

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Mojca MURKO

**DOLOČANJE LEŠNIKA KOT ALERGENA V
ŽIVILIH S PCR V REALNEM ČASU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Mojca MURKO

**DOLOČANJE LEŠNIKA KOT ALERGENA V ŽIVILIH S
PCR V REALNEM ČASU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DETECTION OF HAZELNUTS AS AN ALLERGEN
IN FOODS WITH REAL-TIME PCR**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju za živilsko mikrobiologijo na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana izr. prof. dr. Barbara Jeršek in za recenzenta izr. prof. dr. Marjan Simčič.

Mentorica: izr. prof. dr. Barbara Jeršek

Recenzent: izr. prof. dr. Marjan Simčič

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mojca MURKO

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 577.2.083: 634.54: 641.1: 616 - 097 (043) = 163.6
KG	alergeni v živilih/ živila/ lešniki/ <i>Corylus avellana</i> / določanje alergenov/ izolacija DNK iz živil/ PCR v realnem času/ specifičnost PCR v realnem času/ občutljivost PCR v realnem času
AV	MURKO, Mojca
SA	JERŠEK, Barbara (mentorica)/ SIMČIČ, Marjan (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2012
IN	DOLOČANJE LEŠNIKA KOT ALERGENA V ŽIVILIH S PCR V REALNEM ČASU
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 53 str., 9 pregl., 18 sl., 3 pril., 66 vir.
IJ	SI
JI	sl/en
AI	Lupinasto sadje, med katere sodi tudi lešnik, uvrščamo med pogoste prehranske alergene. Lešnik (<i>Corylus avellana</i> L.) je zelo priljubljeno suho sadje, ki se uporablja v različnih oblikah in kombinacijah. Namen diplomskega dela, je bil določiti sledove lešnika kot alergena v živilih s PCR v realnem času. Eksperimentalno delo je bilo razdeljeno na več delov. Najprej smo izbrali ustrezne oligonukleotidne začetnike in sonde, sledila je optimizacija encimske reakcije in določitev občutljivosti ter specifičnosti metode. Optimalne razmere pomnoževanja specifičnega dela DNK, ki določa lešnikov alergen protein Hsp 1, smo dosegli s testiranjem različnih mešanic za PCR v realnem času z različnimi koncentracijami sonde in oligonukleotidnih začetnikov. Izbrane optimalne razmere encimske reakcije so bile 50 nmol/L sonde Nocc1P in 300 nmol/L oligonukleotidnih začetnikov Nocc2F in Nocc1Rbis. Specifičnost oligonukleotidnih začetnikov Nocc2F, Nocc1Rbis in sonde Nocc1P, smo določili z analizami različnih sort lešnika, arašida in mandlja. Reakcija je bila 100 % specifična. Občutljivost s čisto DNK lešnika je bila 0,9 pg v območju kvantifikacije od 90,5 ng/μL - 0,9 pg/μL, ob 90,3 % učinkovitosti reakcije. S PCR v realnem času za določanje lešnika kot alergena smo določili praktično občutljivost, ki je znašala 0,0005 % lešnika v standardnih lešnikovih mešanicah. Območje kvantifikacije je bilo od 0,0005 % - 100 % ob 104,2 % učinkovitosti reakcije. Analizirali smo 23 različnih živilskih izdelkov iz slovenskega tržišča. Glede na označbe je 7 izdelkov vsebovalo lešnik, v 6 izdelkih bi naj bilo lupinasto sadje lahko prisotno le v sledovih in 10 izdelkov ne bi smelo vsebovati lešnika. Rezultati PCR v realnem času so bili skladni z označbami pri 18 izdelkih, medtem ko smo pri 5 izdelkih določili lešnik, čeprav na deklaraciji ni bil naveden.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dn

DC UDC 577.2.083: 634.54: 641.1: 616 - 097 (043) = 163.6

CX food allergens/ foods/ hazelnuts/ *Corylus avellana*/ detection of allergens/ DNA isolation from foods/ real time PCR/ specificity of PCR real-time/ sensitivity of PCR real-time

AU MURKO, Mojca

AA JERŠEK, Barbara (supervisor)/ SIMČIČ, Marjan (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology

PY 2012

TI DETECTION OF HAZELNUTS AS AN ALLERGEN IN FOODS WITH REAL-TIME PCR

DT Graduation thesis (University studies)

NO XI, 53 p., 9 tab., 18 fig., 3 ann., 66 ref.

LA SI

AL sl/en

AB Nuts including hazelnut are classified as frequent food allergens. Hazelnut (*Corylus avellana* L.) is one of the most popular dried fruit that can be used in various forms and combinations. The purpose of the graduation thesis was detection and quantification of hazelnut traces (*Corylus avellana* L.) as a food allergen using real-time PCR. The experimental work was divided into several parts. First we selected and set the suitable primer and probe, then we optimised enzymatic reactions and determined sensitivity and specificity of the method. Optimal conditions for DNK amplification of *Hsp 1* gene encoding allergen protein were achieved by preparing different PCR-mixtures with various concentrations of probe and primers. The selected optimal conditions were 50 nmol/L of Nocc1P probe and 300 nmol/L of Nocc2F and Nocc1Rbis primers. The specificity of Nocc2F and Nocc1Rbis primers, and of NoccP probe, was determined by analyzing different types of hazelnuts, peanuts, and almonds. The reaction was 100 % specific. The sensitivity of enzymatic reactions with pure hazelnut DNA was 0.905 pg. The range of quantification was from 90.5 ng/uL to 0.9 ng/uL with the reaction efficiency of 90.3 %. Practical sensitivity of real-time PCR was 0.0005 % of hazelnut in standard hazelnut mixtures. The range of quantification was from 0.0005 % to 100 % with a reaction efficiency of 104.2 %. We analyzed 23 different food products from the Slovenian market. According to the nutrient declarations, 7 of the products contained hazelnut, 6 of the products might have contained traces of nuts and 10 products should not contain hazelnut. The results of real-time PCR were consistent with the declarations for 18 products, while in 5 products hazelnut was detected, although the declaration did not mention it.

OKRAJŠAVE

Ab	protitelo (ang. antibody)
bp	bazni par
C_p	presečišče krivulje fluorescence z osnovno linijo (ang. crossig point)
C_t	cikel meje določljivosti (ang. threshold cycle)
E	učinkovitost PCR (%)
ELISA	encimsko-imuski test (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)
GMO	genetsko spremenjen organizem (ang. genetically modifed organism)
HSP	protein toplotnega šoka (ang. heat shock protein)
IgE	imunoglobulin E
LOD	meja določljivosti (ang. limit of detection)
MED	minimalni reakcijski odmerek (ang. minimal elicting dose)
Nocc2F, Nocc1Rbis	oligonukleotidna začetnika za določanje lešnika <i>Corylus avellana</i> L.
Nocc1P	oligonukleotidna sonda za določanje lešnika <i>Corylus avellana</i> L.
NsLTPs	2S albuminska družina, družina nespecifičnih lipidnih transfernih proteinov
NTC	negativna kontrola pri PCR v realnem času
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
PRs	patogenezo povezani proteini (ang. pathogenesis-related proteins)
R²	korelacijski koeficient
ΔRn	velikost normaliziranega fluorescentnega signala
RCF	relativna centrifugalna sila (ang. relative centrifugal force)

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	VI
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PREGLEDNIC	X
KAZALO PRILOG	XI
1 UVOD	1
1.1 CILJI NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 PREHRANSKE ALERGIJE	3
2.1.1 Z IgE posredovana prehranska alergija	4
2.1.2 Druge prehranske alergije	5
2.1.3 Prehranska intoleranca (nealergijska preobčutljivost za hrano)	5
2.2 KLASIFIKACIJA ALERGENOV V ŽIVILIH	5
2.2.1 Delitev najpomembnejših alergenih proteinov iz živil	5
2.2.2 Alergeni v lupinastem sadju	6
2.3 LEŠNIK	6
2.3.1 Splošne lastnosti lešnika	6
2.3.2 Lešnik kot alergen	7
2.4 UČINKI OBDELAVE ŽIVILA NA STABILNOST ALERGENA	8
2.4.1 Toplotna obdelava	8
2.4.2 Fermentacija	9
2.4.3 Proteoliza	9
2.4.4 Ultrafiltracija	9
2.4.5 Skladiščenje	9
2.4.6 Uporaba drugih postopkov	9
2.5 PCR	10
2.5.1 PCR v realnem času	11
2.5.1.1 Specifične metode določanja pomnožkov	12
2.5.1.2 Nespecifične metode določanja pomnožkov	13

2.5.2	Kvantitativni PCR v realnem času	14
2.5.3	Inhibitorji PCR.....	15
2.5.4	Vpliv izolacije DNK na PCR	16
2.5.5	Načini določanja koncentracije izolirane DNK	18
2.6	DOLOČANJE LEŠNIKA KOT ALERGENA V ŽIVILIH S PCR	18
2.7	ZAKONODAJA S PODROČJA ALERGENOV	20
3	MATERIALI IN METODE	22
3.1	MATERIALI	22
3.1.1	Reagenti za izolacijo DNK iz živil	22
3.1.2	Reakcijska mešanica za PCR v realnem času.....	22
3.1.3	Reagenti za gelsko elektroforezo	23
3.1.4	Vzorci.....	23
3.1.4.1	Vzorci alergenov.....	23
3.1.4.2	Sestavine za izdelavo standardnih mešanic:	23
3.1.4.3	Vzorci živil	23
3.1.5	Laboratorijska oprema.....	26
3.2	METODE	27
3.2.1	Izolacija DNK	27
3.2.1.1	Izolacija s kompletom Nucleospin.....	27
3.2.2	Spektrofotometrično določanje količine DNK.....	28
3.2.3	Priprava reakcijske mešanice za PCR v realnem času	28
3.2.4	Izvedba PCR v realnem času in vrednotenje rezultatov.....	29
3.2.5	Dokazovanje pomnožkov z agarozno gelsko elektroforezo	29
3.2.6	Optimizacija PCR v realnem času	30
3.2.7	Določitev specifičnosti PCR v realnem času	30
3.2.8	Določitev občutljivosti in učinkovitosti PCR v realnem času.....	30
3.2.8.1	Občutljivost in učinkovitost PCR v realnem času, določena z čisto DNK	30
3.2.8.2	Občutljivost in učinkovitost PCR v realnem času, določena s standardnimi lešnikovimi mešanicami	31
3.2.9	Relativna kvantifikacija lešnika kot alergena v vzorcih živil.....	32
4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	33

