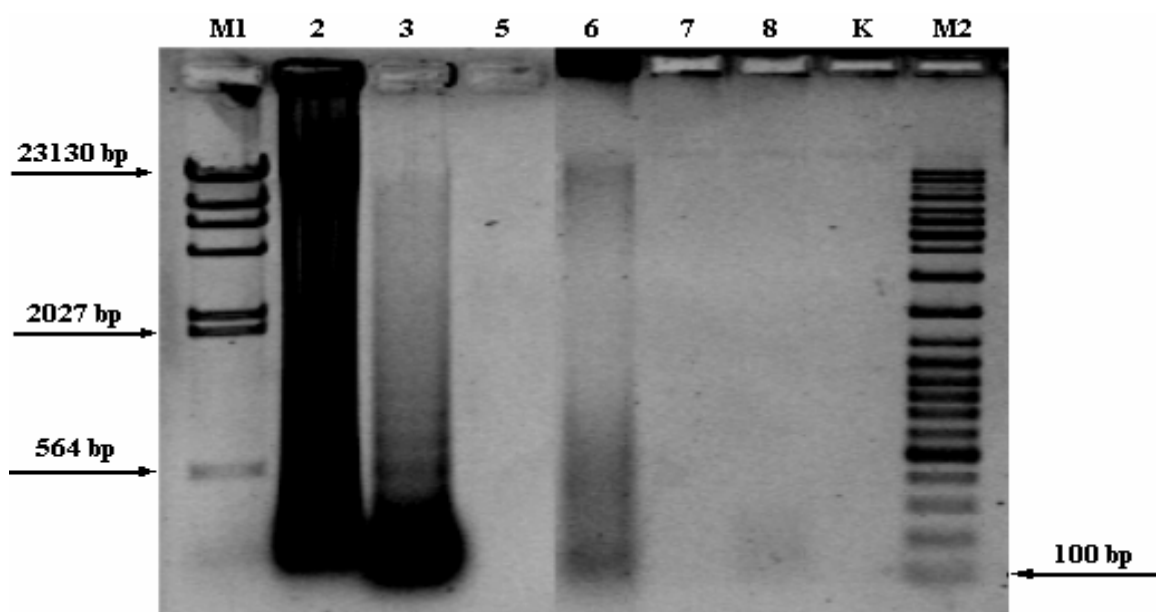


Slika 19: Vrednosti izračunanih razmerij A_{260}/A_{230} za določanje čistosti DNA, osamljene z metodo CTAB in s pomočjo CIM® DEAE diskov (spektrofotometrične meritve pri $\lambda = 260$ in 230 nm). Opomba: * - analize za vzorce, osamljene z metodo CTAB, niso bile opravljene

4.2.2 Agarozna gelska elektroforeza

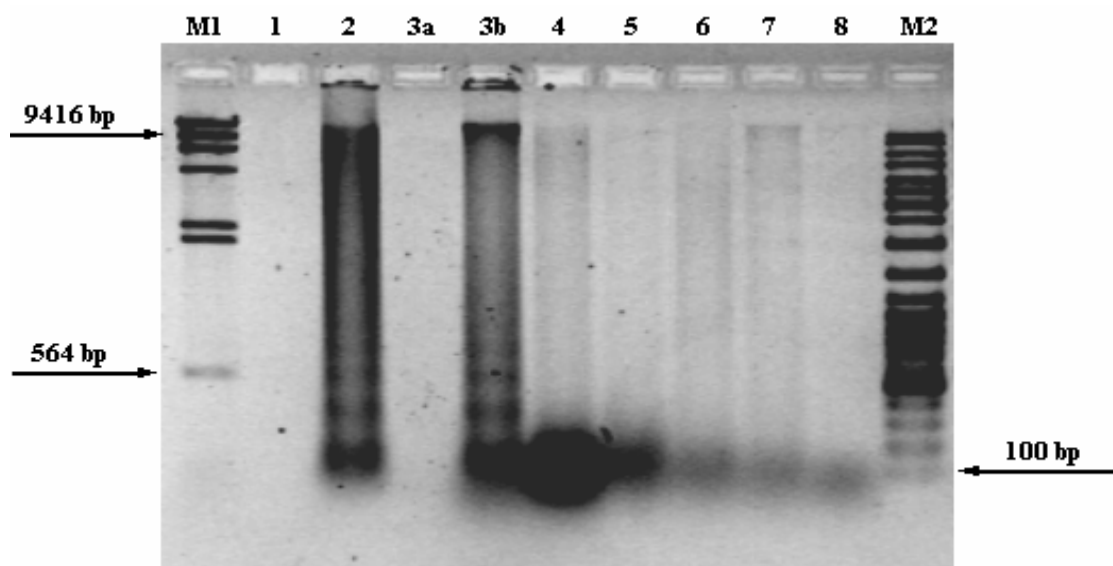
Agarozno gelsko elektroforezo smo, pred kvalitativnim PCR, izvedli z namenom grobe ocenitve količine osamljene DNA ter stopnje njene razgrajenosti. Analizirali smo ekstrakte osamljene z metodo CTAB, kot tudi ekstrakte, osamljene s pomočjo CIM[®] DEAE diskov. Izjema sta bila vzorca št. 1 in 4, ki sta bila osamljena le s pomočjo CIM[®] DEAE diskov.

Slika 20 prikazuje agarozno gelsko elektroforezo vzorcev DNA, osamljenih z **metodo CTAB**. Od vzorcev sojinega lecitina (proge 5, 6, 7 in 8) izstopa vzorec št. 6 (proga 6), kjer je DNA zaznavna in razgrajena, v ostalih vzorcih sojinega lecitina DNA na agaroznem gelu sploh ni zaznavna. Prav tako je precejšnja količina DNA tudi v vzorcu pšeničnega lecitina (proga 2) in lecitina pire (proga 3), v obeh primerih je tudi precej razgrajena. Kontrola osamitve DNA z metodo CTAB (proga K), v kateri smo namesto vzorca uporabili sterilno destilirano vodo, ni vsebovala zaznavne količine DNA.



Slika 20: Agarozna gelska elektroforeza za preverjanje razgrajenosti DNA, osamljene z **metodo CTAB** (2: vzorec št. 2; 3: vzorec št. 3; 5: vzorec št. 5; 6: vzorec št. 6; 7: vzorec št. 7; 8: vzorec št. 8; K: kontrola osamitve; M1: molekularni označevalec λ /HindIII; M2: molekularni označevalec Gene RulerTM DNA Ladder Mix)

Slika 21 prikazuje agarozno gelsko elektroforezo vzorcev DNA, osamljenih s **CIM[®] DEAE diski**. Opazimo lahko, da je DNA zaznavna za vse vzorce sojinega lecitina (vzorci št. 4, 5, 6, 7 in 8; proge 4, 5, 6, 7 in 8), z izjemo vzorca št. 1 (proga 1). V splošnem je DNA v vzorcih sojinega lecitina precej razgrajena, prisotni so fragmenti različnih dolžin in pa tudi RNA, ki se v obliki razmaza ohranja na približni razdalji 100 – 300 bp. Na sliki 21 opazimo tudi, da v frakciji 3a lecitina pire DNA praktično ni, medtem ko smo vso DNA ujeli v frakciji 3b (poglavje 4.1.2, slika 12).

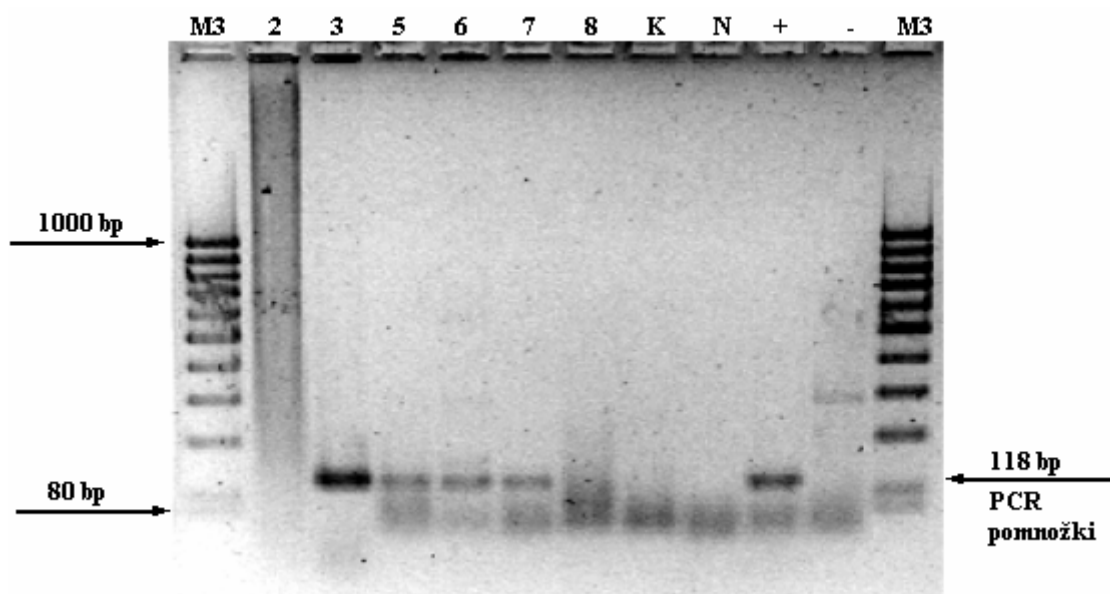


Slika 21: Agarozna gelska elektroforeza za preverjanje razgrajenosti DNA, osamljene s **CIM® DEAE diski** (1: vzorec št. 1; 2: vzorec št. 2; **3a**: vzorec št. 3, frakcija 3a; **3b**: vzorec št. 3, frakcija 3b; 4: vzorec št. 4; 5: vzorec št. 5; 6: vzorec št. 6; 7: vzorec št. 7; 8: vzorec št. 8; **M1**: molekulski označevalec λ /HindIII; **M2**: molekulski označevalec Gene Ruler™ DNA Ladder Mix)

4.2.3 Kvalitativni PCR

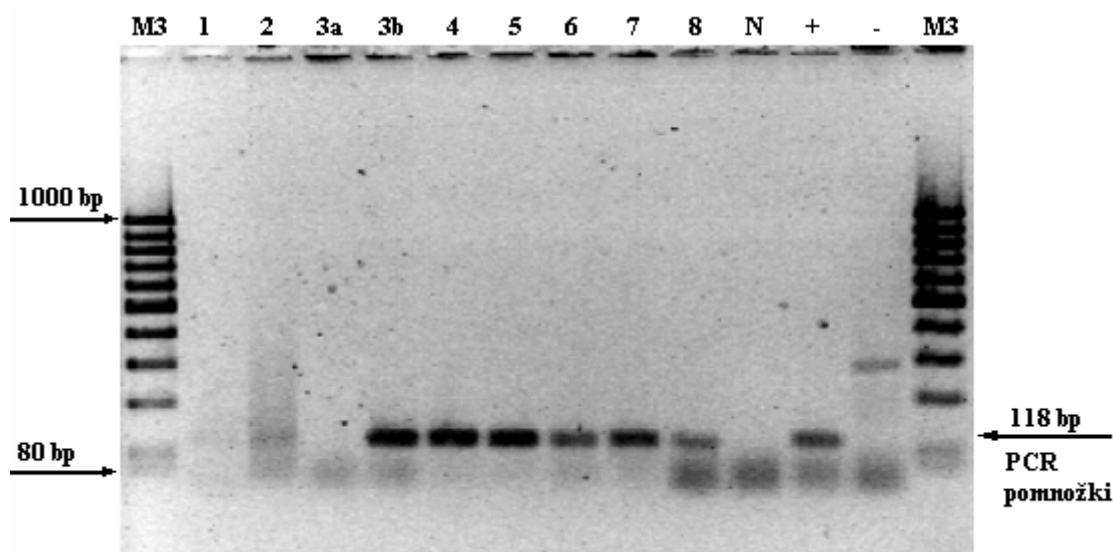
Uporabo osamljene DNA v kvalitativnem PCR smo izvedli z namenom preverjanja količinske in kakovostne ustreznosti osamljene DNA, za nedvoumen dokaz prisotnosti sojine DNA v vzorcu in s tem izvora lecitina. V reakciji smo pomnoževali odsek *lectin* gena (*LeI*), ki je specifičen za sojino DNA. Pozitivna reakcija je bila ključna za nadaljnjo uporabo sojine DNA v reakcijah PCR za dokazovanje GS-soje (presejalne analize).

Slika 22 prikazuje agarozno gelsko elektroforezo pomnožkov PCR, za odkrivanje sojine DNA v ekstraktih, osamljenih z **metodo CTAB**. Opazimo, da je pomnožke PCR zaznati za tri od štirih vzorcev sojinega lecitina (vzorci št. 5, 6 in 7; proge 5, 6 in 7). Za vzorec št. 8 (slika 22, proga 8) pomnožek PCR na gelu ni zaznaven, čeprav smo z nadaljnjimi analizami PCR v realnem času dokazali, da je tudi v tem vzorcu prisotna DNA soje (poglavje 4.2.4, preglednica 13). Za vzorec pšeničnega lecitina pomnožek PCR ni zaznaven (slika 22, proga 2), je pa le-ta presenetljivo prisoten v vzorcu lecitina pire, ki smo ga uporabili kot negativno kontrolo (slika 22, proga 3). Rezultati so veljavni, saj kažejo kontrola osamitve (proga K), kontrola reakcijske PCR mešanice (proga N) in referenčna vzorca za pozitivno in negativno kontrolo PCR (progi + in -), pričakovane rezultate.



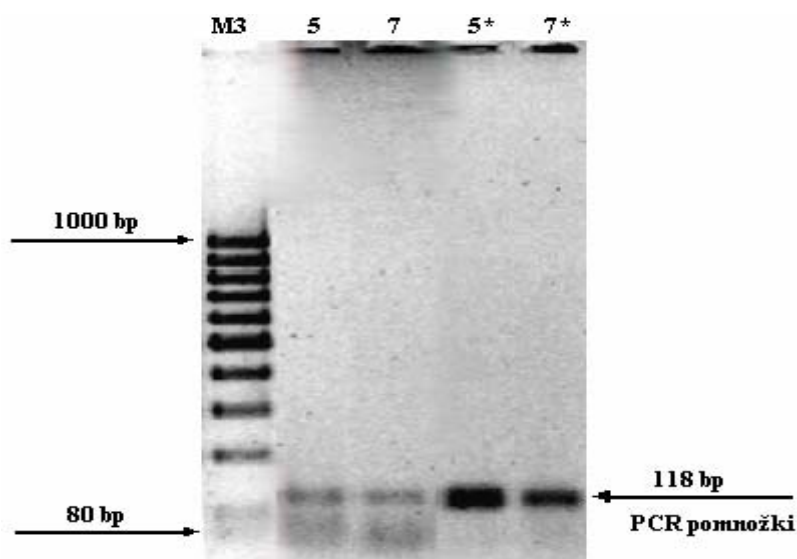
Slika 22: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov PCR, za odkrivanje sojine DNA v ekstraktih, osamljenih z **metodo CTAB** (začetna oligonukleotida GMO3 in GMO4, specifična za sojin *lectin* gen; pomnožek velikosti 118 bp) (2: vzorec št. 2 za neg. kontrolo; 3: vzorec št. 3 za neg. kontrolo; 5: vzorec št. 5; 6: vzorec št. 6; 7: vzorec št. 7; 8: vzorec št. 8; K: kontrola osamitve DNA; N: neg. kontrola PCR reakcijske mešanice; +: ref. vzorec A za poz. kontrolo (*lectin* poz.); -: ref. vzorec B za neg. kontrolo (*lectin* neg.); M3: molekularni označevalec velikosti 100 bp)

Slika 23 prikazuje agarozno gelsko elektroforezo pomnožkov PCR, za odkrivanje sojine DNA v ekstraktih, osamljenih s **CIM[®] DEAE diski**. Razvidno je, da smo s to metodo uspeli osamiti DNA soje iz vseh vzorcev sojinega lecitina (vzorci št. 1, 4, 5, 6, 7 in 8; proge 1, 4, 5, 6, 7, 8), čeprav je pomnožek za vzorec št. 1 na gelu skoraj nezaznaven (proga 1). Prisotnost sojine DNA smo kasneje dokazali tudi z analizami PCR v realnem času (poglavje 4.2.4, preglednica 13). Tudi pri metodi osamitve s CIM[®] DEAE diski, smo v frakciji 3b lecitina pire (slika 23, proga 3b) odkrili presenetljivo veliko količino DNA, saj je signal za pomnožek PCR intenziven. Za razliko od metode CTAB, pa smo tu odkrili sojino DNA tudi v vzorcu pšeničnega lecitina (slika 23, proga 2), čeprav je bil signal precej šibek. Negativna kontrola reakcijske PCR mešanice (proga N) ter referenčna vzorca za pozitivno in negativno kontrolo (progi + in -), so dali pričakovane rezultate. Ker smo sumili na navzkrižno kontaminacijo med vzorci tekom osamitve s CIM[®] DEAE diski, saj kontrole osamitve nismo imeli, smo celoten postopek osamitve za vzorca pšeničnega lecitina in lecitina pire ponovili. Rezultati so bili enaki, torej sta oba vzorca vsebovala sojino DNA (priloga E1).



Slika 23: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov PCR, za odkrivanje sojine DNA v ekstraktih, osamljenih s CIM[®] DEAE diski (začetna oligonukleotida GMO3 in GMO4, specifična za sojin *lectin* gen; pomnožek velikosti 118 bp) (1: vzorec št. 1; 2: vzorec št. 2 za neg. kontrolo; 3a: vzorec št. 3 za neg. kontrolo, frakcija 3a; 3b: vzorec št. 3 za neg. kontrolo, frakcija 3b; 4: vzorec št. 4; 5: vzorec št. 5; 6: vzorec št. 6; 7: vzorec št. 7; 8: vzorec št. 8; N: neg. kontrola PCR reakcijske mešanice; + : ref. vzorec A za poz. kontrolo (*lectin* poz.); - : ref. vzorec B za neg. kontrolo (*lectin* neg.); M3: molekularni označevalec velikosti 100 bp)

Slika 24 prikazuje primerjavo med agarozno gelsko elektroforezo pomnožkov PCR, ki izvirajo iz vzorcev, osamljenih z metodo CTAB ali pa s CIM[®] DEAE diski. Količini ekstraktov, iz katerih izhaja osamljena DNA, sta za posamezna vzorca med metodama primerljivi. Razvidno je, da sta za vzorca, osamljena s CIM[®] DEAE diski, pomnožka PCR bolj zaznavna. Da bi preverili možnost inhibicije PCR smo kasneje naredili tudi analize PCR v realnem času (poglavje 4.2.4).



Slika 24: Agarozna gelska elektroforeza za primerjavo osamitve sojine DNA z metodo CTAB in s CIM[®] DEAE diski, glede na pomnožke PCR, za odkrivanje sojine DNA (začetna oligonukleotida GMO3 in GMO4, specifična za sojin *lectin* gen; pomnožek velikosti 118 bp) (**5**: vzorec št. 5, osamljen z metodo CTAB; **7**: vzorec št. 7, osamljen z metodo CTAB; **5***: vzorec št. 5, osamljen s CIM[®] DEAE diski; **7***: vzorec št. 7, osamljen s CIM[®] DEAE diski; **M3**: molekulski označevalec velikosti 100 bp)

4.2.4 PCR v realnem času

Prvenstveno smo analize PCR v realnem času izvedli z namenom preverjanja ustreznosti DNA, ki smo jo predhodno osamili z metodo CTAB in s pomočjo ionsko-izmenjevalne kromatografije s CIM[®] DEAE diski, za uporabo v PCR v realnem času. Zanimala nas je tudi prisotnost inhibitorjev, ki lahko ključno vplivajo na rezultate PCR. Na osnovi dobljenih Ct vrednosti smo lahko izpeljali tudi relativne primerjave v pridobljenih količinah DNA med uporabljenima metodama za osamitev DNA.

Glede na dobljene številčne rezultate (preglednica 13) lahko sklepamo, da smo v vzorcih, osamljenih z **metodo CTAB**, uspeli dokazati uspešno pomnoževanje odseka *lectin* gena v vseh vzorcih sojinega lecitina, pa tudi vzorcu št. 3 (lecitin pire), z izjemo vzorca št. 2 (pšenični lecitin). Odklon od izbranega intervala, od 2,9 do 4,1 za vrednosti ΔC_t , opazimo pri vzorcih št. 3, 7 in 8, torej je v omenjenih vzorcih domnevno prišlo do inhibicije reakcije pomnoževanja izbranega odseka *lectin* gena. V vzorcih, osamljenih s pomočjo **CIM[®] DEAE diskov**, smo uspešno pomnoževanje odseka *lectin* gena dokazali v vseh vzorcih, torej tako vzorcih sojinega lecitina, kot vzorcu lecitina pire. Za razliko od metode CTAB pa smo sojino DNA dokazali tudi v vzorcu pšeničnega lecitina. Inhibicijo opazimo pri vzorcih št. 1, 2, 3, 4, 6 in 8. Pri vzorcih št. 3, 4 in 8 je odklon od idealne vrednosti ΔC_t manjši, torej inhibicija ni močna. Pri vzorcih št. 5 in 7 inhibicije domnevno ni.

Preglednica 13: Dobljene Ct in Δ Ct vrednosti za določanje inhibicije pomnoževanja odseka *lectin* gena s PCR v realnem času

Metoda	Zap. št. vzorca	Ct	Δ Ct	Inhibicija
CTAB	2		NP	NP
			NP	
		10 X R	NP	
			NP	
	3		NM	DA
			NM	
		10 X R	25,738462	
			25,745096	
	5		31,464403	3,2 (?)
			31,637342	
		10 X R	33,677097	
			35,842133	
	6		32,044857	3,9 (?)
			32,421013	
		10 X R	36,970497	
			35,285854	
	7		32,17105	2,6 (?)
			32,099506	
		10 X R	33,97479	
			35,506104	
	8		NM	NM
			NM	
		10 X R	35,271873	
			34,3671	
CIM [®] DEAE	1		34,35127	0,5 (?)
			33,43676	
		10 X R	33,82257	
			34,87834	
	2		32,795334	1,5 (?)
			33,864666	
		10 X R	35,62797	
			34,094425	
	3		23,401003	2,6
			23,426117	
		10 X R	26,106941	
			25,897501	
	4		26,325968	2,6
			26,243254	
		10 X R	28,75998	
			28,975714	
	5		26,04777	3,1
			26,083706	
		10 X R	29,08203	
			29,172789	
	6		30,621397	2,2
			30,521042	
		10 X R	32,649963	
			32,955513	
	7		26,466047	3,6
			26,284533	
		10 X R	29,997795	
			29,856054	
	8		30,247734	2,8 (?)
			29,934256	
		10 X R	33,386494	
			32,515114	

Opombe: NP – ni podatka, sojina DNA ni prisotna (negativen rezultat pomnoževanja *lectin* gena)

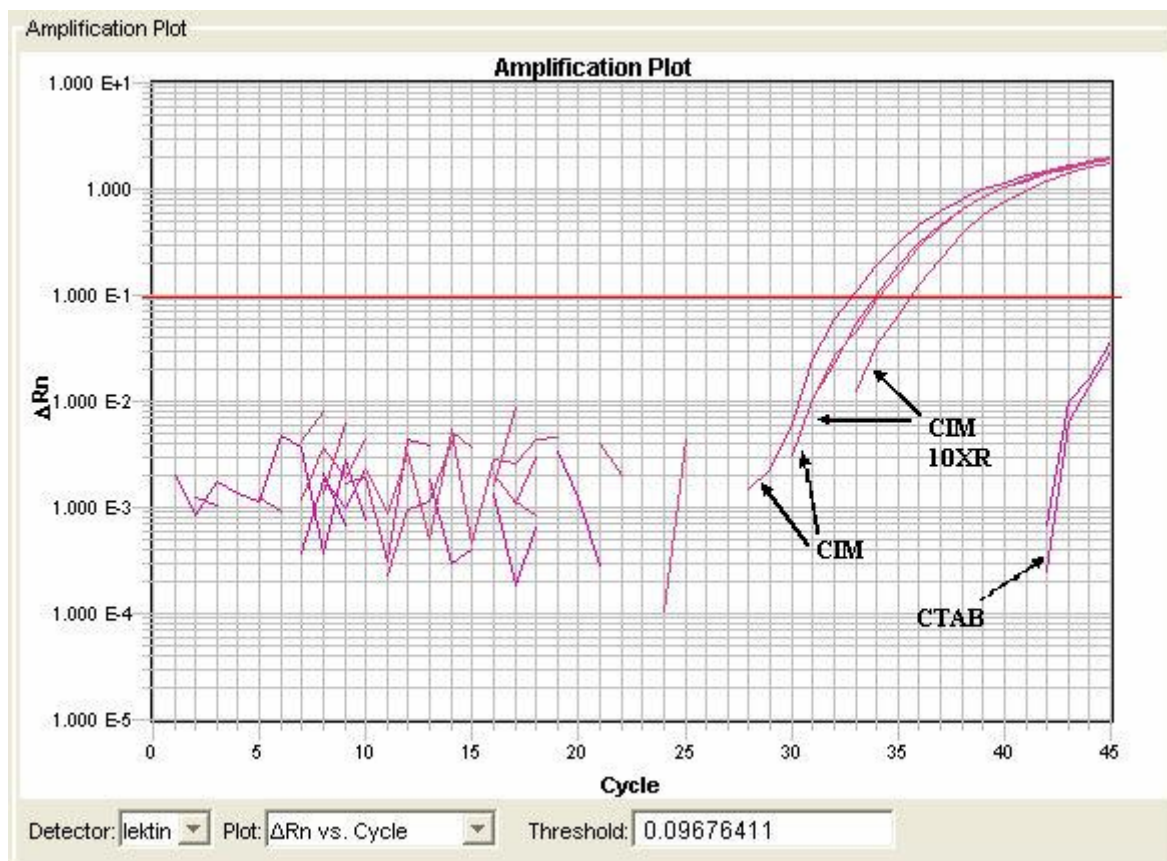
NM – analize opravljene, vendar rezultati zaradi inhibicije reakcije niso merljivi

(?) – zaradi nihanja vrednosti Ct med paralelnimi vzorci, najverjetneje zaradi nizke začetne količine DNA, nekateri rezultati niso popolnoma zanesljivi

10 X R – 10-krat redčeni vzorci

Slike 25 - 30 so grafični prikazi podatkov iz preglednice 13, ki prikazujejo primerjavo krivulj spremljanja pomnoževanja *lectin* gena oz. odvisnosti intenzitete fluorescence od števila ciklov v reakciji PCR v realnem času, za ekstrakte vzorcev sojinega in pšeničnega lecitina ter lecitina pire (vzorci št. 2, 3, 5, 6, 7 in 8), osamljene z metodo CTAB in s CIM[®] DEAE diski. Za vzorca št. 1 in 4 primerjave niso možne, saj sta bila vzorca osamljena le s pomočjo CIM[®] DEAE diskov. Pri precej vzorcih, posebno pri 10-krat redčenih variantah, je pri obeh metodah opaziti večje ali manjše neujemanje krivulj za paralelne vzorce, zaradi nihanja vrednosti Ct, kar je domnevno posledica zelo majhne količine DNA v vzorcih.

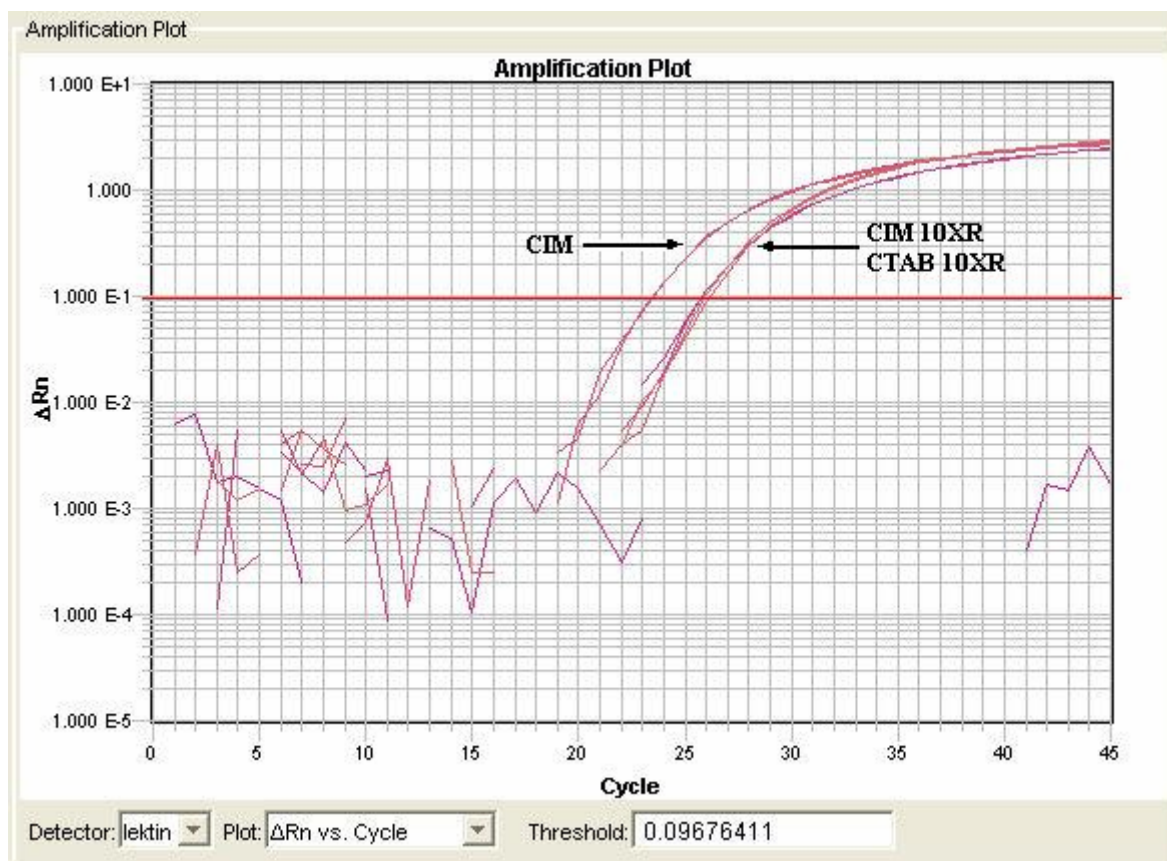
Slika 25 prikazuje primerjavo krivulj spremljanja pomnožka reakcije PCR v realnem času, za **vzorec št. 2**, osamljen z metodo CTAB in s CIM[®] DEAE diski. Razvidno je, da smo sojino DNA zaznali le v vzorcu, osamljenem s CIM[®] DEAE diski. Količina ekstrakta, iz katere izhaja osamljena DNA, je za metodo CTAB približno 130-krat večja (glej preglednici 4 in 5). Koncentracija sojine DNA v vzorcu, osamljenem z metodo CTAB, je pod pragom zaznave, kar se smatra kot negativen rezultat ugotavljanja prisotnosti sojine DNA. Rezultati se ujemajo z rezultati kvalitativnega PCR.



Slika 25: Primerjava odvisnosti intenzitete fluorescence od števila ciklov PCR v realnem času za sojino DNA iz **vzorca št. 2** (**ekstrakt pšeničnega lecitina**), osamljeno z metodo CTAB in s pomočjo CIM[®] DEAE diskov (**CIM in CTAB** - neredčena vzorca; **CIM 10XR in CTAB 10XR** - 10-krat redčena vzorca; začetna oligonukleotida TM-*lectin*-F in TM-*lectin*-R, specifična za sojin *lectin* gen)

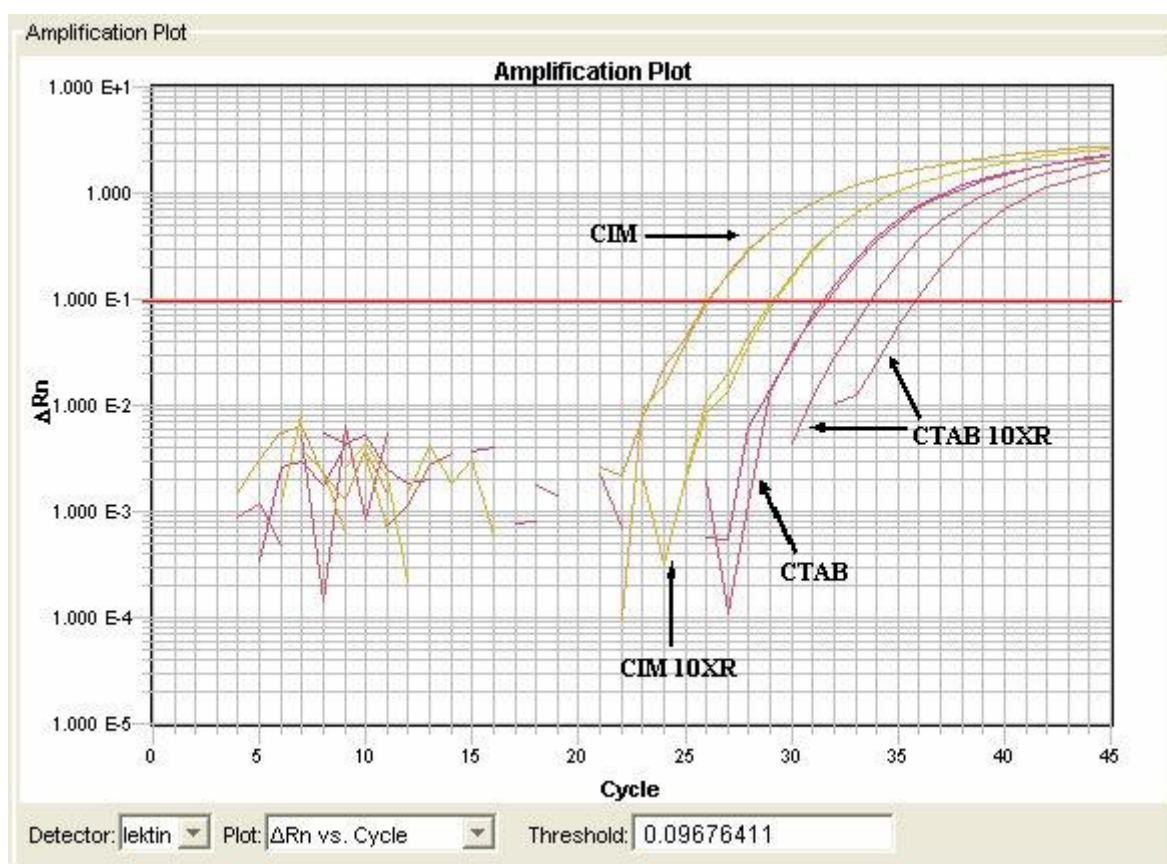
Slika 26 prikazuje primerjavo krivulj spremljanja pomnožka reakcije PCR v realnem času, za **vzorec št. 3**, osamljen z metodo CTAB in s CIM[®] DEAE diski. Na sliki ni krivulje, ki

predstavlja kopičenje pomnožka PCR v neredčenem vzorcu, osamljenem z metodo CTAB, saj je prišlo v vzorcu do močne inhibicije reakcije. Količina ekstrakta, iz katere izhaja osamljena DNA, je pri metodi CTAB približno 85-krat večja (glej preglednici 4 in 5). Sklepamo lahko, da sta koncentraciji sojine DNA kljub temu v obeh redčenih vzorcih približno enaki, saj imata približno enaki Ct vrednosti in ujemajoči krivulji, kar je razvidno tudi iz preglednice 13.