4.1	OPTIMIZACIJA PCR V REALNEM ČASU ZA DOLOČANJE LEŠNIKA	33
4.2	SPECIFIČNOST PCR V REALNEM ČASU ZA DOLOČANJE LEŠNIKA	34
4.3	DOLOČITEV TEORETIČNE OBUČTLJIVOSTI PCR V REALNEM ČASU ZA DOLOČANJE LEŠNIKA	38
4.4	DOLOČITEV PRAKTIČNE OBUČTLJIVOSTI PCR V REALNEM ČASU ZA DOLOČANJE LEŠNIKA	40
4.5	DOLOČITEV LEŠNIKA V ŽIVILIH S PCR v realnem času.....	42
4.5.1	Kvalitativna določitev	42
4.5.2	Relativna kvantifikacija.....	43
5	SKLEPI	46
6	POVZETEK.....	47
7	VIRI	48
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO SLIK

Slika 1: Razčlenitev preobčutljivosti za hrano (Wraber, 2004).....	3
Slika 2: Vezava antigena na IgE in sproščanje mediatorjev iz mastocita (Alberts in sod., 2002)	4
Slika 3: Princip reakcije PCR (Greiner in Konietzny, 2007).	10
Slika 4: Krivulja pomnoževanja PCR v realnem času (BioRad, 2006).....	12
Slika 5: Shematski prikaz principa PCR v realnem času s Taq-Man sondo (Shipley, 2006).	13
Slika 6: Princip vezave barvila SYBR Green I v dvojno vijačnico DNK (Fraga in sod., 2008).....	14
Slika 7: Vezava inhibitorja na aktivno mesto DNA-polimeraze (Vickers, 2010).....	16
Slika 8: Prikaz sekvenc oligonukleotidnih začetnikov Nocc2F, Nocc1Rbis in sonde Nocc1P v genu <i>Hsp 1</i> ki kodira protein toplotnega šoka, specifičnega za <i>Corylus avellana</i> L. (NCBI, 2011)	1
Slika 9: Shema eksperimentalnega dela	27
Slika 10: Temperaturno-časovne faze pomnoževanja DNK v aparatu ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, 2004)	29
Slika 11: Velikost fragmentov molekularnega označevalca dolžin pomnožkov na agaroznem gelu (LightLabs, 2011).....	30
Slika 12: Optimizacija PCR v realnem času za določanje lešnika	33
Slika 13: Specifičnost PCR v realnem času za določanje lešnika	35
Slika 14: Agarozna gelska elektroforeza specifičnih pomnožkov pridobljenih s PCR v realnem času	37
Slika 15: Teoretična občutljivost PCR v realnem času za določanje lešnika	38
Slika 16: Umeritvena krivulja dobljena s čisto DNK lešnika.....	39
Slika 17: Določanje lešnika v standardnih lešnikovih mešanicah	40
Slika 18: Umeritvena krivulja dobljena s standardnimi lešnikovimi mešanicami	42

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Metode določanja lešnika kot alergena v živilih	19
Preglednica 2: Vzorci živil uporabljeni v eksperimentalnem delu	24
Preglednica 3: Laboratorijska oprema	26
Preglednica 4: Vrednosti C_t za določanje lešnika z različnimi koncentracijami sonde (Nocc1P) in oligonukleotidnih začetnikov (Nocc2F, Nocc1Rbis) pri PCR v realnem času	34
Preglednica 5: Rezultati specifičnosti PCR v realnem času za določanje lešnika.....	36
Preglednica 6: Občutljivosti PCR v realnem času za določanje lešnika	39
Preglednica 7: Koncentracija lešnika v standardnih lešnikovih mešanicah z vrednostmi C_t	41
Preglednica 8: Rezultati določanja lešnika v vzorcih živil s PCR v realnem času in deklarirana vsebnost lešnika na izdelku	43
Preglednica 9: Vrednosti C_t in koncentracija lešnika v živilih	44

KAZALO PRILOG

Priloga A: Določanje lešnika v musli keksih, O`Cake-u, smokijih in vanilijevih rogljičkih z orehi ter kifeljčkih z orehi s PCR v realnem času

Priloga B: Določanje lešnika v orehovem čokoladnem pecivu, vrhniških linških očeh, horalky-u, domačih orehovit keksih, orehovit rogljičkih 1 in 2 ter domačem prijatelju s PCR realnem času

Priloga C: Določanje lešnika v mlečni čokoladi s celimi lešniki, beli čokoladi s celimi lešniki in hrustljivim rižem, čokoladi s celimi lešniki, vafļu polnjenim s kremo in oblitim z mlečno čokolado, kakavovit palčicah, čajnem pecivu, v otroških veselje keksih, vrhniškem čajnem pecivu, krašuljicah in v vafļu oblitim z mlečno čokolado s PCR realnem času

1 UVOD

V zadnjih letih je prehranska alergija na sestavine živil postala pomemben javno zdravstveni problem (Wang in sod., 2009). Izraz prehranska alergija (alergija na hrano) se uporablja za neželene reakcije na sicer popolnoma neškodljivo hrano oziroma njene sestavine. Neželene reakcije temeljijo na imunskih odzivih, zato so to imunsko posredovane reakcije. Snovi, ki izzovejo te reakcije imenujemo alergeni. Alergeni so antigeni (oz. hapteni), ki aktivirajo imunski sistem tako, da izzovejo alergijsko reakcijo (Wraber, 2004).

Okoli 90 % vseh alergij oziroma preobčutljivostnih reakcij na živila je povzročenih z osmimi skupinami živil: lupinasto sadje, arašidi, jajca, mleko in mlečni izdelki, soja, pšenica, ribe in raki (IVZ RS, 2010). Lupinasto sadje se zaradi pozitivnega učinka na zdravje in okusa pogosto uporablja v živilski industriji. Orehi, lešniki, ameriški orehi, brazilski oreščki, arašidi in mandlji so med lupinastim sadjem najpogostejši alergeni (Koppelman, 2006).

Živilski izdelki, ki ne vsebujejo lupinastega sadja, se naj ne bi proizvajali na isti proizvodni liniji, kot izdelki z lupinastim sadjem, saj lahko pride do navzkrižne kontaminacije. Pojem navzkrižna kontaminacija pomeni, da se lahko alergeni kljub zaščitnim ukrepom prenesejo v mikro količinah iz enega izdelka na drugega preko opreme, zraka in surovin (npr. iz pekovskega peciva s posipom na pekovsko pecivo brez posipa ali iz jajčnih testenin na testenine brez jajc). Vsi živilski obrati nimajo na voljo različnih linij za proizvodnjo, zato je zelo pomembno, da se izvaja redna kontrola proizvodnih postopkov in ustrezna sanitacija. Metode za odkrivanje alergenov in sledov alergenov iz lupinastega sadja so v živilski industriji ključnega pomena. Sledovi alergenov v izdelkih, ki naj ne bi vsebovali alergenov, predstavljajo veliko tveganje za potrošnika alergika, saj lahko vodijo k hudim alergičnim reakcijam. Zaradi boljšega varovanja zdravja potrošnika se v takšnih primerih na deklaracijo zapiše smiselno opozorilo, ki je najpogostejše v obliki »Lahko vsebuje sledove ...« (ZPS, 2007).

Med povzročitelje alergij sodi lupinasto sadje, med katere uvrščamo tudi lešnik (*Corylus* spp.). Na pobudo komisije FAO / WHO Codex Alimentarius in Evropske komisije se je lešnik zaradi pogostosti uporabe in nevarnosti povzročitve alergijske reakcije znašel na seznamu najbolj nevarnih alergenov v kakršni koli obliki uživanja. Znaki alergijske reakcije segajo od blagih (kožne reakcije, prebavne motnje in dihalne težave), do smrtno nevarnih (anafilaktični šok) (Arlorio in sod., 2007). V prilogi 4 Pravilnika o splošnem označevanju predpakiranih živil (2004), je lešnik označen kot sestavina, ki lahko povzroča alergijo.

Lesko uvrščamo v družino brezovk (*Betulaceae*) in rod *Corylus*. Plod leske imenujemo lešnik in je po botanični klasifikaciji orešček, zaprt v ovoju (Sancin, 1988). Zaradi posebno bogate sestave maščob, beljakovin, ogljikovi hidratov, vitaminov, mineralov, prehranskih vlaknin, kalija, kalcija, fosforja, magnezija, železa, selen, stroncija, bora, molibdena, fitosterolov (beta-citosterol) in antioksidantov, fenolov ter dejstva, da uživanje lešnikov lahko zmanjša tveganje za bolezni srca in vpliva na zniževanje holesterola v krvi, so lešniki izredno cenjeno živilo in pogosto uporabljena sestavina v živilski industriji (Arlorio in sod., 2007). Zaužitje lešnika predstavlja tveganje in veliko nevarnost posameznikov, ki so nagnjeni k preobčutljivostnim odzivom (atopiki), saj lešnik vsebuje alergene. Alergeni v lešniku so Cor a

1, Cor a 2, Cor a 8, Cor a 9, Cor a 10, Cor a 11, Cor a 12 in Cor a 13 (Fielder in sod., 2010; Allergome, 2010).