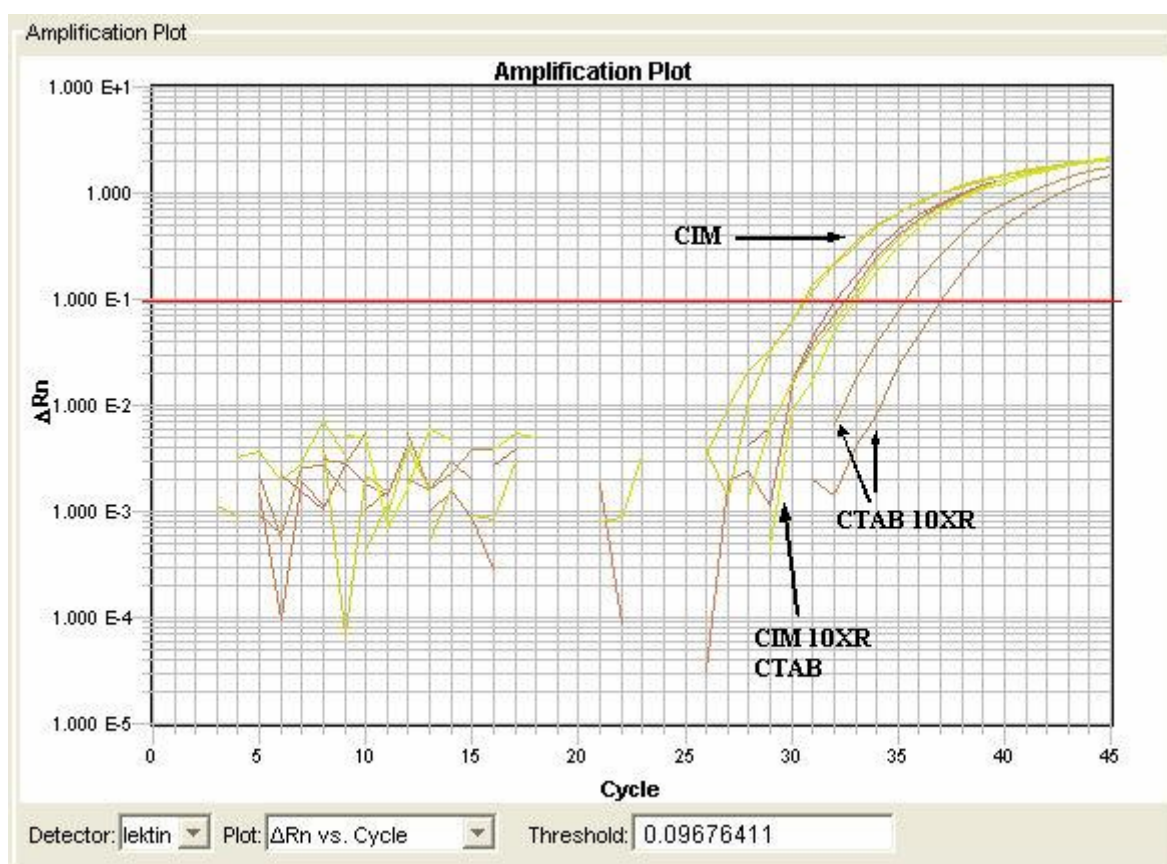
Slika 26: Primerjava odvisnosti intenzitete fluorescence od števila ciklov PCR v realnem času za sojino DNA iz **vzorca št. 3 (ekstrakt lecitina pira)**, osamljeno z metodo CTAB in s pomočjo CIM[®] DEAE diskov (**CIM in CTAB** - neredčena vzorca; **CIM 10XR in CTAB 10XR** - 10-krat redčena vzorca; začetna oligonukleotida TM-*lectin*-F in TM-*lectin*-R, specifična za sojin *lectin* gen)

Slika 27 prikazuje primerjavo krivulj spremljanja pomnožka PCR v realnem času, za **vzorec št. 5**, osamljen z metodo CTAB in s CIM[®] DEAE diski. Oblike krivulj so dokaj pravilne, opazno pa je neujemanje krivulj paralelnih 10-krat redčenih vzorcev, osamljenih z metodo CTAB, zaradi nihanja vrednosti Ct, ki je posledica zelo nizke količine tarčne DNA. Poleg tega je količina ekstrakta, iz katere izhaja osamljena DNA, pri obeh metodah osamitve, za ta vzorec približno enaka (glej preglednici 4 in 5). Razlika v Ct vrednostih krivulj neredčenih vzorcev med metodama je približno 5,5 ciklov (preglednica 13), zato lahko sklepamo, da je v vzorcu, osamljenem s CIM[®] DEAE diski, približno 45-krat večja koncentracija sojine DNA.



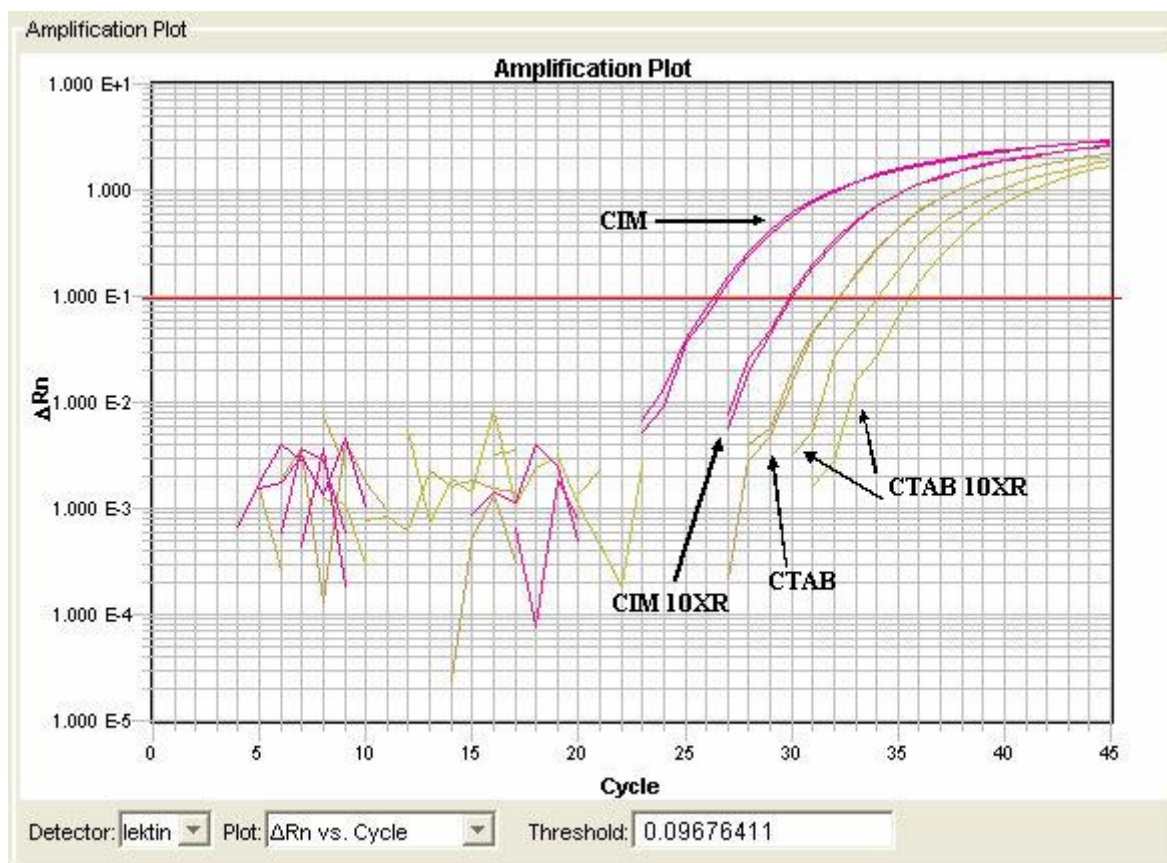
Slika 27: Primerjava odvisnosti intenzitete fluorescence od števila ciklov PCR v realnem času za sojino DNA iz **vzorca št. 5 (ekstrakt sojinega lecitina)**, osamljeno z metodo CTAB in s pomočjo CIM[®] DEAE diskov (**CIM in CTAB** - neredčena vzorca; **CIM 10XR in CTAB 10XR** - 10-krat redčena vzorca; začetna oligonukleotida TM-*lectin*-F in TM-*lectin*-R, specifična za sojin *lectin* gen)

Slika 28 prikazuje primerjavo krivulj spremljanja pomnožka PCR v realnem času, za **vzorec št. 6**, osamljen z metodo CTAB in s CIM[®] DEAE diski. Količina ekstrakta, iz katere izhaja osamljena DNA, je za metodo CTAB približno 2-krat večja (glej preglednici 4 in 5). Vrednosti Ct sta zelo podobni za neredčene vzorce, osamljene z metodo CTAB ter za 10-krat redčene vzorce, osamljene s CIM[®] DEAE diski (preglednica 13). Iz tega lahko sklepamo, da je v vzorcu, osamljenem s CIM[®] DEAE diski, približno 10-krat večja koncentracija sojine DNA.



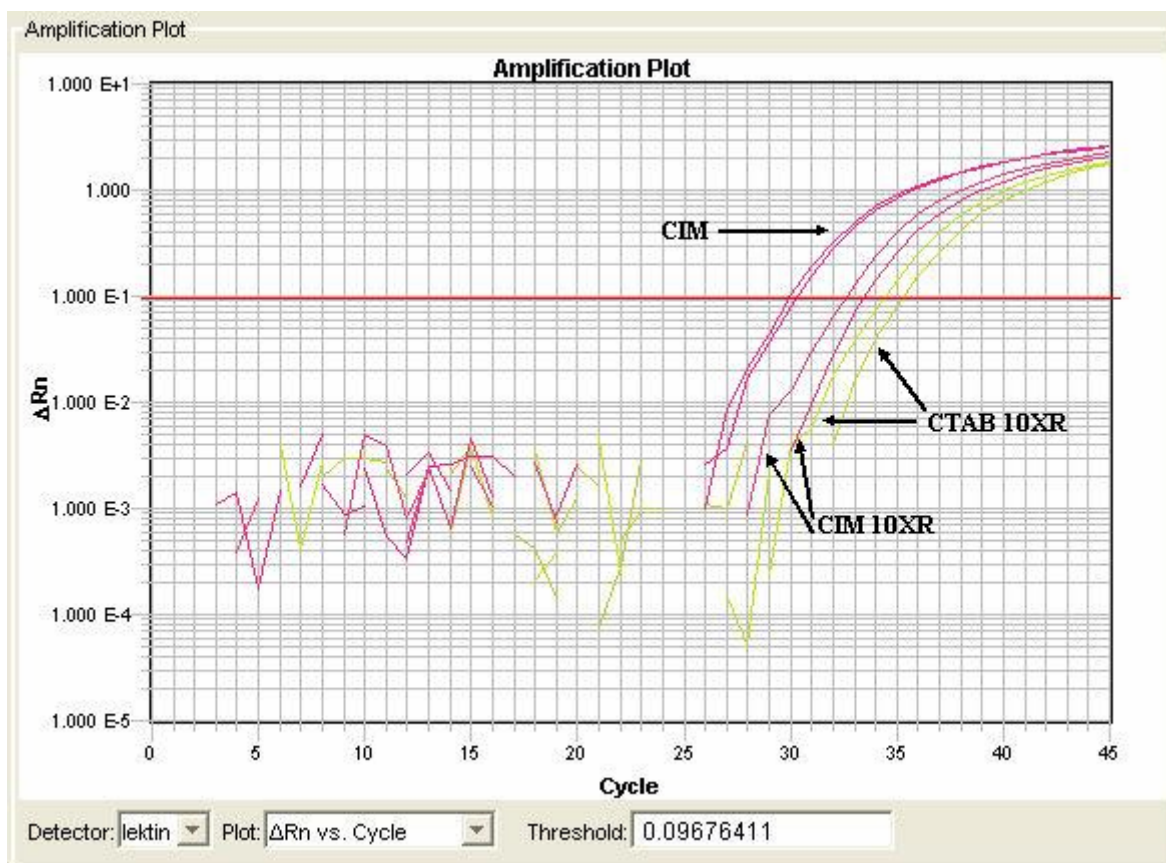
Slika 28: Primerjava odvisnosti intenzitete fluorescence od števila ciklov PCR v realnem času za sojino DNA iz vzorca št. 6 (ekstrakt sojinega lecitina), osamljeno z metodo CTAB in s pomočjo CIM[®] DEAE diskov (CIM in CTAB - neredčena vzorca; CIM 10XR in CTAB 10XR - 10-krat redčena vzorca; začetna oligonukleotida TM-*lectin*-F in TM-*lectin*-R, specifična za sojin *lectin* gen)

Slika 29 prikazuje primerjavo krivulj spremljanja pomnožka PCR v realnem času, za vzorec št. 7, osamljen z metodo CTAB in s CIM[®] DEAE diski. Količina ekstrakta, iz katere izhaja osamljena DNA, je pri obeh metodah za ta vzorec približno enaka (glej preglednici 4 in 5). Razlika v Ct vrednostih krivulj neredčenih vzorcev med metodama je približno 5,7 ciklov (preglednica 13), zato lahko sklepamo, da je v vzorcu, osamljenem s CIM[®] DEAE diski, približno 50-krat večja koncentracija sojine DNA.



Slika 29: Primerjava odvisnosti intenzitete fluorescence od števila ciklov PCR v realnem času za sojino DNA iz **vzorca št. 7 (ekstrakt sojinega lecitina)**, osamljeno z metodo CTAB in s pomočjo CIM[®] DEAE diskov (**CIM in CTAB** - neredčena vzorca; **CIM 10XR in CTAB 10XR** - 10-krat redčena vzorca; začetna oligonukleotida TM-*lectin*-F in TM-*lectin*-R, specifična za sojin *lectin* gen)

Slika 30 prikazuje primerjavo krivulj spremljanja pomnožka reakcije PCR v realnem času, za **vzorec št. 8**, osamljen z metodo CTAB in s CIM[®] DEAE diski. Na sliki ni krivulje, ki predstavlja kopičenje pomnožka PCR v neredčenem vzorcu, osamljenem z metodo CTAB, saj je prišlo v vzorcu do inhibicije reakcije. Količina ekstrakta, iz katere izhaja osamljena DNA, je za metodo CTAB približno 2-krat manjša (glej preglednici 4 in 5). Približna razlika v količini sojine DNA je težko določljiva, zaradi nihanja Ct vrednosti ter inhibicije; po preglednici 13 sodeč pa je rahlo večja v vzorcu, osamljenem s CIM[®] DEAE diski, saj so Ct vrednosti nižje.



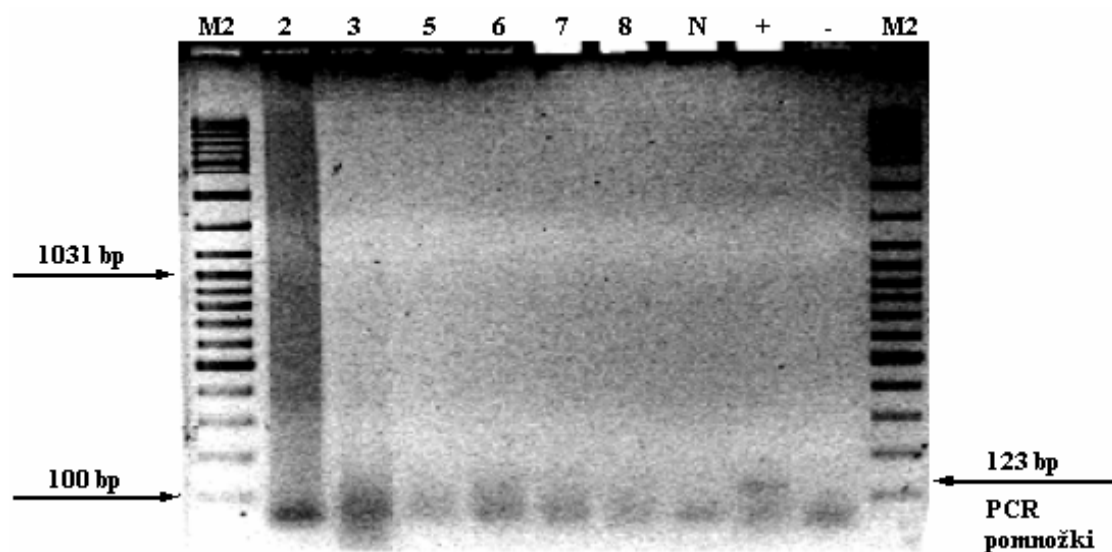
Slika 30: Primerjava odvisnosti intenzitete fluorescence od števila ciklov PCR v realnem času za sojino DNA iz vzorca št. 8 (ekstrakt sojinega lecitina), osamljeno z metodo CTAB in s pomočjo CIM[®] DEAE diskov (CIM in CTAB - neredčena vzorca; CIM 10XR in CTAB 10XR - 10-krat redčena vzorca; začetna oligonukleotida TM-*lectin*-F in TM-*lectin*-R, specifična za sojin *lectin* gen)

4.3 ODKRIVANJE DNA GS-SOJE V VZORCIH LECITINA

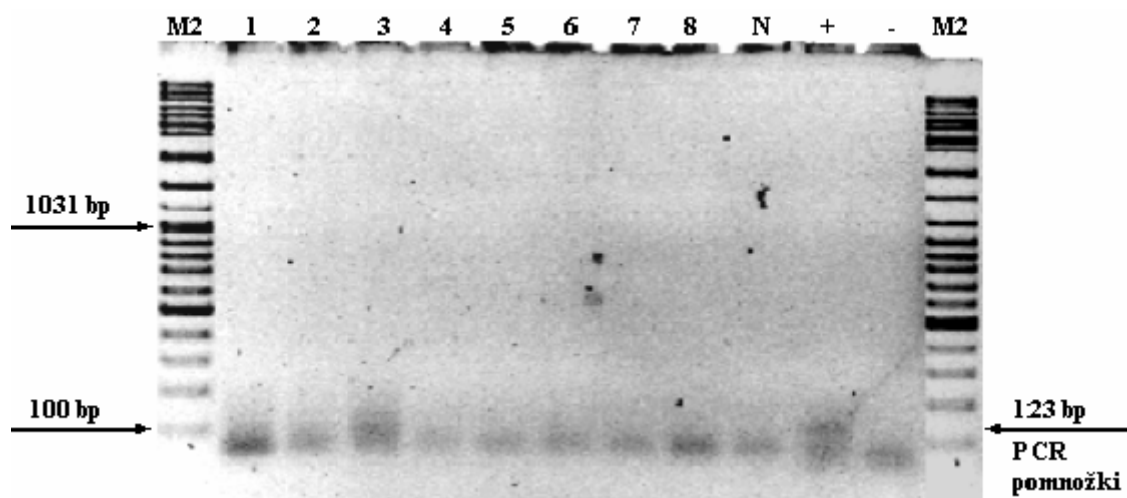
Opravljen presegalna analiza je vključevala reakciji kvalitativnega PCR s parom začetnih oligonukleotidov, ki sta specifična za odsek CaMV 35S promotorja in drugim parom začetnih oligonukleotidov, ki pa sta specifična za odsek NOS terminatorja. Cilj analize je bila potrditev morebitno prisotne GS-soje v vzorcih sojinega lecitina, glede na predhodno navedene rezultate, pa tudi v vzorcih pšeničnega lecitina ter lecitina pire (referenčni vzorca).

4.3.1 Pomnoževanje CaMV 35S promotorja

Sliki 31 in 32 prikazujeta agarozno gelsko elektroforezo pomnožkov PCR, za odkrivanje GS-soje v ekstraktih, osamljenih z metodo CTAB (slika 31) in s CIM[®] DEAE diski (slika 32). Pozitiven rezultat pomnoževanja, torej DNA fragment v velikosti 123 bp, opazimo le pri pozitivni kontroli reakcije (proga +). 35S promotorja torej nismo uspeli dokazati v nobenem od ekstraktov, pridobljenih iz vzorcev lecitina.



Slika 31: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov PCR, za odkrivanje CaMV 35S promotorja GS-soje v ekstraktih, osamljenih z **metodo CTAB** (začetna oligonukleotida p35S-cf3 in p35S-cr4; pomnožek PCR velikosti 123 bp) (2: vzorec št. 2; 3: vzorec št. 3; 5: vzorec št. 5; 6: vzorec št. 6; 7: vzorec št. 7; 8: vzorec št. 8; N: neg. kontrola PCR reakcijske mešanice; + : ref. vzorec C za poz. kontrolo (RRS poz.); -: ref. vzorec A za neg. kontrolo (RRS neg.); M2: Molekulski označevalec Gene Ruler™ DNA Ladder Mix)

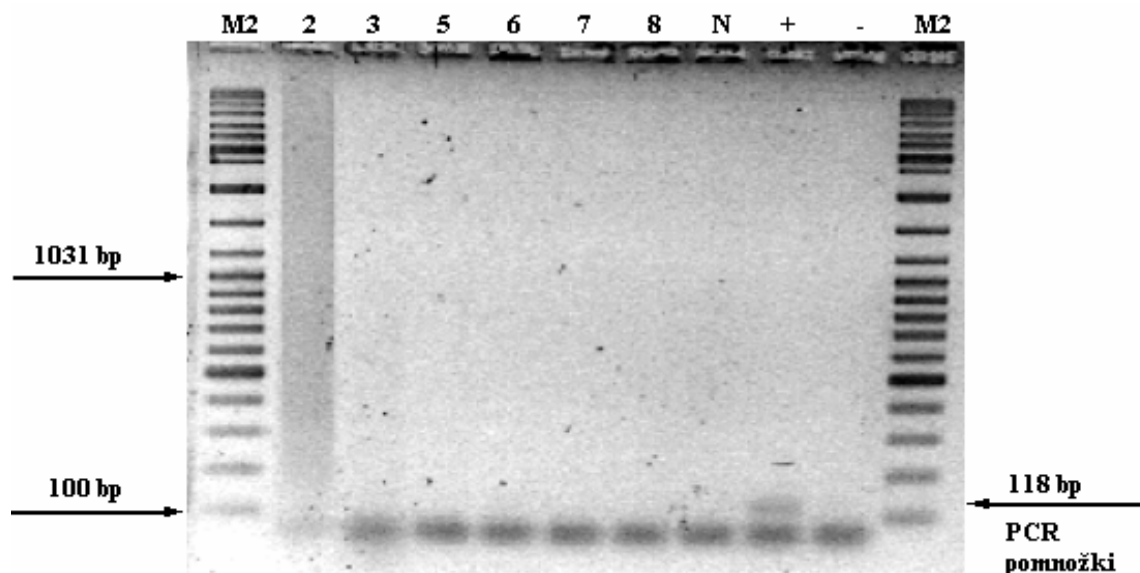


Slika 32: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov PCR, za odkrivanje CaMV 35S promotorja GS-soje v ekstraktih, osamljenih s **CIM® DEAE diski** (začetna oligonukleotida p35S-cf3 in p35S-cr4; pomnožek PCR velikosti 123 bp) (1: vzorec št. 1; 2: vzorec št. 2; 3: vzorec št. 3, frakcija 3b; 4: vzorec št. 4; 5: vzorec št. 5; 6: vzorec št. 6; 7: vzorec št. 7; 8: vzorec št. 8; N: neg. kontrola PCR reakcijske mešanice; + : ref. vzorec C za poz. kontrolo (RRS poz.); -: ref. vzorec A za neg. kontrolo (RRS neg.); M2: Molekulski označevalec Gene Ruler™ DNA Ladder Mix)

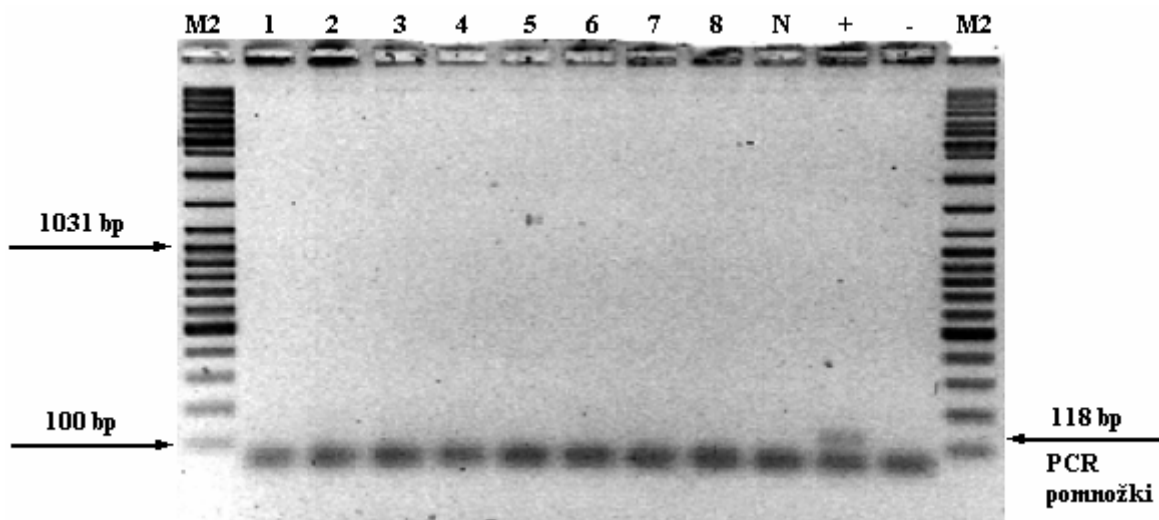
4.3.2 Pomnoževanje NOS terminatorja

Sliki 33 in 34 prikazujeta agarozno gelsko elektroforezo pomnožkov PCR, za odkrivanje DNA GS-soje v ekstraktih, osamljenih z metodo CTAB (slika 33) in s CIM® DEAE diski (slika 34). Pozitiven rezultat pomnoževanja, torej DNA fragment v velikosti 118 bp,

opazimo le pri pozitivni kontroli reakcije (proga +). Prav tako kot 35S promotoja, tudi NOS terminatorja nismo uspeli dokazati v nobenem od ekstraktov, pridobljenih iz vzorcev lecitina.



Slika 33: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov PCR, za odkrivanje NOS terminatorja GS-soje v vzorcih, osamljenih z **metodo CTAB** (začetna oligonukleotida HA-*nos* 118-f in HA-*nos* 118-r; pomnožek PCR velikosti 118 bp) (2: vzorec št. 2; 3: vzorec št. 3; 5: vzorec št. 5; 6: vzorec št. 6; 7: vzorec št. 7; 8: vzorec št. 8; N: neg. kontrola PCR reakcijske mešanice; + : ref. vzorec C za poz. kontrolo (RRS poz.); - : ref. vzorec A za neg. kontrolo (RRS neg.); M2: Molekulski označevalec Gene Ruler™ DNA Ladder Mix)



Slika 34: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov PCR, za odkrivanje NOS terminatorja GS-soje v ekstraktih, osamljenih s **CIM® DEAE diski** (začetna oligonukleotida HA-*nos* 118-f in HA-*nos* 118-r; pomnožek PCR velikosti 118 bp) (1: vzorec št. 1; 2: vzorec št. 2; 3: vzorec št. 3, frakcija 3b; 4: vzorec št. 4; 5: vzorec št. 5; 6: vzorec št. 6; 7: vzorec št. 7; 8: vzorec št. 8; N: neg. kontrola PCR reakcijske mešanice; + : ref. vzorec C za poz. kontrolo (RRS poz.); - : ref. vzorec A za neg. kontrolo (RRS neg.); M2: Molekulski označevalec Gene Ruler™ DNA Ladder Mix)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Dokazano je, da postopki procesiranja sojinega olja povzročijo koncentriranje DNA v sojinem lecitinu (Gryson in sod., 2002). Sojin lecitin zato, v primeru izvora iz GS-soje, lahko vsebuje DNA GS-soje. Zaradi zavedanja potrošnikov in potrebe po jasnem označevanju GSO je bila postavljena delovna hipoteza, v kateri trdimo, da je količina DNA GS-soje v sojinem lecitinu zadostna za nedvoumen dokaz prisotnosti DNA in s tem izvora lecitina iz GS-soje. Osnovno hipotezo smo tekom dela razdelili in se osredotočili na naslednje podhipoteze:

- proces osamitve DNA s pomočjo ionsko-izmenjevalne kromatografije s CIM[®] DEAE diski in osamitev z metodo CTAB sta primerna za osamitev DNA iz sojinega lecitina;
- s pomočjo CIM[®] DEAE diskov in z metodo CTAB osamljena sojina DNA, je ustrezne kakovosti in prisotna v ustrezni količini, za nadaljnje analize določanja izvora lecitina z metodama kvalitativnega PCR in PCR v realnem času;
- v analiziranih vzorcih sojinega lecitina je prisotna DNA GS-soje.

5.1 RAZPRAVA

Kritična točka vsake metode, ki temelji na uporabi DNA, npr. PCR, DNA sekveniranje, hibridizacija odtisa southern, mikromreže itd., je dostopnost zadostne količine čiste in nepoškodovane DNA. Molekularne metode za zaznavo rekombinantne DNA, ki so najbolj pogoste uporabljene metode za ugotavljanje GSO, pri tem niso izjema (Huber, 1998). Ključna stopnja in prvi korak v naboru rekombinantnih tehnik je vsekakor osamitev DNA, ki pa zahteva dosego kompromisa med učinkovitostjo metode in kakovostjo (poškodbami, razgrajenostjo, prisotnostjo inhibitorjev) osamljene DNA (Somma, 2004). Do sedaj najbolj uporabne metode za osamitev DNA so bile metoda CTAB, DNA-vezavne silikatne kolone in kombinacije obeh. Omenjene metode ponavadi zahtevajo le majhno izhodiščno količino vzorca (npr. 100 mg), kar lahko pri močno obdelanih živilih predstavlja oviro, poleg tega so tudi precej zamudne (Anklam, 2002).

Sojin lecitin je živilo, ki je večinsko sestavljeno iz fosfolipidov (Harraldson, 1983). Uspešna osamitev DNA iz take vrste živila torej zahteva začetno uporabo topila, kot je npr. heksan, ki uspešno odstrani maščobe, zmanjša viskoznost in olajša nadaljnjo ekstrakcijo (Wurz in sod., 1998; Terry in sod., 2002). Na omenjeni način smo se priprave ekstrakta lotili tudi pri našem delu. S pomočjo heksana in pufru CTAB-1 smo iz do 10 g vzorca tekočega sojinega lecitina ali pa pšeničnega lecitina in lecitina pire v prahu, pridobili tudi do 7,5 mL tekočega ekstrakta, ki je bil primeren za nanos na CIM[®] DEAE diske. Težja je bila ekstrakcija iz ultrafiltriranega sojinega lecitina v granulah (vzorec št. 8), ki je zahtevala večjo izhodiščno maso vzorca (v 4 centrifugirkah po 5 g). Kot referenčno metodo smo uporabili že priznano metodo za osamitev DNA iz vzorcev rastlinskega izvora – metodo CTAB – ki smo ji v začetnih fazah ravno tako dodali heksan.

5.1.1 Osamitev DNA z ionsko-izmenjevalno kromatografijo s CIM[®] DEAE diski

Predmet raziskav večine znanstvenikov, ki so proučevali osamitev nukleinskih kislin s pomočjo kromatografije je bilo večinoma ločevanje različno velikih fragmentov DNA iz standardnih raztopin (Huber, 1998; Podgornik in sod., 1999). Za ločevanja DNA iz večjih

volumnov ekstrakta procesiranih živil je bila pred kratkim testirana ionsko-izmenjevalna kromatografija z uporabo CIM[®] DEAE diskov ter vpliv pogojev ločevanja na učinkovitost ločevanja že s strani Jermana in sodelavcev (2005). Pri pH 8, linearnem gradientu 0,15 – 2 M NaCl ter hitrosti pretoka 1 mL/min je bilo testirano ločevanje DNA iz količin ekstrakta, ki odgovarja 100 mg in več toplotno obdelanih živil iz koruze. Poleg tega so ekstrakte pred nanosom še dodatno redčili z vodo, saj je prevelika molarna koncentracija NaCl pufru za ekstrakcijo povzročala slabše izkoristke ločevanja. Pogoji so se izkazali za uspešne, zato smo jih z manjšimi prilagoditvami uporabili tudi pri našem delu.

Tekom našega dela smo s predposkusi ločevanja DNA iz do 100 µL-ekstrakta pšeničnega lecitina DNA (slika 7) in do 7500 µL ekstrakta sojinega lecitina (slike 8 in 9), rahlo prilagodili ločevanje, tako da so pogoji ustrezali našim vzorcem. Spiranje z nanašalnim pufrom (0,15 M NaCl) je potekalo 6 min. Medtem se je DNA vezala na funkcionalne skupine anionskega izmenjevalca, nečistoče pa so se spirale. Na kromatogramih ločevanja ekstraktov sojinega lecitina (slike 10 – 17) vidni prvi vrhovi, ki predstavljajo nečistoče, niso sorazmerni z nanešeno količino vzorca. Vzorce, pri katerih je potreben injekcijski volumen presegal kapaciteto injekcijske zanke, smo namreč nanašali zaporedno, z vmesnim spiranjem nečistoč z nanašalnim pufrom. Vrh, ki predstavlja spiranje nečistoč z diska, torej predstavlja le količino nečistoč injekcijskega volumna v kapaciteti uporabljene zanke. Med šesto in osmo minuto, ko je potekala postopna zamenjava nanašalnega z elucijskim pufrom (2 M NaCl), se je z diska sprala signifikantna količina DNA, ki jo predstavlja drugi vrh. Pod izbranimi pogoji: pH 8, pretok 1 ml/min ter gradient NaCl v Tris pufru 0,25 – 2 M, ki je potekal od šeste do osme minute poteka metode, smo tako s CIM[®] DEAE diski osamili DNA iz 7000 µL (odgovarja cca. 20 g vzorca št. 8) in 7500 µL (odgovarja cca. 4 g vzorca št. 4, 10 g vzorca št. 5, 4,5 g vzorca št. 6 in 10 g vzorca št. 7) ekstraktov sojinega lecitina ter iz 75 µL ekstrakta pšeničnega lecitina (odgovarja cca. 75 mg vzorca št. 2) in lecitina pire (odgovarja cca. 100 mg vzorca št. 3). Ekstrakt vzorca št. 1, ki smo ga na diske nanegli le 4500 µL (odgovarja 6,5 g vzorca), ni dal zadovoljive višine vrha, se pa je tekom nadaljnjih analiz PCR v realnem času izkazalo, da tudi ta vzorec vsebuje sojino DNA (poglavje 4.2.4, preglednica 13).

Površine in višine vrhov kromatogramov oz. količine osamljene DNA so bile torej popolnoma odvisne od uporabljenih izhodiščnih mas lecitina, na diske nanešene količine ekstrakta ter tudi narave vzorca in porekla lecitina (glej tudi prilogo C1). Več DNA očitno vsebuje tekoči sojin lecitin (vzorci št. 1, 4, 5 in 6 in 7), v primerjavi z ultrafiltriranim sojinim lecitinom v granulah (vzorec št. 8). Glede na rezultate bi lahko predlagali, da je za uspešno osamitev DNA s pomočjo CIM[®] DEAE diskov, iz velikega števila vzorcev tekočega sojinega lecitina, minimalna priporočena izhodiščna masa vzorca enaka vsaj 10 g, za ultrafiltriran sojin lecitin pa večja.