Danes še ni razvitega zdravila, ki bi preprečevalo vzroke alergij in drugih preobčutljivosti, zato je potrebno veliko pozornost nameniti označevanju alergenih sestavin v živilih. Le tako se lahko potrošniki, ki so nagnjeni k alergijam ali preobčutljivostnim reakcijam izognejo uživanju alergenih živil oziroma njihovih sestavin. Navajanje sestavin, ki lahko povzročijo alergije in preobčutljivostne reakcije je za informiranje posameznika pomembno tudi, če jih živilo vsebuje le v sledovih. Skriti alergeni in alergeni v sledovih v živilih zaradi povzročanja alergijskih reakcij predstavljajo veliko skrb proizvajalcev in potrošnikov. Za zagotavljanje varnosti potrošnika potrebujemo tako učinkovite in primerne metode za odkrivanje alergenov v živilih, kot tudi redno kontrolo pravilnega označevanja živil. S primernimi metodami je mogoča kontrola nadzora skladnosti označevanja z dejansko vrednostjo alergenov v živilih (IVZ RS, 2010).

Prisotnost lešnikov (*Corylus avellana*) smo določali v izbranih živilih, ki so na voljo na slovenskem tržišču. Uporabili smo specifično in občutljivo metodo PCR v realnem času za določanje lešnika v živilu. Priprava čim bolj čiste DNA je nujna za visoko specifičnost in občutljivost PCR v realnem času. Izolacija DNK iz živil je pomembna, saj nepravilna izolacija močno vpliva na rezultate analize (Holzhauser, 2006).

1.1 CILJI NALOGE

Cilj naše naloge je bil ugotoviti prisotnost lešnika v sledovih v različnih živilih na slovenskem tržišču. Za doseg cilja smo morali:

- vpeljati PCR v realnem času za določanje lešnika kot alergena v živilih,
- izbrati oligonukleotidne začetnike in sonde, ki so specifični za lešnik,
- izolirati DNK čistega lešnika in DNK lešnika v živilih za določanje lešnika s PCR v realnem času,
- določiti primerne razmere PCR v realnem času (optimizirati reakcijske sestavine ter časovno-temperaturni profil in število ciklov),
- določiti specifičnost, občutljivost ter učinkovitost PCR v realnem času in
- določiti sledove lešnikov v živilih.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevamo, da:

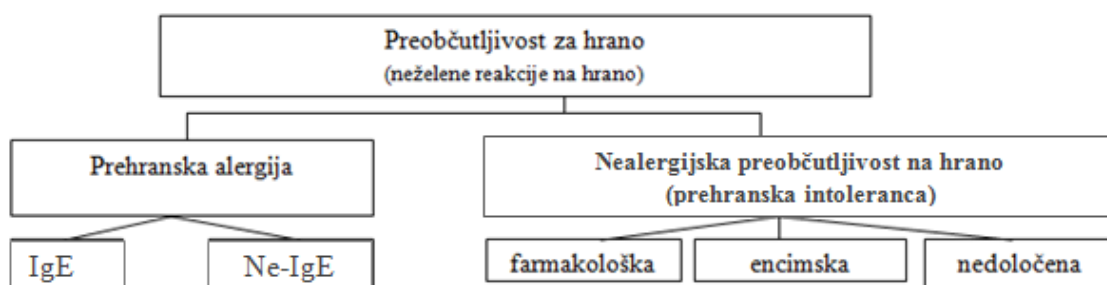
- bodo izbrani oligonukleotidni začetniki in sonda specifični za lešnik,
- bo izolacija DNK lešnika iz živil po razmaščevanju vzorca z acetonom lažja, kot izolacija DNK iz živil brez razmaščevanja,
- bo PCR v realnem času po optimizaciji dovolj občutljiva in specifična metoda za iskanje sledov lešnikov v živilih,
- bomo lahko s PCR v realnem času določili vsaj 0,01 % sledov lešnika v različnih vrstah živil.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PREHRANSKE ALERGIJE

V današnjem času se vse več ljudi posredno ali neposredno srečuje s prehranskimi alergijami. Podatki Svetovne zdravstvene organizacije iz leta 2006, med katerimi so tudi podatki za Slovenijo, kažejo da je na hrano oziroma nekatere sestavine v njej alergičnih od 1 do 3 % odraslih ljudi in od 4 do 6 % otrok (Pajk Žontar, 2006). Okoli 90 % vseh alergičnih reakcij povzroči predvsem osem skupin živil. To so: mleko in mlečni izdelki, jajca, arašidi, lupinasto sadje, žita, ki vsebujejo gluten, soja, ribe in raki. Po oceni je od 5 do 6 % populacije preobčutljiva na hrano, okoli 2 % pa ima alergijske reakcije na hrano. Pri dojenčkih in malih otrocih je ta delež najmanj dvakrat večji (IVZ RS, 2010).

Neugodne reakcije (slika 1) delimo na preobčutljivostne reakcije ali prehranske intolerance in na prehranske alergije. Izraz prehranska alergija (alergija na hrano) se uporablja za neželene reakcije na popolnoma neškodljivo hrano oziroma njene sestavine, ki temeljijo na imunskih mehanizmi. Predpogoj za nastanek alergije je moten imunski sistem, npr. zaradi dednosti (Rakoski, 1998). To so imunsko posredovane reakcije. Snovi, ki pa izzovejo te reakcije, so alergeni. Alergeni so antigeni (oz. hapteni), ki aktivirajo imunski sistem tako, da izzovejo alergijsko reakcijo. Reakcije, kjer se ne da dokazati imunskega mehanizma imenujemo nealergijska preobčutljivost na hrano oziroma po starem prehranska intoleranca. Ta oblika preobčutljivosti je lahko pogojena z motnjami v delovanju encimov, lahko je farmakološka ali pa so mehanizmi nepoznani (nedoločena) (Wraber, 2004). Razčlenitev preobčutljivosti za hrano (prehranska občutljivost), je prikazana na sliki 1.



Slika 1: Razčlenitev preobčutljivosti za hrano (Wraber, 2004)

Povzročen imunski odgovor oziroma alergijske reakcije se lahko pojavijo že pri zelo majhnih količinah zaužitih alergenov v živilih, vendar minimalne količine potrebne za imunski odziv ni mogoče določiti (Taylor, 2006). Na splošno velja, da je resnost reakcije sorazmerna s stopnjo preobčutljivosti in ravni vsebnosti sestavin v hrani. Znano je, da tisti, ki trpijo za različnimi prehranskimi alergijami, npr. anafilakso, imajo lahko reakcije, ki so povzročene že npr. s 100 µg alergena v živilu kot MED (ang. minimal eliciting dose), vendar se razlikujejo od vsakega posameznika. Anafilaksa, znana tudi kot anafilaktični šok, je redko, življenje ogrožajoče stanje. Gre za hudo alergično reakcijo, ki prizadene ves organizem. Alergijske reakcije se lahko pojavijo že pri majhni količini zaužite substance. Živilski proizvodi so danes sestavljeni iz različnih sestavin, ki so lahko prisotne le v sledovih, vendar so lahko izvor številnih skritih alergenov (IVZ RS, 2010).

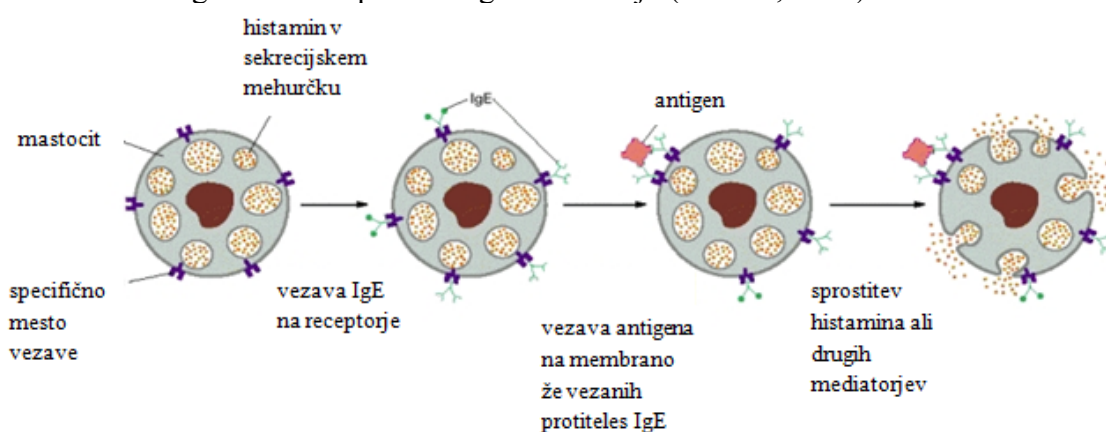
2.1.1 Z IgE posredovana prehranska alergija

Prehranska alergija je preobčutljivost ali nenormalen odziv organizma na popolnoma neškodljivo hrano oz. njene sestavine, ki večini ljudi ne povzroča težav. Snovi, ki izzovejo te reakcije, imenujemo alergeni, ki v našem telesu povzročijo nastajanje protiteles, predvsem imunoglobulinov razreda E (IgE). Reakcije posredovane z IgE vključujejo nešteto simptomov, ki segajo od blagih do življenjsko ogrožajočih (Taylor, 2006).

Alergeni ob vstopu v organizem najprej aktivirajo imunski sistem tako, da reagirajo s protitelesi, ki jih je alergik tvoril za boj proti alergnim snovem. Telo začne izdelovati specifične imuno-globuline IgE, ki se preko receptorjev vežejo na mastocite in bazofilce v sluznici. Značilnost imuno-globulinov tipa imuno-globulinov E (IgE), kot tudi drugih razredov protiteles je del molekule s specifičnim mestom vezave za alergen oz. antigen, ki je izzval njihov nastanek. Pri ponovnem vstopu alergena v telo se bo le-ta vezal na zanj specifične IgE. Pri tem se mastociti oz. bazofilci aktivirajo in prične se proces izločanja mediatorjev z IgE posredovane alergijske reakcije. Mediatorji so snovi, ki povzročajo vnetja. Važen mediator je npr. histamin. Ti povzročijo padec krvnega pritiska, zatekanje sluznice, povečano izločanje sekreta iz pljuč in nosu, žile postanejo prepustne za tekočine, tako da pride do oteklin. V skrajnem primeru lahko pride do anafilaktičnega šoka, ki je najhujša oblika prehranske alergije. Prehranski alergeni, praviloma proteini oz. peptidi, vstopijo v organizem skozi prebavni trakt. Pri z IgE posredovanimi oblikami prehranske alergije se znaki pojavijo hitro, lahko že po nekaj minutah, običajno v času do dveh ur. Pri zelo občutljivih ljudeh lahko že vonjanje ali dotik s hrano sproži reakcijo (Rakoski, 1998; Wraber, 2004).

Mehanizem delovanja alergičnih reakcij, posredovanih z IgE (slika 2):

- alergen stimulira nastanek protiteles IgE
- vezava protitelesa IgE na površino mastocitov in bazofilnih granulocitov
- sproščanje histamina ali drugih mediatorjev v prisotnosti alergena z mastociti in bazofilni granulaciti sproži alergično reakcijo (Wraber, 2004).



Slika 2: Vezava antigena na IgE in sproščanje mediatorjev iz mastocita (Alberts in sod., 2002)

Dele antigenov, ki jih specifično spoznajo posamezni limfociti oziroma protitelesa (celice B ali celice T), imenujemo epitopi ali antigenske determinante. Antigen ima lahko enega ali več epitopov, koliko epitopov bo vseboval, pa določa tridimenzionalna struktura molekule.

Epitopi so razdeljeni v dve kategoriji: konformacijske in linearne epitope. Konformacijski epitopi so prekinjeni, linearni epitopi pa so neprekinjeni. Najpogostejše epitop sestavljajo aminokisline, več sladkorjev (ogljikovi hidrati) ali lipidi, ki ležijo eden zraven drugega pri neprekinjenih epitopih, pri prekinjenih pa aminokisline ne ležijo ena zraven druge, ampak se nagubajo in se s tem toliko približajo, da jih protitelo prepozna kot epitop (Huang in Honda, 2010).

2.1.2 Druge prehranske alergije

Alergijske reakcije, povzročene z drugimi, ne-IgE posredovanimi mehanizmi, se večinoma pojavljajo kot vnetja v tankem črevesu. Pri majhnih otrocih so običajno povezane z mlekom, pšenico ali sojo in izginejo, če te sestavine odstranijo iz hrane. Te alergije so slabše raziskane in manj posredne, kot alergijske reakcije povzročene z IgE mehanizmi. Pogosto so pri teh reakcijah vpleteni specifični limfociti T (Wraber, 2004).

2.1.3 Prehranska intoleranca (nealergijska preobčutljivost za hrano)

Reakcije, kjer ne moremo dokazati imunskega mehanizma imenujemo ne alergijska preobčutljivost za hrano ali prehranska intoleranca, to je nenormalni fiziološki odziv na zaužito živilo ali aditiv. Vzrok za nealergijsko preobčutljivost na hrano je večinoma pogojen s pomanjkanjem encimov. Najbolj poznano je pomanjkanje laktoze in posledično neprenašanje mleka. Druga skupina vzrokov je farmakološka ali mehanizmi niso poznani (Wraber, 2004). Te reakcije se razlikujejo od drugih, saj ne povzročajo imunskih odzivov in se ne pojavijo kot rezultat prehranske alergije. Take bolezni, ki so povezane s hrano, so individualne, saj vplivajo le na peščico ljudi v celotni populaciji (Taylor, 2006). Med nealergijske prehranske preobčutljivosti se uvrščajo tudi preobčutljivostne reakcije na hrano, kadar se iz popisa bolezni, in/ali provokacijskih testov nedvoumno razbere da je vzrok opazovane reakcije določena hrana, ni pa dokaza o prisotnih imunskih mehanizmih (Wraber, 2004).

2.2 KLASIFIKACIJA ALERGENOV V ŽIVILIH

2.2.1 Delitev najpomembnejših alergenih proteinov iz živil

Alergeni so visoko molekularne snovi, ki povzročajo alergijske reakcije. Vsaka tuja snov, ki lahko spodbudi imunski odziv, je potencialni alergen. Številne naravne in sintetične kemične spojine so alergogene, vendar le, če so vezane na proteine (konjugirani proteini, kjer so proteini nosilci in alergen hapteni). Številne biokemijske in fizikalno-kemijske lastnosti alergenov, so ponavadi povzročitelji alergij. Kompleksne naravne organske spojine navadno povzročajo s protitelesi IgE posredovano alergijo (takojšnjo preobčutljivost), medtem ko preproste anorganske spojine pogostejše povzročajo celično posredovano alergijo (pozno občutljivost). Preproste spojine se morajo vezati s proteini, da delujejo kot alergen (Vozelj, 2000).

Alergeni proteini v živilih so zbrani v družine, če imajo podobnost aminokislinskega zaporedja 30 % ali več. Kljub manjši podobnosti aminokislinskega zaporedja lahko tudi spadajo v isto družino, vendar takrat, ko so si podobni po funkciji ali strukturi. Družine proteinov, ki imajo manjšo podobnost aminokislinskega zaporedja, vendar njihove strukture ali funkcije nakazujejo, da imajo isti evolucijski izvor, združujemo v naddružine. Alergeni

spadajo v kupinsko naddružino (družini 7S in 11S semenskih skladiščnih proteinov), prolaminsko naddružino (2S albuminska družina, družina nespecifičnih lipidnih transfernih proteinov (NsLTPs), družina alfa-amilaznin/tripsin inhibitorjev in družina prolaminskih skladiščnih proteinov in žitaric) in papinsko naddružino cisteinskih proteaz (Breitender, 2006).

Večina prehranskih alergenov rastlinskega izvora spada v le nekaj družin in naddružin. Alergeni rastlinskih proteinov so bili uvrščeni na podlagi svojih bioloških funkcij in glede na pripadnost v proteinske družine. Semenski skladiščni proteini, ki spadajo v veliko skupino kupinske naddružine, so eni od najpomembnejših komponent človeške prehrane. Globulinski proteini se glede na sedimentacijski faktor delijo na 11S globuline iz stročnic in 7S vicilinske globuline. Alergeni proteini soje, arašidov, lešnikov in mandljev so najpogostejši predstavniki alergenih proteinskih globulinov iz stročnic. Skladiščni proteini iz stročnic in drevesnega lupinastega sadja predstavljajo do 50 % celotne količine semenskih proteinov (Breitender, 2006).

2.2.2 Alergeni v lupinastem sadju

Lupinasto sadje, kamor spadajo tudi lešnik, arašidi, mandlji, orehi in brazilski oreščki, uvrščamo med najpogostejša alergena živila. Lešnik, oziroma drugo lupinasto sadje se pogosto uporablja v živilskih proizvodih za izboljšanje okusa in pozitivnega učinka na zdravje. Lešniki v čokoladi in čokoladnih izdelkih so zelo cenjen izdelek velike večine potrošnikov. Vsebnost oziroma količina lešnika v živilu določa ceno izdelka. Da se doseže tipična aroma oziroma okus po lešnikih, se v živila doda 5-15 % lešnika.

Živilski izdelki, ki ne vsebujejo lešnika, se naj ne bi proizvajali na isti liniji, kot izdelki z lešniki, saj lahko pride do navzkrižne kontaminacije. Sledovi teh alergenov v izdelkih, ki naj ne bi vsebovali alergenov, lahko vodijo k hudim alergijskim reakcijam. Vsi živilski obrati nimajo na voljo različnih linij za proizvodnjo, zato je zelo pomembno, da se izvaja redna kontrola proizvodnih postopkov in ustrezna sanitacija. V živilski industriji so metode za odkrivanje alergenov in sledov alergenov ključnega pomena (Koppelman, 2006).

2.3 LEŠNIK

2.3.1 Splošne lastnosti lešnika

Lesko uvrščamo v družino brezovk (*Betulaceae*) in rod *Corylus*. Ta rod zajema več vrst, nekatere med njimi so tudi okrasne. Najbolj razširjena sorta v srednji Italiji je *Tonda gentile romana*. Plod leske imenujemo lešnik in je po botanični klasifikaciji orešček, zaprt v ovoju (Sancin, 1988). Lešnik (*Corylus avellana* L.) je zelo priljubljeno suho sadje, ki se uporablja v različnih oblikah in kombinacijah (Olivera in sod., 2008). Lešniki imajo pomembno mesto med vrstami suhih oreškov glede prehranskih in zdravstvenih učinkov, saj vsebujejo vse elemente za obnovo človeškega telesa. Nedavne raziskave so pokazale, da so lešniki bogat vir fenolnih antioksidantov in da dodatek lešnikov lahko zmanjša tveganje za bolezni srca in vpliva na zniževanje holesterola v krvi (Alasalvar in sod., 2006). Zaradi posebno bogate sestave maščob, beljakovin, ogljikovih hidratov, vitaminov, mineralov (kalija, kalcija, fosforja, magnezija, železa, selen, stroncija, bora, molibdena), prehranskih vlaknin,

fitosterolov (beta-cytosterol) in antioksidantov, fenolov so lešniki izredno cenjeno živilo (Monagas in sod., 2009).

Največji delež snovi v lešniku predstavljajo maščobe (56,3 % do 61,5 %), zaradi česar je lešnik dober vir energije (2717-2834 J/100 g). Med maščobnimi kislinami prevladujejo oleinska, linolna, palmitinska in stearinska. Prevladujoč vitamin v lešniku, je vitamin E, ki je močan antioksidant. Antioksidanti lahko igrajo pomembno vlogo pri preprečevanju bolezni srca in ožilja, ateroskleroze, diabetesa ter raka (Olivera in sod., 2008).