5.1.2 Preverjanje količine in kakovosti osamljene DNA

Koncentriranje DNA v sojinem lecitinu je v splošnem posledica pogojev procesiranja sojinega olja. Gryson in sodelavci (2002) so proučevali zaznavo DNA med rafiniranjem sojinega olja. Ugotovili so, da je ključna stopnja, ki odstrani DNA iz sojinega olja in jo skoncentrira v vodni frakciji (lecitinu) degumiranje, vpliv pa ima tudi centrifugiranje, ki zmanjša koncentracijo DNA v olju za faktor 10000 (Pauli in sod., 1998). To sicer

predstavlja težavo pri zaznavi DNA v rafiniranem sojinem olju, vendar pa olajša zaznavo DNA v sojinem lecitinu. Izraz kakovost DNA se navezuje na stopnjo razgrajenosti DNA in na prisotnost inhibitorjev PCR, torej čistost DNA, ki je odvisna od njihove ko-ekstrakcije (Meyer, 1999).

5.1.2.1 Spektrofotometrične analize

Pri spektrofotometričnih analizah smo v kvarčnih kivetah merili absorbanco ekstraktov pri valovnih dolžinah 260, 280 in 230 nm. Absorpcijski maksimum nukleinskih kislin je namreč pri 260 nm. Na ta način se določa koncentracija nukleinskih kislin (NK) v ekstraktih. Proteini maksimalno absorbirajo pri 280 nm, pri 230 nm pa maksimalno absorbirajo nečistoče, kot so polisaharidi, peptidi, etanol in EDTA. Iz razmerja med absorbanca pri valovnih dolžinah 260 in 280 nm (A_{260}/A_{280}) ter razmerja med absorbanca pri valovnih dolžinah 260 in 230 nm (A_{260}/A_{230}) lahko sklepamo na čistost DNA. Velja, da ima raztopina čiste DNA vrednost prvega razmerja približno 1,8. Če je vrednost precej večja, lahko sklepamo na večje količine RNA v vzorcu; če pa je vrednost manjša, je vzorec onesnažen s proteini. Vrednost drugega razmerja, je za raztopino čiste DNA večja od 2,2 (Karcher, 1994; Somma, 2004; Rapley, 2005). V primeru odsotnosti nečistoč, lahko spektrofotometrično precej enostavno, zanesljivo in hitro določimo koncentracijo NK (Hübner in sod., 1999a).

S spektrofotometričnimi analizami so se začele primerjave med metodo CTAB in CIM[®] DEAE diski. Izhodiščne mase lecitina so pri obeh metodah večinoma enake (glej preglednici št. 4 in 5), vendar smo za nanos na CIM[®] DEAE diske večinoma uporabili manjšo količino ekstrakta, kot pri metodi CTAB. Poleg tega je bila osamitev DNA za vzorca št. 1 in 4 opravljena le s pomočjo CIM[®] DEAE diskov. Meritve so pokazale, da dobimo pri obeh metodah v vzorcih zaznavne koncentracije NK. Pri metodi osamitve DNA s pomočjo **CIM[®] DEAE diskov** smo ugotovili, da koncentracije NK v vzorcih sojinega lecitina variirajo od 20 pa do 315 ng/ μ L (preglednica 12), v vzorcih sojinega lecitina, osamljenih z **metodo CTAB** pa od 20 pa do 1550 ng/ μ L (preglednica 12). Koncentracije NK v vzorcih sojinega lecitina, ne glede na način osamitve torej zelo variirajo. Z izjemo vzorca št. 6 in vzorcev pšeničnega lecitina in lecitina pire se je izkazalo, da je koncentracija NK večja v ekstraktih, osamljenih s pomočjo CIM[®] DEAE diskov. Iz primerjave obeh metod, lahko iz rezultatov spektrofotometričnih analiz sklepamo, da je koncentracija NK v največji meri odvisna od izhodiščne mase vzorca ter izvora lecitina, iz katerega osamimo DNA, nanešene količine vzorca na CIM[®] DEAE diske, v manjši meri pa, vsaj v začetnih fazah ekstrakcije, najverjetneje tudi od spretnosti analitika.

Pravilnost izmerjenih koncentracij NK je lahko dvomljiva, predvsem v vzorcih, ki so onesnaženi z RNA, ki se osami iz rastlinskih tkiv med ekstrakcijo (Somma, 2004). Praviloma se RNA, zaradi agresivnih metod procesiranja živil sicer razgradi, problem pa predstavljajo tudi fenoli in nekatere aromatske snovi. Ti lahko absorbirajo pri valovni dolžini 260 nm in povzročajo zaznavanje prevelike koncentracije DNA in nepravilno interpretacijo čistosti DNA, torej lažne rezultate. Slednje smo dokazali z ločeno analizo frakcij cepljenega vrha pri vzorcu št. 3, osamljenem s pomočjo CIM[®] DEAE diskov (slika 12, frakciji 3a in 3b). Čeprav tudi frakcija 3a kaže visoko koncentracijo NK (preglednica 12), smo v nadaljnjih poskusih ugotovili, da ne vsebuje na agarozni gelski elektroforezi

zaznavne količine DNA (slika 21) ter zaznavne količine produktov pomnoževanja odseka *lectin* gena s PCR (slika 23).

Pri spektrofotometričnem preverjanju čistosti osamljene DNA, glede na izračunana razmerja A_{260}/A_{280} ter A_{260}/A_{230} smo ugotovili, da je čistost osamljene DNA zelo odvisna od samega vzorca in ne toliko od metode osamitve. Iz slik 18 in 19 je razvidno, da na podlagi spektrofotometričnih meritev ne moremo brez dvoma trditi, katera od uporabljenih metod je bolj uspešna v čiščenju DNA, saj si opažanja, ugotovljena na podlagi izračunanih vrednosti razmerij, za posamezno metodo niso enotna. Če bi se osredotočili le na razmerje A_{260}/A_{230} bi lahko zaključili, da nobena od uporabljenih metod osamitve ne zagotavlja vrhunsko očiščene DNA. Vzorci imajo močno povišano absorbanco v območju valovne dolžine 230 nm. Pri valovni dolžini 230 nm absorbirajo tudi nekatere spojine, ki so poznani inhibitorji PCR, kar lahko predstavlja velik problem predvsem pri zanesljivosti rezultatov nadaljnjih analiz, kot sta kvalitativni PCR in PCR v realnem času (Jerman, 2004).

5.1.2.2 Agarozna gelska elektroforeza

Agarozna gelska elektroforeza je metoda, s katero lahko določimo stopnjo razgrajenosti osamljene DNA. Genomska DNA se smatra za razgrajeno, če so fragmenti manjši od 400 bp (Meyer, 1999). Razgradnja DNA v procesiranih živilih, npr. sojinem olju in lecitinu je pogosto posledica hidrolize zaradi dolgotrajne toplotne obdelave sojinega olja; nukleazne aktivnosti; rafiniranja in namakanja ter povišane depurinacije in hidrolize pri nizkem pH (Gryson in sod., 2002).

V ekstraktih vzorcev sojinega lecitina, osamljenih z **metodo CTAB**, je bila pri našem delu količina DNA nezaznavna na elektroforezi, z izjemo vzorca št. 6 (slika 20). Za razliko od metode CTAB, je bila, pri metodi osamitve s pomočjo **CIM[®] DEAE diskov**, DNA zaznavna v vseh vzorcih sojinega lecitina, z izjemo ekstrakta vzorca št. 1 (slika 21). Pri vzorcih sojinega lecitina št. 1 (slika 21, proga 1) in 4 (slika 21, proga 4) smo uporabili manjšo izhodiščno maso vzorca v primerjavi z ostalimi vzorci sojinega lecitina. Pri vzorcu 1 je to razvidno, saj je na agarozni DNA komaj zaznavna, izstopa pa vzorec št. 4. Kljub manjši masi uporabljenega vzorca, ta vzorec namreč vsebuje količino DNA, ki je dobro zaznavna. Rezultati potrjujejo dejstvo, da so količine DNA v različnih vzorcih sojinega lecitina različne in je zato meja zaznavanja, za različne vzorce z enako izhodiščno maso, lahko zelo variabilna (Hübner in sod., 1999b).

V splošnem je bila iz vzorcev sojinega lecitina osamljena DNA na agaroznem gelu šibko zaznavna in torej prisotna v zelo majhni količini, poleg tega pa je bila še močno razgrajena (sliki 20 in 21).

Precejšnja količina DNA je v vzorcu pšeničnega lecitina in lecitina pire (sliki 20 in 21), pri čemer lahko sklepamo, da vsebujeta pšenični lecitin in lecitin pire (oba v prahu) več DNA, kot sojin lecitin (tekoč), kar je verjetno posledica različne predelave ter narave vzorca (prašnat/tekoč).

5.1.2.3 Kvalitativni PCR

Kritični točki v pripravi DNA za analize PCR sta kakovost in količina DNA (Van den Eede in sod., 2004). Slednji dve lastnosti so, za vzorce DNA iz sojinega lecitina, preverjali tudi Zimmermann in sodelavci (1998). Kot metodo osamitve so med drugim uporabili tudi metodo CTAB in ugotovili, da z le-to iz 75 – 340 µg sojinega lecitina lahko pridobijo manjšo količino DNA, ki na agarozni gelski elektroforezi sicer ni zaznavna, jo pa lahko dokažejo z uspešno pomnožitvijo odseka *lectin* gena. Z metodo CTAB, iz sojinega lecitina in drugih živil, ki izvirajo iz soje, po pregledu literature sodeč torej osamimo relativno majhno količino nukleinskih kislin. Dejstvo dostikrat onemogoča analizo vzorcev z agarozno gelsko elektroforezo, omogoča pa sicer uspešen kvalitativni PCR (Zimmermann in sod., 1998).

Tudi pri našem delu smo pomnoževali za sojo specifičen odsek *lectin* gena; pozitiven rezultat naj bi dal pomnožek v velikosti 118 bp. Na agaroznem gelu so bili zaznavni pomnožki PCR iz treh od štirih vzorcev sojinega lecitina (slika 22, vzorci št. 5, 6 in 7), osamljenih z **metodo CTAB**. V vzorcu št. 8 DNA ni bilo dovolj, ta ni bila dovolj kakovostna za uspešno pomnožitev ali pa je bila količina pomnožka PCR pod mejo zaznave kvalitativnega PCR. Ko smo v nadaljevanju izvedli še analize PCR v realnem času smo ugotovili, da je tudi v vzorcu št. 8 prisotna DNA soje (poglavje 4.2.4, preglednica 13). Najbolj verjeten razlog za nezaznavo pomnožka PCR na gelu, za vzorec št. 8, je torej količina pomnožka PCR, ki je pod mejo zaznavanja. Za vzorec pšeničnega lecitina, pomnožek PCR ni zaznaven (slika 22, proga 2), je pa le-ta presenetljivo prisoten v vzorcu lecitina pire (slika 22, proga 3), ki smo ga ravno tako uporabili kot negativno kontrolo. Rezultat ni v skladu s pričakovanji, saj vzorec lecitina pire ne bi smel vsebovati DNA soje. Navzkrižna kontaminacija med postopkom osamitve ali priprave reakcijske PCR mešanice je izključena, saj sta kontrola osamitve, ki je namesto vzorca vsebovala vodo (proga K) ter negativna kontrola PCR mešanice (proga N), PCR negativni. Rezultati so veljavni, saj kažeta referenčna vzorca za pozitivno in negativno kontrolo (slika 22, progi + in -) pričakovane rezultate. Čeprav v nekaterih vzorcih DNA, z agarozno gelsko elektroforezo za preverjanje razgrajenosti DNA, ni bila zaznavna, je očitno DNA dovolj, za uspešno pomnožitev izbranega tarčnega odseka *lectin* gena.

S pomočjo **CIM[®] DEAE diskov** smo uspeli osamiti DNA soje iz vseh vzorcev sojinega lecitina (slika 23; vzorci št. 1, 4, 5, 6, 7 in 8), čeprav je pomnožek PCR za vzorec št. 1 na gelu zelo šibko zaznaven. Signali so različno intenzivni, glede na količino in kakovost osamitve DNA. Tudi s pomočjo CIM[®] DEAE diskov smo v vzorcu lecitina pire (slika 23, proga 3b) odkrili presenetljivo veliko količino DNA. Za razliko od metode CTAB, pa smo tu odkrili sojino DNA tudi v vzorcu pšeničnega lecitina (slika 23, proga 2). Možen razlog za to bi lahko bila navzkrižna kontaminacija med vzorci pri osamitvi, vendar je ta izključena, saj smo tudi pri ponovitvi osamitve dobili enake rezultate (priloga E1). Negativna kontrola reakcijske PCR mešanice (slika 23, proga N) ter referenčna vzorca za pozitivno in negativno kontrolo (slika 23, progi + in -), so dali pričakovane rezultate.

Če primerjamo rezultate agarozne gelske elektroforeze pomnožkov PCR, ki izvirajo iz vzorcev št. 5 in 7, osamljenih z metodo CTAB ali pa s CIM[®] DEAE diski ugotovimo, da sta za vzorca, osamljenima s CIM[®] DEAE diski, pomnožka PCR bolj zaznavna (slika 24).

Razlog je verjetno v manjšem številu stopenj pri metodi osamitve s CIM[®] DEAE diski, kar zmanjša izgube DNA in posledično poveča izkoristek osamitve (Jerman, 2004). Možen razlog je tudi inhibicija PCR z nečistočami za vzorce, osamljene z metodo CTAB. Količini ekstraktov, iz katerih izhaja osamljena DNA, sta za posamezna omenjena vzorca med metodama primerljivi (preglednici 4 in 5).

Iz rezultatov na slikah 22, 23 in 24 lahko sklepamo na vzrok, da smo v pšeničnem lecitinu (vzorec št. 2) pri metodi s CIM[®] DEAE diski zaznali sojino DNA, pri metodi CTAB pa ne. Vzrok bi lahko bil večje število stopenj metode CTAB, v primerjavi z osamitvijo s CIM[®] DEAE diski. Čeprav pri osamitvi z metodo CTAB, DNA izhaja iz večje izhodiščne količine vzorca, se je tekom številnih stopenj osamitve maloštevilčna sojina DNA lahko izgubila. Tekom osamitve DNA s CIM[®] DEAE diski so izgube DNA očitno manjše, DNA pa bolj koncentrirana (slika 24). Zato bi se sojina DNA, čeprav v zelo majhni količini, v vzorcih lahko ohranila. Drugi, vendar nič manj verjetni razlog za nezaznavo sojine DNA v vzorcu pšeničnega lecitina, je lahko tudi prisotnost nečistoč, ki inhibirajo PCR, katerih prisotnost smo kasneje preverili s PCR v realnem času.

Ob vsem tem je potrebno izpostaviti problem uporabe pšeničnega lecitina in lecitina pire, kot referenčnih vzorcev za negativno kontrolo. Dejstvo je, da so uporabljeni tipi lecitina že med predelavo, pogosto pa tudi med vzorčenjem in homogenizacijo (Hübner in sod., 1999a) očitno podvrženi navzkrižni kontaminaciji s sojino DNA, zelo verjetno pa tudi obratno. To lahko predstavlja problem tudi izven okvira sledenja GSO, npr. pri prenosu potencialnih alergenov med različnimi živili.

5.1.2.4 PCR v realnem času

Prvenstveno nas je zanimala prisotnost inhibitorjev, ki lahko ključno vplivajo na rezultate PCR. Problem morebitno prisotnih inhibitorjev smo izpostavili že pri rezultatih spektrofotometričnih meritev. To so pogosto proteini, polisaharidi in fenolne snovi ter ostanki ekstrakcijskih kemikalij, kot so npr. SDS, fenol, etanol, EDTA, NaCl, urea, kloroform, izopropanol, proteinaza K, CTAB, itd. Njihova prisotnost lahko vodi do slabšega pomnoževanja in s tem otežene kvantifikacije DNA ter povzroča lažno negativne rezultate (Rossen in sod., 1992; Van den Eede in sod., 2004; Lipp in sod., 2005). Mehanizmi inhibicije so domnevno razgradnja ali vezava nukleinskih kislin, inaktivacija ali razgradnja polimeraze ter sprememba pogojev PCR (Wilson, 1997). Znani inhibitorji PCR, ki bi lahko povzročali inhibicijo tudi v našem primeru so etanol (več kot 1 %), izopropanol (več kot 1 %), NaCl (več kot 25 mM) ali EDTA (več kot 0,5 mM) (Somma, 2004).

Ena izmed možnosti preverjanja prisotnosti inhibitorjev PCR v realnem času, so serijske razredčitve vzorcev (Pasloske in sod., 1998; Stahlberg in sod., 2003). Slednje smo izvedli tudi pri naših poskusih pomnoževanja odseka za sojo specifičnega *lectin* gena. PCR v realnem času nam je dal nazorne številčne kot tudi slikovne rezultate. Na podlagi razlik v Ct vrednostih med 10-krat redčenima in neredčenima paralelnima vzorcema izračunanih vrednosti ΔC_t , smo sklepali na morebitno inhibicijo reakcije. V skladu z eksponentnim večanjem števila kopij pomnožkov PCR v realnem času, je idealna vrednost izračunane ΔC_t , pri 10-kratnem redčenju vzorca, enaka 3,3. Večja odstopanja od te vrednosti

pomenijo inhibicijo (Pfaffl, 2001). Pri naših poskusih smo določili interval od 2,9 do 4,1, znotraj katerega smo vrednosti ΔC_t obravnavali kot sprejemljive. Potrditev oz. ovržba inhibicije nam je dala informacijo o kakovosti osamljene DNA.