2.3.2 Lešnik kot alergen

Kljub veliko pozitivnim značilnostim lešnika, je treba veliko pozornosti nameniti temu, da je lešnik alergeno živilo. Alergijske reakcije na lešnik so v razponu od ustnega sindroma alergije do hude anafilaktične reakcije. Zaradi alergenih proteinov, ki jih kodirajo alergeni geni lahko zaužitje lešnika, predstavlja veliko nevarnost za posameznike, ki so nagnjeni k močnim preobčutljivostim odzivom. Znano je bilo, da velika vsebnost beljakovin oziroma alergenih snovi v matici jedra lešnika lahko izzove anafilaktični šok (Pastorello in sod., 2002).

Bolniki, ki so alergični na lešnike, so ponavadi alergični tudi na pelod breze. Antigeni navzkrižno reagirajo z IgE bolnikov, ki so občutljivi za homologne alergene cvetnega prahu breze. Z lešnikovim alergenom navzkrižno reagirajo tudi beljakovine cvetnega prahu in proteini semen različnih vrst rastlin.

Alergeni v lešniku so (Fielder in sod., 2010; Allergome, 2011):

- Cor a 1, ki je patogenezo povezan, PR-10 (Bet 1 homologno),
- Cor a 2, ki je najpogostejši alergen in spada med profiline (ang. profilins),
- Cor a 8, je nespecifični 1 proteinski prenašalec (PR-14, LPT), spada v prolaminsko naddružino,
- Cor a 9, ki spada med 11S globuline in je semenski skladiščeni protein, podoben leguminu in v kupinsko naddružino,
- Cor a 10, ki je luminalno vezan protein, ni prehranski alergen, pripada družini heat shock protein Hsp70,
- Cor a 11, semensko skladiščni protein in spada med 7S vicilinske globuline (družina vicilinov (ang. vicillins), pripada kupinski naddružini,
- Cor a 12 in Cor a 13, ki spadata med oleosine, velika sta 17 kDa (Cor a 12) in 14-16 kDa (Cor a 13) in
- Cor a 14, ki spada med 2S albumine in v prolaminsko naddružino.

Protein Hsp 1 (ang. heat shock protein) je protein toplotnega šoka z nizko molekularno maso, in spada v razred funkcionalnih proteinov. Kodira ga gen *Hsp 1*. Proteine toplotnega šoka so poimenovali po njihovi molekularni masi. Najbolj raziskani so proteini z molekularno maso 60, 70, 90 kDa. V družino Hsp70 spada alergen lešnika, Cor a 10, ki pa ni prehranski alergen. Cor a 10 poimenovan tudi kot protein cvetnega prahu lešnika oziroma leske. Tako so Gruehn in sod. (2003) raziskovali fiziološko funkcijo alergenov iz cvetnega prahu leske (70 kDa, luminalno povezan) in navzkrižno reakcijo proteinov lešnika. Ugotovili so, da ti proteini cvetnega prahu navzkrižno reagirajo s homologom alergenega lešnika. Proteini, ki spadajo v družino Hsp70 so po novem ocenjeni kot novi potencialni alergeni (Gruehn in sod., 2003).

2.4 UČINKI OBDELAVE ŽIVILA NA STABILNOST ALERGENA

2.4.1 Toplotna obdelava

Toplotna obdelava živil se pogosto uporablja pri predelavi živil za boljši vonj in okus, kakor tudi za podaljšanje roka trajnosti (pasterizacija, sterilizacija). Znani postopki toplotne obdelave za oreščke in semena so sušenje pri primerni temperaturi, praženje pri 140-170 °C, cvrtje pri približno 180 °C in kasnejši postopki v pripravi končnega izdelka (npr. pečenje piškotov).

Glavna toplotna obdelava lešnikov je praženje, pri katerem se spremenijo okus, tekstura, barva in izgled lešnika. Obdelani lešniki imajo intenzivnejši okus, za 1,5 % se jim zmanjša vsebnost vlage, testa odpade in plodovi potemijo. S praženjem se odstranijo nezaželeni mikroorganizmi, kontaminanti in inaktivirajo se encimi. Vse spremembe so odvisne od razmer praženja od časa in od temperature (Ozdemir in sod., 2001).

Rezultati proučevanja vplivov praženja na lešnikova jedrca so pokazali, da toplotna obdelava lešnikov povzroči spremembe v kemični sestavi lešnika (vrednost peroksidov, aminokislin, maščobnih kislin, ogljikovih hidratov). Praženi lešniki tekom toplotne obdelave izgubijo na hranilni vrednosti. Pri praženju je pomembno, da temperatura ne preseže 145 °C, saj se je le tako mogoče izogniti oksidaciji. Pri obdelavi lešnikov nad temperaturo 120 °C se za več kot 50 % zniža vrednost tiamina (Ozdemir in sod., 2001). Proučevanje sprememb, ki nastanejo s praženjem je velikega pomena, saj je okoli 90 % svetovne proizvodnje lešnikov namenjenih predelavi. Obdelava je namenjena izboljšanju okusa, vonja ali podaljšanju roka trajnosti (Cristofori in sod., 2008).

Glavni alergeni v lešniku so po raziskavi Wigotzija in sod. (2000) zelo toplotno stabilni. Mlete lešnike so najprej izpostavili suhi toploti v pečici (90 min pri 100 °C), čemur je sledila še toplotna obdelava v mikrovalovni pečici (630 W, 10 min). Z encimsko-imunsko analizo so dokazali, da takšna toplotna obdelava ni imela nobenega vpliva na zmanjšanje vezave proteina na protitelesa (IgE). Po toplotni obdelavi lešnikov nad 100 °C, so opazili nekatere spremembe v zmanjšanju vezave proteina na protitelesa (IgE), prav tako je bilo tudi mogoče po 15 minutni toplotni obdelavi pri temperaturi nad 185 °C določiti alergen (>14 kDa), (Wigotzki in sod., 2000). Wensing in sod. (2002) so dokazali, da je meja detekcije praženih lešnikov kot povzročiteljev alergije občutno višja, kakor za surove lešnike, kar nakazuje toplotno nestabilnost lešnikovih alergenov. Raziskavo o praženih in surovih lešnikih so nato opravili tudi Hansen in sod. (2003). Njihovi rezultati kažejo, da praženi lešniki izzovejo manj alergenih reakcij v primerjavi z surovim.

Za večino alergenega lupinastega sadja vpliv toplotne obdelave na alergenost ni dokazan. Trdimo lahko, da bo večina posameznikov, alergičnih na lupinasto sadje, z zaužitjem toplotno obdelanega lupinastega sadja, prav tako podvržena alergijski reakciji. Toplotna obdelava hrane, torej ne zmanjša možnosti alergijskih reakcij (Koppelman, 2006).

2.4.2 Fermentacija

Podatkov o vplivih fermentacije na prehranske alergene je zelo malo. Sojina omaka je fermentiran proizvod, ki vsebuje pšenico in sojo. Nedavna raziskava je pokazala, da je soja prav tako prisotna v končnem izdelku in da fermentacija soje ne zmanjša možnosti alergijskih reakcij (Ehn in sod., 2004). Sathe in sod. (2005) so izvedli raziskavo o vplivu fermentacije na mlečne izdelke. Med sabo so primerjali fermentirane mlečne izdelke (jogurt, kislo mleko) z nefermentiranimi (mleko). Imunske reakcije, ocenjene z zaviralnimi testi β -laktoglobulina so se verjetno zaradi denaturacije proteinov občutno zmanjšale v nekaterih fermentiranih izdelkih (kislo mleko).

2.4.3 Proteoliza

Sen in sod. (2002) so dokazovali vlogo proteinske strukture z disulfidnimi vezmi. Izpostavili so proteolitično stabilnost alergena Ara h 2, glavnega alergena v arašidih. Proučevali so, ali je po denaturaciji encima ta protein še vedno alergen. Encim so denaturirali z dodatkom pepsina, tripsina in s hidrolizo. Odkrili so, da se kljub denaturaciji encima na protein še vedno vežejo protitelesa (IgE) in tako povzročijo alergijo. Z denaturacijo proteina se alergenost proteina ne uniči ali zmanjša (Sathe in sod., 2005).

2.4.4 Ultrafiltracija

Alergeni breskovega soka so zelo stabilni pri temperaturi 121 °C (10 do 30 min). Le z uporabo ultrafiltracije je bilo mogoče doseči hipoalergenost breskovega soka. Hipoalergenost pomeni, da je možnost za pojav alergije zmanjšana. Ultrafiltracija ima negativni vpliv na senzorične lastnosti soka (Sathe in sod., 2005).

2.4.5 Skladiščenje

Živila rastlinskega izvora so velikokrat pred nadaljnjo predelavo ali porabo skladiščena. Jabolkom, ki so bila shranjena 130 dni pri 4 °C, se je nivo alergenov povečal. Povišana vsebnost alergenov in s tem sinteza proteinov PR (ang. Pathogenesis-related), je lahko posledica zorenja in okoljskega stresa. Shranjevanje v modificirani atmosferi, zmanjša vsebnost alergenov, saj se prepreči nadaljnje zorenje. Z laboratorijskim eksperimentom je bilo ugotovljeno, da se je nivo alergenov v jabolkah, kot sta Mal d 1 in Mal d 3, zmanjšal po shranjevanju v modificirani atmosferi 4 do 5 mesecev (Mills in sod., 2004).

2.4.6 Uporaba drugih postopkov

Postopki, kot so segrevanje med lupljenjem, blanširanje, mečkanje, tlačenje in pasterizacija niso bistveno zmanjšali stabilnosti glavnih alergenih proteinov manga *Mangifera indica* 1 (Man i 1) in *Mangifera indica* 2 (Man i 2) (Sathe in sod., 2005). Sathe in sod. (2005) so preučevali stabilnosti alergenih proteinov v mandljih, indijskih oreščkih in orehih. Oreški so bili podvrženi različnim predelovalnim postopkom, vključno s kuhanjem pod pritiskom, pečenjem, cvrenjem in mikrovalovno obdelavo. Ugotovili so, da so alergeni lupinastega sadja stabilni, saj nobena obdelava ni vplivala na delovanje alergenega proteina.

2.5 PCR

Verižna reakcija s polimerazo (PCR, angl. Polymerase chain reaction) je novejša metoda v molekularni biologiji, ki omogoča pomnožitev enega ali več delov tarče molekularne DNK, označene s specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki, v razmerah *in vitro* s pomočjo termostabilnega encima DNK-polimeraza. PCR se lahko uporablja tudi za odkrivanje določene vrste DNK molekule rastlinskega in živalskega izvora (Kuchta in sod., 2006).

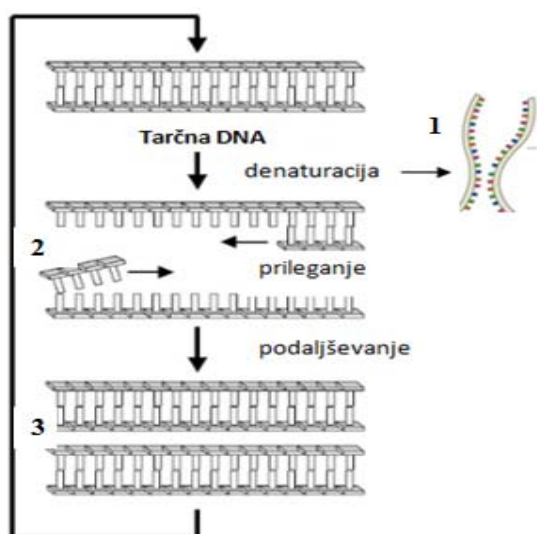
Reakcijska mešanica za PCR vsebuje naslednje sestavine: tarčno dvovijačno DNK, dva oligonukleotidna začetnika, encim DNK-polimeraza, deoksinukleotidtrifosfate vseh štirih baz (dNTP: dNTA, dNTT, dNTG, dNTC), pufer z optimalnim pH in ionsko jakostjo, kjer je najpomembnejša koncentracija ionov Mg^{2+} , saj vpliva na encimsko aktivnost in natančnost (Kuchta in sod., 2006).

Stopnje, ki so vključene v preiskavo vzorca s PCR:

- priprava DNA,
- priprava in izvedba PCR,
- ugotavljanje pomnožkov

Princip same reakcije je *in vitro* pomnoževanje tarčne DNK z DNK-polimerazo v cikličnem termostatu. Za reakcijo potrebujemo zelo majhno količino nukleinske kisline. Termostabilna DNK-polimeraza je encim, ki so ga izolirali iz termofilnih bakterij vrste *Thermus aquaticus*. Encim ima optimalno temperaturo 65-72 °C in ohranja svojo aktivnost, tudi če je krajši čas na višjih temperaturah, ki so potrebne za denaturacijo dvoverižne DNK. Poseben termostat zagotavlja zvezno spreminjanje temperature v ciklu, ki zajema 3 faze (slika 3):

- 1 faza: denaturacija dvovijačne molekule DNK/ razdvajanje dvoverižne DNK (pri $T > 94-95$ °C, 10-30 s)
- 2 faza: prileganje specifičnih oligonukleotidnih začetnikov (37-72 °C, 5-10 s)
- 3 faza: podaljševanje s termotolerantno DNK-polimerazo (60-72 °C, 10-60 s) (Kuchta in sod., 2006)



Slika 3: Princip reakcije PCR (Greiner in Konietzny, 2007).

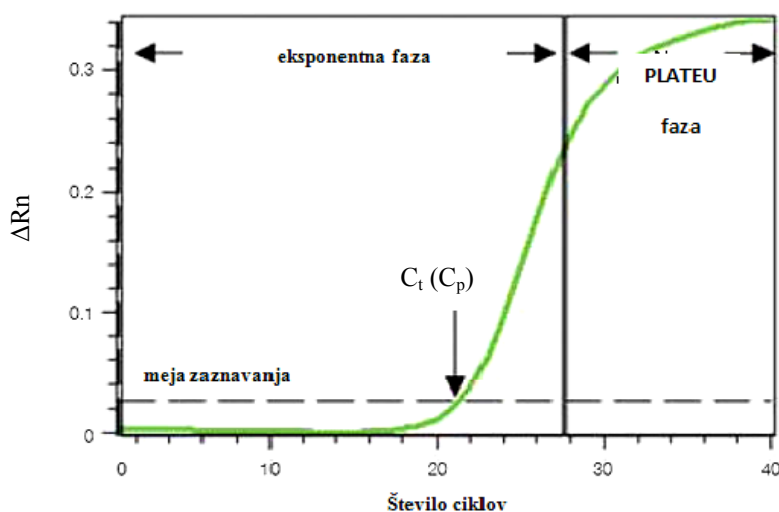
V vsakem ciklu se število tarčnih kopij podvoji. S 25-35 ponovitvami cikla se koncentracija pomnoženega dela DNK eksponentno pomnoži tudi do 10^9 kopij. Izbira oligonukleotidnih začetnikov je odvisna od vrste PCR in vrste preiskovane tarčne DNK. Zaporedja baz A, T, G, C v oligonukleotidnih začetnikih so komplementarna delu tarčne DNK in največkrat so pri PCR, ki služi identifikaciji določenega gena oziroma organizma, izbrana iz znanih podatkov o nukleotidnih zaporedjih specifičnih genov. Pomnoži se del tarčne DNK med izbranimi oligonukleotidnimi začetnikoma. Število pomnožkov, katerih velikost je določena z razdaljo med oligonukleotidnimi začetnikoma, se podvoji v vsakem ciklu.

Pomnožke najenostavneje in najhitreje ugotovimo z agarozno gelsko elektroforezo, barvanjem gela z etidijevim bromidom ter pregleda in dokumentiranja gela pod UV lučjo. Njihovo velikost primerjamo z molekularnim označevalcem z znanimi velikostmi fragmentov (Čadež in Štorman, 2004). S to metodo je možno zaznati zelo nizko koncentracijo DNK (1-5 ng) (Sambrook, 1989). Običajno se pomnožuje fragmente manjše kot 2000 baznih parov, za daljše fragmente pa obstajajo optimizirani postopki z drugačno sestavo pufra in daljšimi časi posameznih faz. Glede na rezultate prvega pomnoževanja je pogosto potrebno optimizirati postopek: spreminjanje temperature, uporaba alternativnih polimeraz, dodatki v reakciji, načrtovanje novih oligonukleotidov. Glavna prednost uporabe PCR temelji na hitrem, zelo občutljivem in visoko selektivnem ugotavljanju določenega dela DNK, ki ga je možno določiti tudi, če so prisotne v istem vzorcu večje količine drugih molekul DNK (Piknova in sod., 2007).

2.5.1 PCR v realnem času

PCR v realnem času je izboljšava klasičnega PCR in je ena najmočnejših tehnologij v molekularni biologiji. Specifični del DNK lahko pomnožimo z DNK-polimerazo in specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki (Applied Biosystem, 2004). Reakcija poteka v cikličnem termostatu, kjer se temperatura zvezno spreminja v ponavljajočih se ciklih kot pri klasičnem PCR, le da je vsak cikel sestavljen iz dveh stopenj (1. stopnja: denaturacija dvoverižne DNK pri $T > 90\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2. Stopnja: prileganje oligonukleotidnih začetnikov in sonde pri temperaturi $50 - 60\text{ }^{\circ}\text{C}$, ter podaljševanje DNK s termostabilnim encimom DNK-polimeraza (Mackay, 2004). Vrednotenje produkta (nastalih pomnožkov), temelji na merjenju fluorescence med samim pomnoževanjem v eksponentni fazi, ko je pomnoževanje še učinkovito (Applied Biosystem, 2004).

Zaradi proporcionalnega razmerja med fluorescentnim signalom in količino nastalega produkta je mogoče posneti krivuljo pomnoževanja (Holzhauser in sod., 2006). Pomnoževanje in dokazovanje pomnožkov poteka sočasno. Krivulja pomnoževanja je grafični prikaz fluorescentnega signala v odvisnosti od števila ciklov PCR. Osnovna linija prikazuje začetne cikle, kjer se fluorescentni signal skoraj ne spreminja (Mackay, 2004). Osnovna linija temelji na ciklu meje zaznavnosti, ki ga imenujemo vrednost C_t oziroma presečišče C_p (ang. crossing point). To je točka, kjer se krivulja fluorescence povzpne nad fluorescenco ozadja. Ko je pomnožka dovolj, v linearni fazi pomnoževanja tarčne DNK, začne fluorescenca eksponentno naraščati (slika 4) (Holzhauser in sod., 2006). Meja zanašanja je linija, ki seka krivuljo fluorescence na točki C_t (Applied Biosystem, 2004).