Glede na dobljene rezultate naših analiz (preglednica 13) lahko sklepamo, da smo v vzorcih, osamljenih z **metodo CTAB**, uspeli dokazati uspešno pomnoževanje odseka *lectin* gena v vseh vzorcih, z izjemo vzorca št. 2 (pšenični lecitin). Rezultati se ujemajo z rezultati kvalitativnega PCR (slika 22), le da smo s PCR v realnem času uspeli dokazati tudi DNA v vzorcu št. 8, kar potrjuje večjo občutljivost metode PCR v realnem času. DNA v ekstraktu pšeničnega lecitina (vzorec št. 2), osamljenem z metodo CTAB ni prisotna, saj se DNA ni uspešno pomnožila niti v 10-krat redčenem vzorcu. Ni pa možno popolnoma izključiti možnosti, da je prišlo pri 10-krat redčenem vzorcu do močne inhibicije. Razlog za negativen rezultat pomnoževanja odseka *lectin* gena z metodo PCR v realnem času, bi v tem primeru lahko pripisali tako preveliki količini nečistoč, kot tudi preveliki količini DNA v vzorcu (mešanica sojine in pšenične DNA), ki je ravno tako zmožna inhibirati uspešno pomnoževanje, saj pred reakcijo nismo prilagodili koncentracije DNA. Slednji razlog bi lahko dokazali z nadaljnjim redčenjem vzorca in dodatnimi analizami PCR v realnem času. Do delne inhibicije je prišlo v vzorcih št. 3, 7 in 8. Pri vzorcu št. 3, lahko inhibicijo v neredčenem vzorcu, glede na precej nizke C_t vrednosti, najverjetneje pripišemo preveliki koncentraciji DNA, pa tudi nečistočam. Reakcija je namreč uspešno potekla le v redčenih vzorcih. Pri vzorcu št. 7 ne moremo zagotovo trditi, da gre res za inhibicijo, saj C_t vrednosti, med dvema redčenima paralelkama precej nihata, lahko pa na inhibicijo sklepamo glede na vrednost ΔC_t . Pri vzorcu št. 8 lahko sklepamo na močno inhibicijo z nečistočami, saj reakcija uspešno poteče le pri 10-krat redčenih vzorcih. Če se osredotočimo le na vzorce sojinega lecitina lahko zaključimo, da je do inhibicije prišlo v dveh od štirih ekstraktov, osamljenih z metodo CTAB, vendar rezultati, zaradi nihanja C_t vrednosti med paralelnimi vzorci, niso popolnoma zanesljivi. Za metodo CTAB je v splošnem značilna precejšnja ko-ekstrakcija inhibitorjev, ki so jo izpostavili tudi Hübner in sodelavci (1999a).

V vzorcih, osamljenih s pomočjo **CIM[®] DEAE diskov** (preglednica 13), smo uspešno pomnoževanje odseka *lectin* gena dokazali v vseh vzorcih, torej se tudi tu rezultati ujemajo z rezultati kvalitativnega PCR. Za razliko od vzorcev, osamljenih z metodo CTAB, smo v vzorcih, osamljenih s pomočjo CIM[®] DEAE diskov, dokazali sojino DNA tudi v vzorcu št. 2 (pšenični lecitin). Rezultat je lahko posledica manjše količine nečistoč in s tem manjše količine inhibitorjev, v primerjavi z metodo CTAB, saj je količina ekstrakta, za metodo CTAB približno 130-krat večja. Inhibicijo opazimo pri vzorcih št. 1, 2, 3, 4, 6 in 8. Pri vzorcih št. 3, 4 in 8 inhibicija ni močna, je pa najverjetneje posledica nečistoč. Manjša inhibicija je, v primerjavi z metodo CTAB, tudi v vzorcu št. 3, pri katerem DNA, pri metodi CTAB, izhaja iz približno 85-krat večje količine ekstrakta. Za vzorca št. 5 in 7 so rezultati med metodama najlažje primerljivi; uporabljeni količini ekstraktov ustrezata enakim izhodiščnim masam sojinega lecitina in sta za vzorca med metodama primerljivi. Inhibicijo je zaznati le v vzorcu št. 7, osamljenem z metodo CTAB. Če se osredotočimo le na vzorce sojinega lecitina lahko zaključimo, da je do inhibicije prišlo v štirih od šestih analiziranih ekstraktov, osamljenih s pomočjo CIM[®] DEAE diskov, čeprav tudi tu nekateri rezultati niso popolnoma zanesljivi, saj vrednosti C_t med paralelnimi vzorci nihajo. Kar se tiče prisotnosti inhibitorjev PCR v vzorcih, osamljenih s pomočjo **CIM[®] DEAE diskov**, so

problem le-teh v ekstraktih, pridobljenih iz procesiranih izdelkov iz koruze, izpostavili tudi Jerman in sodelavci (2005).

Prisotnost inhibitorjev bi lahko odpravili z dodatnim prilagajanjem pogojev gradientne elucije DNA s CIM[®] DEAE diski; možna prilagoditev bi bila dodatno podaljšanje faze spiranja z nanašalnim pufrom, kar bi morda pripomoglo k učinkovitejši odstranitvi nečistoč (Jerman, 2004). Možna prilagoditev bi bilo tudi dodatno čiščenje, ki bi sledilo začetni ekstrakciji s CTAB-1 in heksanom. Pogosto uporabljena je solventna ekstrakcija, npr. s kombinacijo fenola in kloroforma, ki odstranjujeta proteine (Somma, 2004). Dodatno čiščenje pa ni nujno najboljša rešitev, saj bi med čiščenjem lahko prišlo do izgub že tako maloštevilčne DNA (Gryson in sod., 2004). V splošnem velja, da je odnos med kakovostjo in količino osamljene DNA obratnosorazmeren (Zimmermann in sod., 1998). Ne moremo pa zanemariti tudi vpliva spretnosti analitika na prisotnost inhibitorjev; tako začetna priprava ekstraktov, kot tudi zbiranje frakcij DNA, ki se eluira z diskov ter nadaljnja oboritev DNA, so namreč potekale ročno.

Pri vrednostih Ct (časovna točka, pri kateri opazimo povečanje fluorescence) je pri naših poskusih opaziti precejšnje nihanje med vrednostima pri 10-krat redčenih vzorcih med dvema paralelnima izvedbama (preglednica 13 - vzorci št. 5, 6 in 7, osamljeni z metodo CTAB ter vzorci št. 1, 2 in 8, osamljeni s CIM[®] DEAE diski). Razlog je v tem, da gre v večini primerov, pri redčenih vzorcih, za zelo majhno količino sojine DNA, kar posledično lahko onemogoča ustrezno pomnoževanje te DNA s PCR in daje težje primerljive rezultate. Slednje je tudi razlog, da pri nekaterih vzorcih ni mogoče brez dvoma trditi, ali gre res za inhibicijo. Ker so bile naše dobljene Ct vrednosti poleg tega še precej izven območja ponavadi uporabljene umeritvene krivulje (bile so previsoke), s pomočjo katere bi lahko sklepali na koncentracije DNA v ekstraktih, koncentracije nismo določali. Količino DNA v vzorcu bi lahko povečali tako, da bi še dodatno povečali izhodiščno maso lecitina. Pri osamitvi nukleinski kislin pa moramo biti, pri povečevanju izhodiščne mase vzorca, pozorni na zgornjo mejo zasičenja DNA. Nad to mejo se količina osamljene DNA, s povečevanjem začetne mase vzorca, ne povečuje več. Pri večjih začetnih masah vzorca se torej svetuje, da se vzorec razdeli na več ekvivalentnih podenot, ki se jih obravnava ločeno (Zimmermann in sod., 1998).

Prisotnost inhibitorjev se lahko ugotavlja tudi s t.i. »spiking« metodo. Gre za primerjavo pomnoževanja običajne pozitivne kontrole oz. standarda ter pomnoževanja vzorcu dodane znane količine pozitivne kontrole oz. standarda, ki se nato, pod enakimi pogoji, pomnožuje skupaj s tarčno DNA iz vzorca. V primeru prisotnosti kritične količine inhibitorjev v vzorcu, se pozitivna kontrola, ki je dodana vzorcu, ne pomnoži (Pauli in sod., 1998). Na omenjeni način bi lahko ugotovili prisotnosti inhibitorjev tudi v naših vzorcih, ne glede na majhno količino osamljene DNA.

Iz primerjave dobljenih vrednosti Ct za ekstrakte, osamljene z metodo CTAB in s pomočjo CIM[®] DEAE diskov, smo skušali sklepati tudi na razliko v začetnih količinah DNA oz. osamljenih količinah DNA z uporabljenima metodama. Ko količina DNA med reakcijo narašča eksponentno, je Ct vrednost inverzno korelirana s količino DNA na začetku reakcije. 2-kratna začetna količina tarčne DNA povzroči zmanjšanje Ct vrednosti za 1 cikel; polovična začetna količina tarčne DNA pa povečanje Ct vrednosti za 1 cikel

(Ahmed, 2000). Iz rezultatov na slikah 25 – 30 je razvidno, da je bila, kljub po večini manjšim ali enakim količinam uporabljenega ekstrakta za nanos na diske, v večini ekstraktov, pridobljenih s pomočjo CIM[®] DEAE diskov, prisotna večja količina DNA. V primerjavi z metodo CTAB so se CIM[®] DEAE diski torej izkazali za delno bolj uspešne, kar se tiče količine osamljene DNA.

Na količino osamljene DNA s CIM[®] DEAE diski torej poleg uporabljenih pogojev ločevanja vpliva izvor lecitina, postopki predelave za pridobivanje lecitina ter uporabljena izhodiščna masa vzorca ali količina ekstrakta za nanos na diske. Slednji faktorji zahtevajo za uspešno osamitev DNA številne kompromise, kar je lahko zelo težavno delo. Iz dobljenih rezultatov je razvidno, da je bila sojina DNA, osamljena iz analiziranih vzorcev lecitina, očitno dovolj kakovostna za pomnoževanje v reakcijah kvalitativnega PCR in PCR v realnem času. Ugotovili smo, da z osamitvijo s CIM[®] DEAE diski iz manjše izhodiščne mase vzorca oz. manjše količine uporabljenega ekstrakta za nanos na diske, večinoma uspešno osamimo večje količine DNA, v primerjavi z metodo CTAB.

5.1.3 Odkrivanje DNA GS-soje v vzorcih lecitina

V skladu z zakonodajo EU, je za dajanje GS-živil v promet, potrebno pridobiti dovoljenje in vsako GS-živilo ustrezno označiti. Po določilih Uredb št. 1829/2003 in 1830/2003 morajo biti jasno označeni vsi proizvodi, ki vsebujejo ali so sestavljeni iz GSO, kot tudi vsa živila, ki so proizvedena iz GSO, če so ti v EU dovoljeni. Označena morajo biti vsa živila, ki pridejo neposredno do potrošnika, ne glede na to, ali še vsebujejo DNA ali beljakovino, ki izhaja iz genske transformacije, ali pa je ta že razgrajena (Regulation (EC) No. 1829/2003..., 2003; Regulation (EC) No. 1830/2003..., 2003).

Opravljen presejalna analiza pri našem delu je vključevala reakciji kvalitativnega PCR za pomnoževanje odseka CaMV 35S promotorja (pomnožek velikosti 123 bp) in NOS terminatorja (pomnožek velikosti 118 bp). Omenjeni promotor in terminator sta najbolj široko uporabljeni genski sekvenci za regulacijo transgenov in se uporabljata tudi za identifikacijo Roundup Ready[®] soje (Lipp in sod., 2001; Querci in sod., 2004). Presejalna analiza je možna z uporabo kvalitativnega PCR ali PCR v realnem času (Žel in sod., 2004). Ugotovili smo, da v vzorcih sojinega lecitina, kot tudi s sojino DNA kontaminiranih vzorcih pšeničnega lecitina in lecitina pire, ni prisotne DNA Roundup Ready[®] soje oz. je količina te pod mejo zaznavanja (slike 31 – 34). Kontrolna vzorca sta dala pričakovane rezultate (slike 31 – 34, prog + in -).

Zaradi dokaza prisotnosti inhibitorjev PCR v analizah PCR v realnem času, pa tudi ne moremo popolnoma izključiti možnost inhibicije reakcije. Slednje bi lahko dokazali z analizami PCR v realnem času za dokazovanje 35S promotorja in NOS terminatorja, npr. z že predhodno omenjeno t.i. »spiking« metodo (Pauli in sod., 1998). V prihodnje bi bilo med vzorce priporočljivo vključiti tudi interno kontrolo analitika in analitske metode, in sicer vzorec sojinega lecitina, ki bi ga analizirali vzporedno in na enak način kot ostale vzorce, in bi potrjeno izvirjal iz GS-soje.

Potrebno je omeniti, da dokaz pomnožka PCR pri pomnoževanju odseka CaMV 35S promotorja ne bi nujno pomenil gotovo potrditev prisotnosti DNA GS-soje. Lahko bi

namreč šlo za kontaminacijo koruze s cvetačnim mozaičnim virusom, kjer je ta promotor naravno prisoten. V ta namen se, v primeru suma možnosti lažno pozitivnih rezultatov, uporablja identifikacijske teste (Meyer, 1999).

V kolikor bi v prihodnosti uspeli pridobiti še čistejšo in s tem bolj kakovostno DNA v zadostnih količinah, ob uporabi zanesljivih referenčnih vzorcev, bi metoda osamitve DNA, z uporabo ionsko-izmenjevalne kromatografije s CIM[®] DEAE diski, zagotovo predstavljala močan člen v naboru analitskih tehnik za učinkovito izvajanje nadzora nad GS-živili, kakršen je potencialno lahko tudi sojin lecitin.

5.2 SKLEPI

- ❖ Proces osamitve DNA s pomočjo ionsko-izmenjevalne kromatografije s CIM[®] DEAE diski in metoda CTAB, sta se izkazala kot primerna za osamitev DNA iz sojinega lecitina.
- ❖ S pomočjo uporabljenih metod osamljena DNA je prisotna v majhni količini in kaže precejšnjo razgrajenost in onesnaženost, med drugim v nekaterih vzorcih, tudi s potencialnimi inhibitorji PCR.
- ❖ Iz analiziranih vzorcev lecitina osamljena DNA je pri obeh metodah ustrezne kakovosti in prisotna v zadostni količini, za analize določanja prisotnosti sojine DNA s kvalitativnim PCR ali PCR v realnem času. PCR v realnem času je pokazal večjo občutljivost.
- ❖ V analiziranih vzorcih sojinega lecitina nismo dokazali DNA GS-soje niti pri osamitvi z metodo CTAB niti s pomočjo CIM[®] DEAE diskov. Osnovne hipoteze, da je količina DNA GS-soje v sojinem lecitinu zadostna za nedvoumen dokaz prisotnosti DNA in s tem izvora lecitina iz GS-soje, torej nismo potrdili.

6 POVZETEK

Za sojin lecitin, kot mešanico fosfolipidov, so značilne številne aplikacije, od katerih je najpomembnejša zagotovo uporaba v živilski industriji. Uporablja se kot aditiv v hrani, ponavadi v koncentraciji 1 – 2 %. Je eden izmed najbolj pomembnih stranskih produktov industrije procesiranja soje, ki je danes najpomembnejša in še vedno najbolj razširjena GS-poljščina. Sojin lecitin iz GS-soje in živila v katerih se lecitin uporablja so GS-živila. Dokazano je, da postopki procesiranja sojinega olja povzročijo koncentriranje DNA soje v sojinem lecitinu, zato le-ta lahko vsebuje DNA GS-soje. Posledica agresivnih postopkov pridobivanja lecitina, je pogosto zmanjšana količina in kakovost DNA, ki vpliva na meje zaznavanja rekombinantne DNA. Prvi in zelo pomemben korak v procesu zaznave rekombinantne DNA, je njena osamitev in čiščenje. Ta mora zagotoviti DNA primerne količine in kakovosti za nadaljnjo uporabo v presejalnih analizah, identifikacijah in kvantifikacijah rekombinantne DNA, za zagotavljanje natančnega označevanja GS-živil, ki je v skladu z zakonodajo EU. Cilj naše naloge je bil postaviti metodo oz. osamiti DNA GS-soje iz sojinega lecitina. V ta namen smo iz šestih vzorcev sojinega lecitina, z uporabo ionsko-izmenjevalne kromatografije s CIM[®] DEAE diski, ter ločeno iz štirih vzorcev sojinega lecitina, z metodo CTAB, skušali osamiti DNA. Kot referenčna vzorca, pri katerih smo pričakovali odsotnost sojine DNA, smo uporabili lecitin pšenice in lecitin pire. Obe metodi osamitve sta se izkazali za uspešni. V nadaljevanju smo preverjali količino in kakovost (razgrajenost in čistost) DNA. Izvedli smo spektrofotometrične meritve za določanje koncentracije in čistosti nukleinskih kislin; agarozno gelsko elektroforezo za določanje razgrajenosti DNA; kvalitativni PCR in PCR v realnem času, kot testoma pomnoževanja odseka za sojo specifičnega *lectin* gena; ter PCR v realnem času za določanje prisotnosti inhibitorjev PCR ter relativne primerjave v količini osamljene sojine DNA med metodama. Spektrofotometrične meritve za določanje koncentracije in čistosti NK so pokazale, da so v analiziranih vzorcih prisotne nečistoče, zato rezultati določanja NK niso povsem zanesljivi. Osamljena DNA je bila v nekaterih vzorcih na agaroznem gelu nezaznavna, zaznavna DNA pa je pokazala visoko stopnjo razgrajenosti. Analize kvalitativnega PCR in PCR v realnem času so pokazale, da smo sojino DNA osamili iz vseh analiziranih vzorcev sojinega lecitina. Sojino DNA sta vsebovala tudi referenčna vzorca lecitina pire in pšenice, vendar je bila navzkrižna kontaminacija med osamitvijo izključena. PCR v realnem času je v primerjavi s kvalitativnim PCR pokazal večjo občutljivost. S pomočjo CIM[®] DEAE diskov smo osamili majhne količine sojine DNA. Metoda CTAB, pri kateri smo uporabljali večje ali enake količine ekstraktov, se je izkazala za deloma manj uspešno, saj smo z njo, iz večine vzorcev, osamili manjše količine DNA, v primerjavi s CIM[®] DEAE diski. Inhibitorji so bili domnevno prisotni v nekaterih ekstraktih analiziranih vzorcev sojinega lecitina, iz katerih smo DNA osamili s pomočjo uporabljenih metod osamitve. Rezultati analiz PCR v realnem času za določanje prisotnosti inhibitorjev reakcije, zaradi nihanja vrednosti Ct, niso popolnoma zanesljivi. Na koncu smo s kvalitativnim PCR izvedli tudi presejalno analizo, s katero smo določali CaMV 35S promotor in NOS terminator, ki sta prisotni v skoraj vseh v EU dovoljenih GS-rastlinah. V analiziranih vzorcih sojinega lecitina nismo dokazali DNA GS-soje, niti pri osamitvi z metodo CTAB niti s pomočjo CIM[®] DEAE diskov.