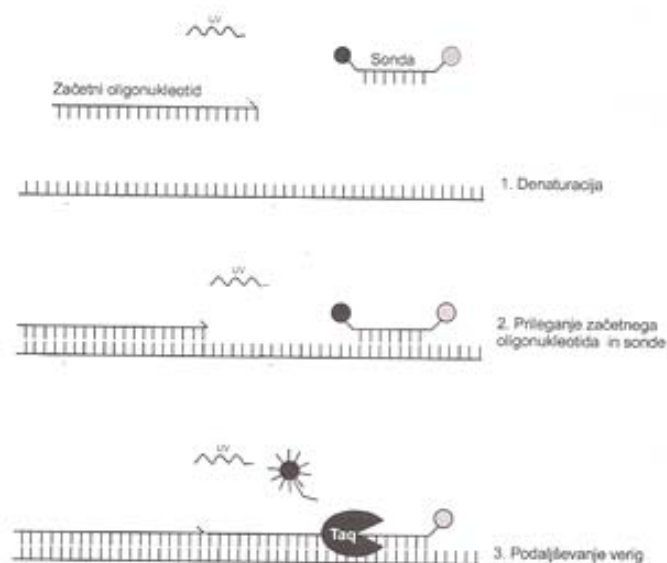
Slika 4: Krivulja pomnoževanja PCR v realnem času (BioRad, 2006)

Legenda: ΔRn - normaliziran fluorescentni signal, C_t - cikel meje določljivosti, C_p - presečišče krivulje fluorescence z osnovno linijo

V vsakem ciklu imamo teoretično dvakrat več produkta kot v predhodnem ciklu. To velja kadar je učinkovitost reakcije 100 %. Med zadnjo fazo, fazo plato, fluorescenca doseže zgornjo najvišjo vrednost. Reaktantov v zadnji fazi začne primanjkovati in podvajanje ni več učinkovito. Količina produkta ni več proporcionalna začetni količini DNK. Eksponentni fazi tako sledi faza plato (Holzhauser in sod., 2006). V idealnih razmerah se v eksponentni fazi pomnoževanja količina pomnožka povečuje za 1 $\log_{10}$ enoto vsakih 3,32 ciklov (Mackay, 2004). Za določitev količine pomnožkov v neznanem vzorcu se primerja vrednost C_t preiskovanega vzorca z vrednostjo C_t iz umeritvene krivulje standardnih vzorcev (Holzhauser in sod., 2006). Količina pomnožkov je sorazmerna začetni količini DNK, zato PCR omogoča kvantifikacijo. V primeru nadaljnje kvantitativne analize za določitve sledov alergenov v sestavljenih živilih, je tako bistvenega pomena razpoložljivost referenčnih materialov, kakor tudi vpliv matriksa in učinka obdelave. Metoda PCR v realnem času tako omogoča podvojevanje DNK in detekcijo pomnoženih produktov, zato za detekcijo produkta gelska elektroforeza ni več potrebna (Holzhauser in sod., 2006).

2.5.1.1 Specifične metode določanja pomnožkov

Specifičnost nastalih pomnožkov, lahko odkrivamo z oligonukleotidnimi sondami, ki so označene s fluorofori. Oligonukleotidna sonda se veže na odsek tarčne DNK med obema oligonukleotidnima začetnikoma. Na razpolago je več načinov odkrivanja pomnožkov, kadar so v uporabi označene sonde ali oligonukleotidni začetniki. Oligonukleotidni začetniki imajo nižjo temperaturo taljenja, kot oligonukleotidne sonde. Zaradi višje temperature taljenja se oligonukleotidne sonde vežejo na tarčno DNK pred oligonukleotidnimi začetniki. Najpogosteje se za specifično pomnoževanje DNK fragmentov uporablja Taq-Man-sonda (slika 5) (Fraga in sod., 2008).



Slika 5: Shematski prikaz principa PCR v realnem času s Taq-Man sondo (Shipley, 2006).

Taq-Man sonde temeljijo na procesu FRET (fluorescentni resonančni prenos energije). To je spektroskopski proces, kjer se prenaša energija med molekulami, ki so oddaljene za 10-100 Å in imajo prekrivajoče se emisijske in adsorpcijske spektre. Prenos energije poteka od zaviralnega k reporterskemu fluorogenu, ki oddaja energijo pogosteje v obliki toplote, kot fluorescence (Mackay, 2004). Sonda je na 5' koncu označena z reporterskim fluorogenom, ki je ponavadi 6-karboksi-fluorescein (6-FAM), na 3' koncu pa se nahaja zaviralni fluorogen, ki pa je največkrat 6-karboksi-tatrametil-rodamin (TAMRA). V intaktnem stanju sonda ne fluorescira (Mackay in sod., 2007). DNK-polimeraza med podaljševanjem verige DNK odcepi zaviralni fluorogen (Q) od reporterskega (R), ki zato začne fluorescirati (Fraga in sod., 2008).

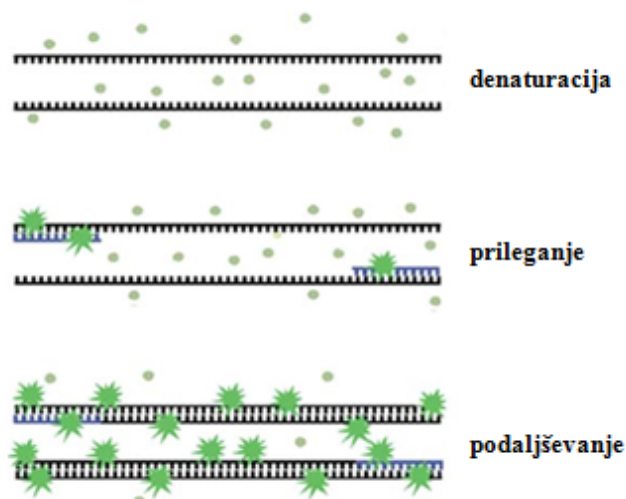
Za metode, ki temeljijo na hibridizaciji sonde, je značilno, oziroma manj mogoče, da bodo dale lažno pozitivne rezultate, kot nespecifične metode. Hibridizacija in hidroliza sonde ne dajeta lažno pozitivnih rezultatov, saj se fluorescentni signal povečuje samo, če se pomnožuje tarčna sekvenca. Pomembna lastnost sistemov s sondami je, da so primerni za multipli PCR zaradi razpoložljivosti fluoroforov z različnimi emisijskimi spektri (Saunders, 2004).

2.5.1.2 Nespecifične metode določanja pomnožkov

Za nespecifično določanje pomnožkov uporabljamo fluorescentna barvila, ki se vgradijo v dvoverižno molekulo DNK. Dober primer je barvilo SYBRGreen, ki je nadomestilo za etidijev bromid, ki se lahko uporablja pri klasičnem PCR, kjer pomnožke določimo z agarozno elektroforezo.

Ko se barvilo SYBRGreen veže v dvojno vijačnico DNK, se intenziteta fluorescence poveča proporcionalno s količino novonastalega dvoverižnega DNK produkta (Applied Biosystem, 2004). Vezava barvila SYBRGreen v dvojno vijačnico DNK v PCR realnem času povzroči, da se jakost fluorescence poveča od 100 do 200 krat (Fraga in sod., 2008). Torej, čim več je pomnožkov, več barvila se veže nanje in večja je intenziteta fluorescence. Za potek encimske reakcije je potrebno imeti le dva oligonukleotidna začetnika, kakor tudi pri klasičnem PCR (Saunders, 2004). Ker se lahko barvilo SYBRGreen veže tudi na nespecifične dvoverižne

DNK, moramo možnost lažno pozitivnih rezultatov preveriti z analizo krivulje taljenja nastalih pomnožkov, kar nam omogoča dodatna faza disociacije pomnožkov na koncu pomnoževanja (Applied Biosystem, 2004). Nespecifične metode so v primerjavi s specifičnimi metodami cenejše. Za vzpostavitev protokolov nespecifične metode ne zahtevajo toliko specifičnega znanja o molekulah DNK (Saundres, 2004).



Slika 6: Princip vezave barvila SYBR Green I v dvojno vijačnico DNK (Fraga in sod., 2008).

2.5.2 Kvantitativni PCR v realnem času

Kvantitativni PCR v realnem času (qPCR) je analiza, kjer se meri količina tarčne molekule nukleinske kisline, oziroma količina pomnožka DNK. Pridobljeni podatki s PCR v realnem času so lahko ovrednoteni s kvantifikacijo, ki je lahko absolutna ali relativna (Applied Biosystem, 2004). Tako pri uporabi absolutne, kot relativne kvantifikacije je zelo pomembna učinkovitost pomnoževanja. V idealnih razmerah je učinkovitost pomnoževanja 100 %, kar pomeni, da z vsakim ciklom dobimo dvakrat več produkta. Pogosto je učinkovitost pomnoževanja manjša, kar lahko privede do napak pri obdelavi podatkov, če tega dejstva ne upoštevamo. Natančna kvantifikacija je odvisna od različnih dejavnikov, kot so učinek predelave na živila, razpad molekule DNK, količina vzorca, uporabljena metoda in referenčni materiali (Diaz-Amigo in Popping, 2010).

Absolutna kvantifikacija je proces, ki določa absolutno (točno določeno) količino tarčne DNK v neznanem vzorcu in s tem omogoča primerjanje rezultatov različnih metod. Pri tem načinu analize kvantificiramo gen iz vzorca s pomočjo standardne krivulje. To pridobimo s serijskim redčenjem standarda znane koncentracije. Standardna krivulja odraža linearno razmerje med vrednostmi C_t in logaritmskimi vrednostmi količin standardne DNK in omogoča določitev koncentracij neznane DNK v vzorcu na podlagi njene vrednosti C_t . Metoda predvideva, da sta učinkovitosti pomnoževanja v vzorcu in standardu enaki. Pomembno je tudi, da koncentracija vzorčne DNK leži znotraj območja koncentracij, ki ga zajamemo z razredčitvami standarda in da je v območju, ki ga lahko zanesljivo kvantificiramo. V primerjavi z relativno kvantifikacijo je absolutna zahtevnejša, prav tako pa omogoča določitev točnega števila kopij tarčne DNK v vzorcu in s tem omogoča primerjanje rezultatov različnih metod in različnih laboratorijev (Mackay in sod., 2007).

Pri relativni kvantifikaciji določamo spremembe v količini tarčne DNK. Količino tarčne DNK primerjamo s količino te sekvence v sorodnem ali istem materialu tako, da primerjamo signal tarčne sekvence s signalom notranje ali druge referenčne kontrole. Prednost metode je, da ne potrebujemo absolutne standardne krivulje ampak rezultate izračunamo z matematičnimi enačbami iz vrednosti C_t in učinkovitosti pomnoževanja. Uporablja se predvsem za ugotavljanje sprememb izražanja genov v vzorcu na podlagi primerjave z referenčnim standardom. Ta kvantifikacija je postala cilj večini analiz s PCR v realnem času (Mackay, 2004).