7 VIRI

- Ahmed F.E. 1995. Application of molecular biology to biomedicine and toxicology. *Journal of Environmental Science and Health Part C – Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology reviews*, 13, 1: 1-51.
- Ahmed F.E. 2000. Molecular markers for early cancer detection. *Journal of Environmental Science and Health Part C – Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology reviews*, 18, 2: 75-125.
- Ahmed F.E. 2002. Detection of genetically modified organisms in food. *Trends in Biotechnology*, 20, 5: 215-233.
- Anderson D. 1996. A primer on oils processing technology. V: *Bailey's industrial oil and fat products*. 5th ed. Vol. 4: Edible oil and fat products: processing technology. Hui Y.H. (ur.). New York, John Wiley and Sons: 1-60.
- Anklam E., Gadani F., Heinze P., Pijnenburg H., Van den Eede G. 2002. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *European Food Research and Technology*, 214: 3-26.
- Barut M. 1999. Polimerni makroporozni materiali za hitro industrijsko separacijo biomolekul. Doktorska disertacija. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 110 str.
- Barut M., Podgornik A., Merhar M., Štrancar A. 2003. Short monolithic columns – rigid disks. V: *Monolithic materials: preparation, properties and applications*. 1st ed. Švec F., Tennikova T.B. (eds.). Boston, Elsevier: 51-75.
- Bertheau Y., Diolez A., Kobilinsky A., Magin K. 2002. Detection methods and performance criteria for genetically modified organisms. *Journal of AOAC International*, 85, 3: 801-808.
- Bohanec B. 2004. Osnove rastlinske biotehnologije. V: *Gensko spremenjena hrana*. Bohanec B., Javornik B., Strel B. (ur.). Ljubljana, Ministrstvo za okolje, prostor in energijo, Združenje živilske industrije pri Gospodarski zbornici Slovenije, Biotehniška fakulteta: 1-28.
- Bordoni R., Germini A., Mezzelani A., Marchelli R., De Bellis G. 2005. A microarray platform for parallel detection of five transgenic events in foods: a combined polymerase chain reaction - ligation detection reaction - universal array method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 912-918.
- Brett G.M., Chambers S.J., Huang L., Morgan M.R.A. 1999. Design and development of immunoassays for detection of proteins. *Food Control*, 10: 401-406.

Cankar K. 2006. Razvoj visoko zmogljivih molekularnih metod za analizo gensko spremenjenih rastlin. Doktorska disertacija. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 161 str.

CIM® basics. 2004. Ljubljana, BIA Separations d.o.o. (2007)

<http://www.biaseparations.com/documents/Products/cimbasic.asp> (marec 2007): 4 str.

Clegg R.M. 1995. Fluorescence resonance energy transfer. Current Opinion in Biotechnology, 6: 103-110.

Commission Recommendation 2004/787/EC of 4 October 2004 on technical guidance for sampling and detection of genetically modified organisms and material produced from genetically modified organisms as or in products in the context of Regulation (EC) No 1830/2003. 2004. Official Journal of the European Communities, 47, L348; 18-26.

Commission Regulation (EC) No 65/2004 of 14 January 2004 establishing a system for the development and assignment of unique identifiers for genetically modified organisms. 2004. Official Journal of the European Communities, 47, L10: 5-10.

Council Directive 90/220/EEC of 23 April 1990 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms. 1990. Official Journal of the European Communities, 33, L117: 15-27.

Deisingh A.K., Badrie N. 2005. Detection approaches for genetically modified organisms in foods. Food Research International, 38: 639-649.

Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. 2001. Official Journal of the European Communities, 44, L106: 1-39.

DNA ladders. 2006a. Academtown, SibEnzyme (2006)

<http://global.sibenzyme.com/productinfo.php?id=401> (August 2006): 1 str.

DNA ladders. 2006b. Academtown, SibEnzyme (2006)

<http://global.sibenzyme.com/productinfo.php?id=410> (August 2006): 1 str.

Erickson D.R. 1983. Soybean oil: update on number one. Journal of the American Oil Chemists' Society, 60, 2: 351-356.

Forster A, Harper A.J. 1983. Physical refining. Journal of the American Oil Chemists' Society, 60, 2: 256-271.

Fraley R.T., Rogers S.G., Horsch R.B., Sanders P.R., Flick J.S., Adams S.P., Bittner M.L., Brand L.A., Fink C.L., Fry J.S., Galluppi G.R., Goldberg S.B., Hoffmann N.L., Woo S.C. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 80: 4803-4807.

- Friedrich J.P., List G.R. 1982. Characterization of soybean oil extracted by supercritical carbon dioxide and hexane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30: 192-193.
- Franzone D. 2002. Evropska politika na področju gensko spremenjenih organizmov (GSO). V: Konferenca GSO: tveganje in izziv – vpliv na okolje, zdravje in gospodarstvo. Batič M., Strel B., Lebez-Lozej J., Tavzes R., Friderich F., Pirat D., Michaud B. (ur.). Ljubljana, Republika Slovenija, Ministrstvo za okolje, prostor in energijo, Veleposlaništvo Republike Francije v Sloveniji: 6-9.
- GeneRuler™ and O'GeneRuler™ DNA Ladders. 2006. Burlington, Fermentas (September 2006)
<http://www.fermentas.com/catalog/electrophoresis/generulers.htm> (September 2006): 14 str.
- Glynou K., Ioannou P.C., Christopoulos T.K. 2004. Detection of transgenes in soybean via a polymerase chain reaction and a simple bioluminometric assay based on a universal aequorin-labeled oligonucleotide probe. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378: 1735-1748.
- GM database: information on GM approved products. 2007. Merrickville, Ontario, Canada, Agbios (2007)
<http://www.agbios.com/dbase.php> (March, 2007): 8 str.
- Gryson N., Messens K., Dewettinck K. 2004. Evaluation and optimisation of five different extraction methods for soy DNA in chocolate and biscuits. Extraction of DNA as a first step in GMO analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84: 1357-1363.
- Gryson N., Ronsse F., Messens K., De Loose M., Verleyen T., Dewettinck K. 2002. Detection of DNA during the refining of soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79, 2: 171-174.
- Haraldsson G. 1983. Degumming, dewaxing and refining. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 60, 2: 251-256.
- Heinemann J.A., Sparrow A.D., Traavik T. 2004. Is confidence in the monitoring of GE foods justified? *Trends in Biotechnology*, 22, 7: 331-336.
- Hodgson A.S. 1996. Refining and bleaching. V: Bailey's industrial oil and fat products. 5th ed. Vol. 4: Edible oil and fat products: processing technology. Hui Y.H. (ed.). New York, John Wiley and Sons: 157-212.
- Holst-Jensen A., Ronning S.B., Lovseth A., Berdal K.G. 2003. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 375: 985-993.

- Hotzel H., Müller W., Sachse K. 1999. Recovery and characterisation of residual DNA from beer as a prerequisite for the detection of genetically modified ingredients. *European Food Research Technology*, 209: 192-196.
- Huber C.G. 1998. Micropellicular stationary phases for high-performance liquid chromatography of double-stranded DNA. *Journal of Chromatography A*, 806: 3-30.
- Hübner P., Studer E., Häflinger D., Stadler M., Wolf C., Looser M. 1999a. Detection of genetically modified organisms in food: critical points for quality assurance. *Accreditation and Quality Assurance*, 4, 7: 292-298.
- Hübner P., Studer E., Lüthy J. 1999b. Quantification of genetically modified organisms in food. *Nature Biotechnology*, 17: 1137-1138.
- Hübner P., Waiblinger H.-U., Pietsch K., Brodmann P. 2001. Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. *Journal of AOAC International*, 84, 6: 1855-1864.
- Hupfer C., Hotzel H., Sachse K., Engel K.H. 1998. Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A*, 206: 203-207.
- James C. 2006. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2006. ISAAA Brief No. 35. Ithaca, NY, ISAAA (2006)
<http://www.isaaa.org/Resources/Publications/briefs/35/executivesummary/pdf/Brief%2035%20-%20Executive%20Summary%20-%20English.pdf> (February 2007): 12 str.
- James C., Krattiger A.F. 1996. Global review of the field testing and commercialization of transgenic plants: 1986 – 1995: the first decade of crop biotechnology. ISAAA Briefs No.1. Ithaca, New York, ISAAA (2006)
<http://www.isaaa.org/Resources/Publications/briefs/01/download/isaaa-brief-01-1996.pdf> (February 2007): 44 str.
- Javornik B. 2004. Tržna pridelava gensko spremenjenih rastlin. V: Gensko spremenjena hrana. Bohanec B., Javornik B., Strel B. (ur.). Ljubljana, Republika Slovenija, Ministrstvo za okolje, prostor in energijo, Združenje živilske industrije pri Gospodarski zbornici Slovenije, Biotehniška fakulteta: 29-58.
- Jerman S. 2004. Izolacija kakovostne DNA s CIM[®] diski za odkrivanje gensko spremenjenih organizmov v živilih. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 92 str.
- Jerman S., Raspor P. 2004. Zagotavljanje varnosti gensko spremenjenih živil. V: Mikrobiologija in biotehnologija v proizvodnji varnih živil. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 57-69.

- Jerman S., Podgornik A., Cankar K., Čadež N., Skrt M., Žel J., Raspor P. 2005. Detection of processed genetically modified food using CIM monolithic columns for DNA isolation. *Journal of Chromatography A*, 1065, 1: 107–113.
- Jungbauer A. 2005. Chromatographic media for bioseparation. *Journal of Chromatography A*, 1065: 3-12.
- Karcher S. 1995. *Molecular biology: a project approach*. San Diego, Academic Press: 280 str.
- Klofutar C. 1994. Pregled dodatkov v živilstvu – definicija in uporaba. V: Aditivi: dodatki - tehnologija – zdravje: Zbornik 16. Bitenčevih živilskih dnevnov in 1. simpozija živilcev, Bled, Slovenija, 9. in 10. junij 1994. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 3-10.
- Kramer R.K., Tyagi S. 1996. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology*, 14: 303-308.
- Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonak J., Lind K., Sindelka R., Sjobak R., Sjogreen B., Strombom L., Stahlberg A., Zoric N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27: 95-125.
- Leonard M. 1997. New packing materials for protein chromatography. *Journal of Chromatography B*, 699: 3-27.
- Levison P.R., Badger S.E., Hathi P., Davies M.J., Bruce J.I., Grimm V. 1998. New approaches to the isolation of DNA by ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 827: 337-344.
- Lipp M., Bluth A., Eyquem F., Kruse L., Schimmel L., Van den Eede G., Anklam E. 2001. Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *European Food Research and Technology*, 212: 497-504.
- Lipp M., Brodmann P., Pietsch K., Puwels J., Anklam E. 1999. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified beans and maize in dried powder. *Journal of AOAC International*, 82, 4: 923-928.
- Lipp M., Shillito R., Giroux R., Spiegelhalter F., Charlton S., Pinero D., Song P. 2005. Polymerase chain reaction technology as analytical tool in agricultural biotechnology. *Journal of AOAC International*, 88, 1: 136-155.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. *Brock biology of microorganisms*. 10th ed. Upper Saddle River, NJ, Prentice-Hall, Pearson Education International: 1019 str.
- Mahungu S.M., Artz W.E. 2002. Emulsifiers. V: Food additives. 2nd ed. Branen A.L., Davidson P.M., Salminen S., Thorngate III J.H. (eds.). New York, Basel, Marcel Dekker: 707-755.

- Mariotti E., Minunni M., Mascini M. 2002. Surface plasmon resonance biosensor for genetically modified organisms detection. *Analytica Chimica Acta*, 453: 165 – 172.
- Matsuoka T., Kuribara H., Takubo K., Akiyama H., Miura H., Goda Y., Kusakabe Y., Isshinki K., Toyoda M., Hino A. 2002. Detection of recombinant DNA segments introduced to genetically modified maize (*Zea Mays*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 2100-2109.
- Meyer R. 1999. Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. *Food Control*, 10: 391-199.
- Meyer R., Chardonens F., Hübner P., Lüthy J. 1996. Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung A*, 203: 339-344.
- Meyer R., Jaccaud E. 1997. Detection of genetically modified soya in processed food products: development and validation of a PCR assay for the specific detection of glyphosate-tolerant soybeans. V: *Authenticity and adulteration of food – the analytical approach : proceedings of the Ninth European Conference on Food Chemistry (EURO FOOD CHEM IX)*, Interlaken, Switzerland, September 24-26, 1997. Amado R., Battaglia R. (eds.). Zürich, Swiss Society of Food and Environmental Chemistry, Federation of European Chemical Societies, Food Chemistry Division: 23-28.
- Mihelič I., Koloini T., Podgornik A., Barut M., Štrancar A. 2001. Monoliths – a new generation of chromatographic supports. *Acta Chimica Slovenica*, 48: 551-564.
- Miraglia M., Berdal K.G., Brera C., Corbisier P., Holst-Jensen A., Kok E.J., Marvin H.J.P., Schimmel H., Rentsch J., van Rie J.P.P.F., Zagon J. 2004. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food and Chemical Toxicology*, 42: 1157-1180.
- Morrow J.F., Cohen S.N., Chang A.C.Y., Boyer H.W., Goodman H.W., Helling R.B. 1974. Replication and transcription of eukaryotic DNA in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71, 5: 1743-1747.
- Murray M.G., Thompson W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8, 19: 4321-4325.
- Nacionalna zakonodaja, predpisi in smernice. 2006. Ljubljana, Republika Slovenija, Ministrstvo za okolje in prostor, Posredovalnica informacij o biološki varnosti (2006) <http://www.bch.bf.uni-lj.si/> (februar 2007): 4 str.
- Notification of existing products received by the commission pursuant to articles 8 and 20 of Regulation (EC) 1829/2003 on GM food and feed. 2005. Brussels, EU, portal site Europa (February 2005)

http://ec.europa.eu/food/food/biotechnology/gmfood/notifications_existing_products.pdf (February 2007): 4 str.

Pauli U., Liniger M., Zimmermann A. 1998. Detection of DNA in soybean oil. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung A*, 207: 264-267.

Pasloske B.L., Walkerpeach C.R., Obermoeller R.D., Winkler M., DuBois D.B. 1998. Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 3590–3594.

Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 9: 2002-2007.

Pickard M.D., Jones T.J., Tyler R.T. 1996. By-products utilisation. V: Bailey's industrial oil and fat products. 5th ed. Vol. 4: Edible oil and fat products: processing technology. Hui Y.H. (ur.). New York, John Wiley and Sons: 603-630.

Podgornik A., Barut M., Jančar J., Štrancar A., Tennikova T. 1999. High-performance membrane chromatography of small molecules. *Analytical Chemistry*, 71: 2986-2991.

Podgornik A., Jančar J., Merhar M., Kozamernik S., Glover D., Čuček K., Barut M., Štrancar A. 2004. Large-scale methacrylate monolithic columns: design and properties. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 60: 179-189.

Poms R.E., Glössl J., Foissy H. 2001. Increased sensitivity for detection of specific target DNA in milk by concentration in milk fat. *European Food Research Technology*, 213: 361-365.

Querci M., Maretti M., Mazzara M. 2004. Qualitative detection of MON810 maize, Bt-176 maize and Roundup Ready soybean[®] by PCR (Session 9). V: Training course on – the analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms: user manual. Querci M., Jermini M., Van den Eede G. (eds.). Brussels, European Commission - Joint Research Centre, World Health Organization – Regional Office for Europe (July 2006)

<http://gmotraining.jrc.it/docs/Manual%20EN/Session09.pdf> (July 2006): 30 str.

Querci M., Mazzara M. 2004. Characteristic of Roundup Ready soybean, MON810 maize and Bt-176 maize (Session 7). V: Training course on – the analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms: user manual. Querci M., Jermini M., Van den Eede G. (eds.). Brussels, European Commission - Joint Research Centre, World Health Organization – Regional Office for Europe (July 2006)

<http://gmotraining.jrc.it/docs/Manual%20EN/Session07.pdf> (July 2006): 17 str.

Questions and answers on GMO “existing products” register. 2005. Brussels, EU, portal site Europa (March 2005)

<http://www.europa.eu/rapid/pressReleasesAction.do?reference=MEMO/05/130&format=HTML&aged=1&language=EN&guiLanguage=en> (February 2007): 2 str.

- Questions and answers on the regulation of GMOs in the European Union. 2005. Brussels, EU, portal site Europa (March 2005)
<http://www.europa.eu/rapid/pressReleasesAction.do?reference=MEMO/05/104&format=HTML&aged=1&language=EN&guiLanguage=en> (February 2007): 12 str.
- Rapley R. 2005. Molecular biology, bioinformatics and basic techniques. V: Principles and techniques of biochemistry and molecular biology. Wilson K., Walker J. (eds.). 6th ed. New York, Cambridge University Press: 166-224.
- Raspor P. 2002. Food safety considerations in Europe. V: Proceedings of the 4th Croatian congress of food technologists, biotechnologists and nutritionists - Central European meeting, 3.-5. oktober, 2001, Opatija, Croatia. Tripalo B. (ed.). Zagreb, University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology: 346-357.
- Regulation (EC) No. 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. 2003. Official Journal of the European Communities, 46, L268: 1-23.
- Regulation (EC) No. 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC. 2003. Official Journal of the European Communities, 46, L268: 24-28.
- Rogan G.J., Dudin Y.A., Lee T.C., Magin K.M., Astwood J.D., Bhakta N.S., Leach J.N., Sanders P.R., Fuchs R.L. 1999. Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready[®] soybeans. Food Control, 10: 407-414.
- Rossen L., Norskov P., Holmstrom K., Rasmussen O.F. 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. International Journal of Food Microbiology, 17: 37-45.
- Schreiber G.A. 1999. Challenges for methods to detect genetically modified DNA in foods. Food Control, 10. 351-352.
- Sepčič K., Anderluh G., Turk T., Maček P. 1997. Biokemijski praktikum. Ljubljana, Študentska organizacija Univerze: 182 str.
- Sipos E.F., Szuhaj B.F. 1996. Lecithins. V: Bailey's industrial oil and fat products. 5th ed. Vol. 1: Edible oil and fat products: general applications. Hui Y.H. (ed.). New York, John Wiley and Sons: 311-396.
- Somma M. 2004. Extraction and purification of DNA (Session 4). V: Training course on – the analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms: user manual. Querci M., Jermini M., Van den Eede G. (eds.). Brussels, European

Commission - Joint Research Centre, World Health Organization – Regional Office for Europe (July 2006)

<http://gmotraining.jrc.it/docs/Manual%20EN/Session04.pdf> (July 2006): 18 str.

Somma M., Querci M. 2004. The polymerase chain reaction (PCR) (Session 6). V: Training course on – the analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms: user manual. Querci M., Jermini M., Van den Eede G. (eds.). Brussels, European Commission - Joint Research Centre, World Health Organization – Regional Office for Europe (July 2006)

<http://gmotraining.jrc.it/docs/Manual%20EN%202006/Session06.pdf> (July 2006): 31 str.

Soybean processing. 2007. Urbana-Champaign, University of Illinois, National Soybean Research Laboratory (February 2007)

<http://www.nsrll.uiuc.edu/aboutsoy/soyprocessing.html> (February 2007): 5 str.

Stahlberg A., Aman P., Ridell B., Mostad P., Kubista M. 2003. Quantitative real-time PCR method for detection of B-lymphocyte monoclonality by comparison of kappa and lambda immunoglobulin light chain expression. *Clinical Chemistry*, 49: 51–59.

Statistični urad Republike Slovenije. 2005. Zunanja trgovina. Kumulativni podatki od začetka leta do izbranega meseca: soja, lecitin. Ljubljana, Statistični urad Republike Slovenije, Banka statističnih podatkov (februar 2007)

<http://bsp1h.gov.si/D2300.kom/komstart.html> (februar 2007): 1 str.

Statistični urad Republike Slovenije. 2006. Zunanja trgovina. Kumulativni podatki od začetka leta do izbranega meseca: soja, lecitin. Ljubljana, Statistični urad Republike Slovenije, Banka statističnih podatkov (februar 2007)

<http://bsp1h.gov.si/D2300.kom/komstart.html> (februar 2007): 1 str.

Stave J.W. 1999. Detection of new modified proteins in novel foods derived from GMO-future needs. *Food Control*, 10, 367-374.

Studer E., Rhyner C., Lüthy J., Hübner P. 1998. Quantitative competitive PCR for detection of genetically modified soybean and maize. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung*, 207, 3: 207-213.

Szuhaj B.F. 1983. Lecithin production and utilisation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 60, 2: 306-309.

Štrancar A., Koselj P., Schwinn H., Josić D. 1996. Application of compact porous disks for fast separations of biopolymers and in-process control biotechnology. *Analytical Chemistry*, 68: 3483-3488.

Štrancar A., Podgornik A., Barut M., Necina R. 2002. Short monolithic columns as stationary phases for biochromatography. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 76: 49-85.

- Šuštar-Vozlič J. 2005. Sledljivost gensko spremenjenih organizmov in validacija metod za njihovo določanje. V: Sledljivost živil: 23. Bitenčevi živilski dnevi. Ljubljana, 31. marec in 1. april, 2005. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 103-114.
- Šuštar-Vozlič J., Meglič V. 2002. Uvajanje gensko spremenjenih poljščin v Sloveniji. V: Konferenca GSO: tveganje in izziv – vpliv na okolje, zdravje in gospodarstvo. Batič M., Strel B., Lebez-Lozej J., Tavzes R., Friderich F., Pirat D., Michaud B. (ur.). Ljubljana, Republika Slovenija, Ministrstvo za okolje, prostor in energijo, Veleposlaništvo Republike Francije v Sloveniji: 57-59.
- Tennikova T.B., Švec F. 1993. High-performance membrane chromatography: highly efficient separation method for protein in ion-exchange, hydrophobic interaction and reversed-phase modes. *Journal of Chromatography*, 646: 279-288.
- Terry C., Harris N., Parkes H.C. 2002. Detection of genetically modified crops and their derivatives: critical steps in sample preparation and extraction. *Journal of AOAC International*, 85, 3: 768-774.
- Unger K.K., Janzen R., Jilge G. 1987. Packings and stationary phases for biopolymer separations by HPLC. *Chromatographia*, 24: 144-154.
- Uzogara S.G. 2000. The impact of genetic modification of human foods in the 21st century: a review. *Biotechnology Advances*, 18: 179-206.
- Vaitiligom M., Pijnenburg H., Gendre F., Bringon P. 1999. Real-time quantitative PCR detection of genetically modified Maximizer maize and Roudup Ready soybean in some representative foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 5261-5266.
- Van den Eede G.L., Mazzara M., Barbati C., Querci M.C., Somma M.S., Weighardt F.T. 2004. Detection, identification and quantification of GMOs in food products in the context of EU legislation. V: *Mikrobiologija in biotehnologija v proizvodnji varnih živil*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 145-161.
- Williams M.A., Hron R.J. 1996. Obtaining oils and fats from source materials. V: *Bailey's industrial oil and fat products*. 5th ed. Vol. 4: Edible oil and fat products: processing technology. Hui Y.H. (ed.). New York, John Wiley and Sons: 61-156.
- Wilson I.G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3741-3751.
- Wittwer C.T., Herrmann M.G., Moss A.A., Rasmussen R.P. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques*, 22: 130-138.

- Wurz A., Rüggeberg H., Brodmann P., Waiblinger H.U., Pietsch K. 1998. DNA-extraktionsmethode für den Nachweis gentechnisch veränderter Soja und Sojalecithin. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 94, 5: 159-161.
- Yang J.-G., Wang Y.-H., Yang B., Mainda G., Guo Y. 2006. Degumming of vegetable oil by a new microbial lipase. Food Technology and Biotechnology, 44, 1: 101-104.
- Zakon o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi (uradno prečiščeno besedilo) (ZRGSO-UPB1). 2005. Uradni list Republike Slovenije, 15, 23: 1968-1983.
- Zakon o spremembah in dopolnitvah zakona o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živilom (ZZUZIS-A). 2002. Uradni list Republike Slovenije, 12, 42: 4072-4075.
- Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živilom (ZZUZIS). 2000. Uradni list Republike Slovenije, 10, 52: 6949-6955.
- Zhang M., Gao X., Yu Y., Ao J., Qin J., Yao J., Li Q. 2007. Detection of Roundup Ready soy in highly processed products by triplex nested PCR. Food Control, 18: 1277-1281.
- Zimmermann A., Lüthy J., Pauli U. 1998. Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung A, 207: 81-90.
- Žel J. 2004. Gensko spremenjene rastline: sedanjost in prihodnost. V: Mikrobiologija in biotehnologija v proizvodnji varnih živil. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 163-169.
- Žel J. 2002. Sledljivost gensko spremenjenih organizmov v Sloveniji. V: Konferenca GSO: tveganje in izziv – vpliv na okolje, zdravje in gospodarstvo. Batič M., Strel B., Lebez-Lozej J., Tavzes R., Friderich F., Pirat D., Michaud B. (ur.). Ljubljana, Republika Slovenija, Ministrstvo za okolje, prostor in energijo, Veleposlaništvo Republike Francije v Sloveniji: 28-29.
- Žel J. 2007. Gensko spremenjene rastline – tukaj in zdaj. Ljubljana, Gea (2007) <http://www.gea-on.net/clanek.asp?ID=894&Poglavje=6> (april 2007): 6 str.
- Žel J., Cankar K., Gruden K. 2004. Metodologija ugotavljanja gensko spremenjenih organizmov. V: Varnost živil: 22. Bitenčevi živilski dnevi 2004, 18. in 19. marec 2004, Radenci. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 117-127.
- Žorž M. 1991. HPLC. Ljubljana, samozaložba: 154 str.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Petru Rasporju, za usmerjanje, strokovne popravke in nasvete pri izdelavi diplomske naloge.

Hvala delovnim mentorjema - Frenku Smrekarju za potrpežljivost in pomoč pri mojem vstopu v svet kromatografije ter Ani Kramar za usmerjanje in vso pomoč pri delu.

Hvala prof. dr. Jani Žel za strokovne napotke, razlage in recenzijo.

Posebna zahvala gre tudi Dejanu Štebihu in Jani Vojvoda z Nacionalnega inštituta za biologijo, za številne še kako praktične nasvete in teoretične razlage ter za izvedbo analiz PCR v realnem času.

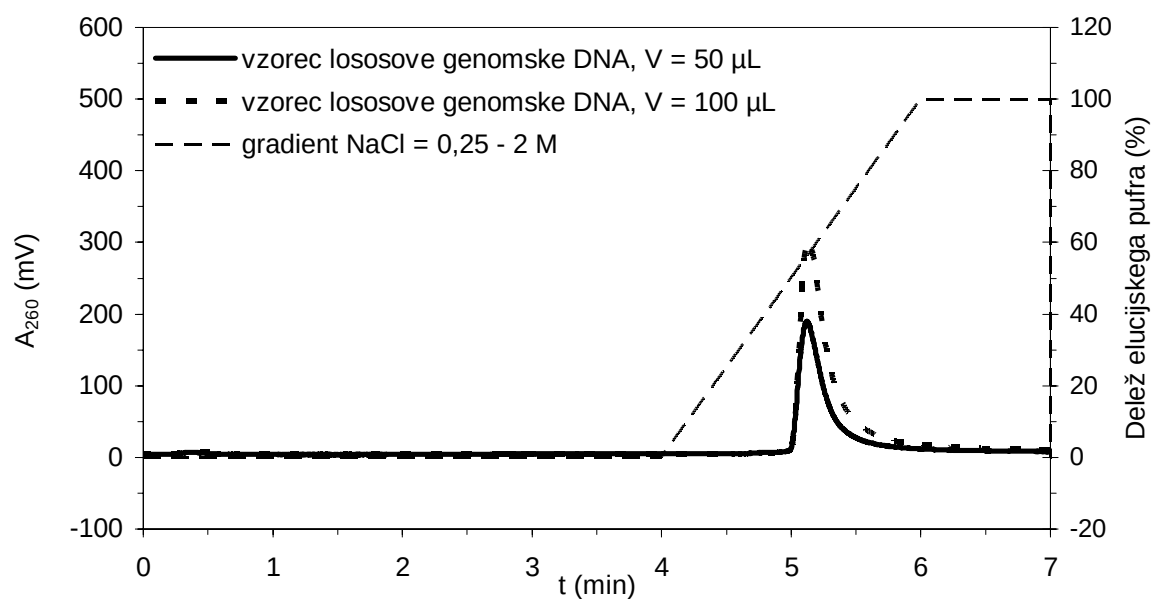
Hvala za pomoč vsem zaposlenim na Katedri za Biotehnologijo, še posebej Urški Lešnik za drobne, a veliko vredne nasvete v genskem laboratoriju.

Hvala tudi vsem prijateljem in kolegom mikrobiologom, še posebej Katari, Rokku, Rokcu, Živi, Maši, Mojci in Mateji, za nasvete ter prijetno druženje v obštudijskih dejavnostih ☺

Neizmerna zahvala pa gre mojim staršem, za izjemno vsestransko podporo in potrpežljivost v vseh letih mojega študija, zlasti pa za trdno vero vame.

Na koncu se opravičujem vsem, ki ob branju niste zasledili svojega imena in ste se zato, za trenutek, morda počutili prikrajšani. Hvala tudi vam.

PRILOGE



Priloga A1: Višine kromatografskih vrhov v odvisnosti od nanešenih volumnov vodne raztopine DNA (standardna raztopina lososove genomske DNA; volumen vzorca je $50 \mu\text{L}$ in $100 \mu\text{L}$; $\gamma_{\text{DNA}} = 0,5 \text{ g/L}$; $\text{pH} = 8$; $\Phi_v = 1 \text{ mL/min}$; gradient NaCl = 0,25 – 2 M; $100 \mu\text{L}$ inj. zanka)

Priloga B1: Površine vrhov kromatogramov za posamezne količine nanešenega ekstrakta pšeničnega lecitina (vzorec št. 2)

Nanešena količina vzorca (μL, neredčeno)	P (mVmin)
20	42,066
40	76,296
60	109,047
80	137,388
100	163,912

Priloga B2: Površine vrhov kromatogramov za posamezne količine nanešenega ekstrakta sojinega lecitina (vzorec št. 6)

Nanešena količina vzorca (μL, pred redčenjem z vodo)	P (mVmin)
750	7,6
3000	25,3
7500	88,8

Priloga C1: Pripadajoče površine in višine vrhov (absorbanca pri 260 nm) kromatogramov za ekstrakte, čiščene in koncentrirane s pomočjo CIM® DEAE diskov, ki so bili shranjeni za nadaljnjo uporabo

Zaporedna št. vzorca	1	2	3	4	5	6	7	8
Površina vrha (mVmin)	20,8	122,6	513,0	278,8	128,2	88,8	80,2	88,4
A₂₆₀ (mV)	33,1	446,5	973,9	820,6	357,3	258,8	169,4	238,7

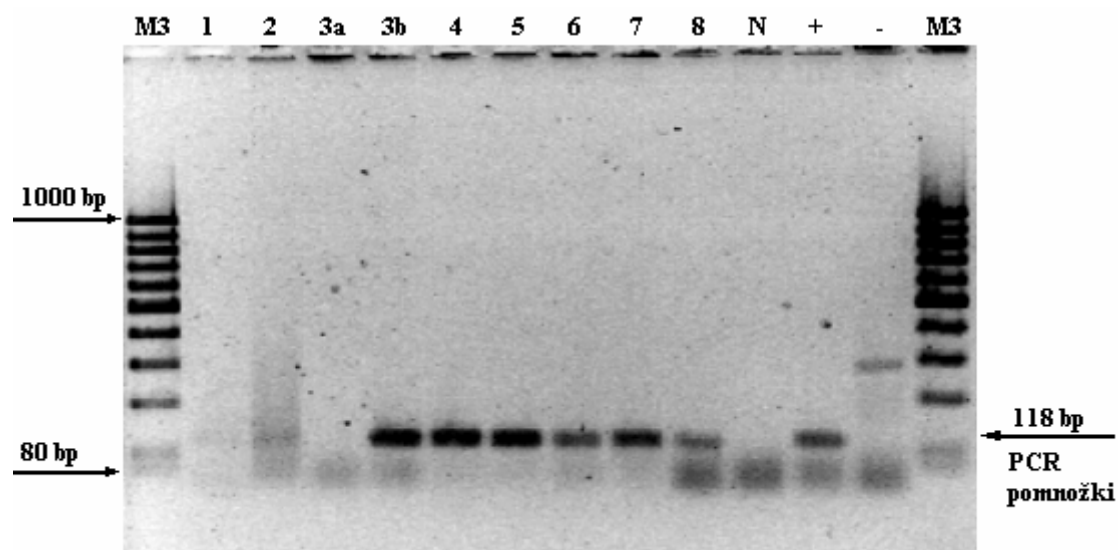
Priloga D1: Rezultati spektrofotometričnega določanja koncentracije nukleinskih kislin v ekstraktih, osamljenih s pomočjo CIM® DEAE diskov po obarjanju z absolutnim etanolom

Vzorec	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₃₀	γ _{NK} (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
1	0,004	0,002	0,006	20	2,0	0,7
2	0,037	0,024	0,029	185	1,5	1,3
3a	0,078	0,078	0,432	350	0,9	0,2
3b	0,129	0,049	0,129	345	1,4	0,5
4	0,063	0,032	0,036	315	2,0	1,7
5	0,021	0,011	0,012	105	1,9	1,7
6	0,021	0,011	0,015	105	1,9	1,4
7	0,010	0,005	0,007	50	2,0	1,4
8	0,012	0,006	0,007	60	2,0	1,7

Priloga D2: Rezultati spektrofotometričnega določanja koncentracije nukleinskih kislin v ekstraktih, osamljenih z metodo CTAB

Vzorec	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₃₀	γ _{NK} (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
1	/	/	/	/	/	/
2	1,626	0,902	0,670	8130	1,8	2,4
3	0,174	0,103	0,209	870	1,7	0,8
4	/	/	/	/	/	/
5	0,005	0,003	0,005	25	1,7	1,0
6	0,310	0,238	0,245	1550	1,3	1,3
7	0,004	0,002	0,004	20	2,0	1,0
8	0,004	0,002	0,004	20	2,0	1,0

Opombe: / - analize niso bile opravljene



Priloga E1: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov PCR, za odkrivanje sojine DNA v ekstraktih, osamljenih s **CIM[®] DEAE diski** (začetna oligonukleotida GMO3 in GMO4, specifična za odsek sojinega *lectin* gena; pomnožek velikosti 118 bp) (**1**: vzorec št. 1; **2**: vzorec št. 2 za neg. kontrolo; **3a**: vzorec št. 3 za neg. kontrolo, frakcija 3a; **3b**: vzorec št. 3 za neg. kontrolo, frakcija; **4**: vzorec št. 4; **5**: vzorec št. 5; **6**: vzorec št. 6; **7**: vzorec št. 7; **8**: vzorec št. 8; **N**: neg. kontrola PCR reakcijske mešanice; **+**: ref. vzorec A za poz. kontrolo (*lectin* poz.); **-**: ref. vzorec B za neg. kontrolo (*lectin* neg.); **M3**: molekularni označevalec velikosti 100 bp)