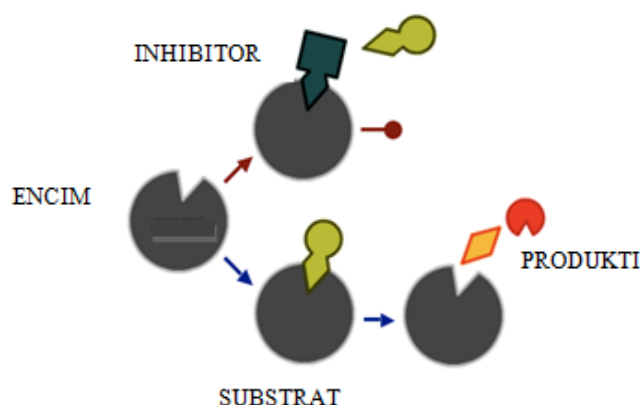
Pravilna izbira in dobra kvaliteta kontrol pogojujeta zanesljivost kvantifikacije. Kontrola PCR je omogočena z notranjo kontrolo. Notranja kontrola omogoča kontrolo poteka PCR. Uporablja se za določanje in odkrivanje lažno negativnih rezultatov. Za kvantifikacijo se uporabljajo predvsem standardi, med katerimi ločimo zunanjo kontrolo in notranji standard. Zunanjo kontrolo predstavljajo čisti, klonirani pomnožek ali del tarčnega genoma, ki se pomnožuje v isti reakciji, vendar v ločenih epruvetah za PCR. Iz standardnih vzorcev pripravimo umeritveno krivuljo, v katerih so decimalne razredčitve zunanje kontrole. Iz umeritvene krivulje lahko razberemo koncentracijo neznane DNK in določimo mejo detekcije. Iz standardnih vzorcev pripravimo krivuljo, v katerih so decimalne razredčitve zunanje kontrole (Mackay, 2004).

2.5.3 Inhibitorji PCR

Znano je, da mnoge komponente rastlinskih in živalskih tkiv, upočasnjujejo ali celo inhibirajo pomnoževanje DNK s PCR. Inhibitorji povzročijo lizo celice, razgradnjo nukleinske kisline, inaktivirajo termostabilno DNK-polimerazo ali spremenijo razmere PCR. Pojavijo se lahko lažno negativni rezultati, nepravilna kvantifikacija in zmanjšana je občutljivost. Pomnoževanje DNK s PCR je lahko upočasnjeno tudi zaradi neustreznih razmer pomnoževanja (na primer nepravilni temperaturni režim, neustrezna koncentracija ionov Mg^{2+}). Najpogostejši zaviralci pomnoževanja DNK so železo, hemoglobin, kolagen, polisaharidi, kalcijevi ioni, proteaze, olja, maščoba, polifenoli in težke kovine (Diaz-Amigo in Popping, 2010). Največkrat se v vzorcu nahajajo polifenoli in proteaze, ki reakcijo upočasnijo, ali jo celo inhibirajo (Holzhauser, 2006). Ugotavljanje vpliva inhibitorjev na potek PCR se izvaja z dodatkom standardnih kontrol. Ena izmed možnosti preverjanja PCR inhibitorjev v realnem času je serijska razredčitev vzorca. Za nemoten potek pomnoževanja DNK je pomembno, da se inhibitorji odstranijo iz preiskovanega vzorca.

Razvitih je bilo več metod za odstranitev inhibitorjev iz vzorca. Metodi, kot sta centrifugiranje vzorca in dializa sta zelo preprosti metodi, vendar se z uporabo teh metod izgubi prvotni volumen vzorca. Nekatere bolj zahtevne metode, kot je imunomagnetna separacija, se uporabljajo za čiščenje točno določenega onesnaževalca oziroma inhibitorja, vendar je metoda zelo draga (Moreira, 1998). Najpogosteje uporabljena molekularna metoda je izolacija in čiščenje DNK. Ta metoda zagotavlja učinkovito pridobivanje nukleinske kisline in odstranitev komponent, ki zavirajo PCR. Zaviralni učinek inhibitorjev se lahko zmanjša z optimizacijo reakcijskih razmer (Diaz-Amigo in Popping, 2010).

Pogosto so v vzorcu prisotni inhibitorji PCR (polisaharidi), ki jih z klasičnimi metodami izolacije in čiščenja ne moremo popolnoma odstraniti. Ti kontaminanti ostanejo v vzorcu in so prisotni v končnih DNK pripravkih (Holzhauser, 2006). Na sliki 7 je prikazana vezava inhibitorja na aktivno mesto DNK-polimeraze. Encim se je kompetitivno vezal na aktivno mesto. Z vezavo inhibitorja na aktivno mesto, se pomnoževanje PCR ustavi.



Slika 7: Vezava inhibitorja na aktivno mesto DNK-polimeraze (Vickers, 2010)

2.5.4 Vpliv izolacije DNK na PCR

Za doseganje primerne specifičnosti in občutljivosti PCR je način izolacije DNK velikega pomena. Priprava čim bolj čiste DNK je nujna za visoko specifičnost in občutljivost PCR v realnem času (Holzhauser, 2006). Pogosta metoda ekstrakcije DNK za PCR je uporaba metode CTAB (cetiltrimetilamonijev bromid) ali uporaba metode GTC (gvanin tiocianat) in kasnejše čiščenje izolirane DNK s komercialno dostopnimi silikatnimi kolonami, ki so optimizirane za analizo predelanih živil (Holzhauser, 2006).

Pinto in sod. (2007) so primerjali dva komercialna kompleta za izolacijo DNK. Določili so učinkovitosti izolacije, čistost molekul DNK in občutljivosti na 12 različnih izdelkih. Uporabljena kompleta za izolacijo DNK sta bila Wizard Magnetic DNK Purification for Food (Promega) in DNeasy Tissue Kit (QIAGEN). Koncentracijo in čistost so izmerili spektrofotometrično, nato pa vzorce analizirali s PCR. Za pozitivno kontrolo so uporabili DNK iz referenčnega materiala IRMM-411R-4 2 % Bt-176 koruze (Fluka, Geel, Belgija), konja in krave (BIOTOOLS B&M Labs, Madrid, Španija). S kompletom DNeasy, so izolirali DNK vzorcev (Bt-176 koruza, koruzna moka, krma za perutnino, olje, čokoladna krema, češnjeva marmelada, krompirejv cmok, čokolada, konjsko meso, pasterizirano mleko, otrobi). Koncentracijo izolirane DNK posameznega vzorca so izmerili spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri A_{260} nm. Iz razmerja absorbanc $A_{260/280}$ nm so izračunali še čistost izolirane DNK vzorca. Za določitev ustreznosti obeh komercialnih kompletov za izolacijo DNK iz vzorcev živil, so uporabili PCR. PCR s 4 μ L nerazredčenega vzorca koruznega olja je pokazala pozitiven rezultat, negativen rezultat je bil samo pri čokoladni kremi. Vrednost absorbance pri A_{260} in $A_{260/280}$ nm je pokazala uspešno in večjo učinkovitost izolacije DNK z uporabo komercialnega kompleta DNeasy pri obdelanih živilih, kot so krompirjevi cmoki, čokoladno pecivo, rastlinski jušni koncentрати in češnjeva marmelada. Rezultati PCR dobljeni z DNK izolirano iz vzorcev s kompletom Wizard so pokazali negativen rezultat pri vzorcih koruznega olja, čokolade, čokoladnega peciva, krompirjevih cmokih in konjskega mesa. Analiza DNK rastlinskih vzorcev (GMO koruza, koruzna moka, perutninska krma in otrobi) s PCR je pokazala pozitivne rezultate. Meje detekcije oziroma zaznave so bile med 0,5 ng/ μ L do 2,5 pg/ μ L. Izolacija DNK konjskega mesa in pasteriziranega mleka s kompletom Wizard ni bila uspešna, saj je bila izolirana koncentracija DNK nizka. Primerjava teh dveh metod izolacije DNK je pokazala, da je komplet Wizard bolj primeren in učinkovit za izolacijo rastlinskih matrikov, ki vsebujejo polifenole in polisaharide. Komplet DNeasy je pokazal

večjo učinkovitost pri kompleksnih in obdelanih živilih (češnjeva marmelada, cmoki, čokoladno pecivo, rastlinski jušni koncentraciji). Ta metoda izolacije je verjetno bolj učinkovita in občutljiva, zaradi lažje odstranitve inhibitorjev in boljše vezave DNK na silikatno kolono (Pinto in sod., 2007).

Arlorio in sod. (2007) so primerjali učinkovitost izolacije DNK lešnika s klasično metodo in tremi kompleti za izolacijo DNK: metoda po protokolu CTAB fenol / kloroform / izoamilni alkohol (25:24:1) in kompleti za izolacijo DNK: Gene Elute Plant genomic DNK (Sigma); Ultraclean Plant DNK (Cabru) in Wizard Magnetic DNK purification system for food (Promega). Spektrofotometrično pridobljeni rezultati so pokazali največjo učinkovitost izolacije DNK lešnika iz vzorcev z uporabo kompleta Wizard. Ta metoda je bila oblikovana za izolacijo in pridobivanje visoko kvalitetne in čiste DNK iz maščobnih živil. Ker olja in maščobe veljajo za znane inhibitorje PCR, je uporaba kompleta Wizard bila najboljša izbira (Arlorio in sod., 2007). Podobno učinkovitost izolacije so določili z uporabo izolacijskega kompleta SureFood PREP Allergen (Congen, R-Biopharm). Izolirali so DNK iz vzorcev ki so vsebovali čokolado, lecitin in piškote za določitev lešnika s PCR (Diaz-Amigo in Popping, 2010).

Bettazi in sod. (2008) so za izolacijo lešnika iz 15 različnih živil (piškoti in prigrizki) uporabili dva komercialna kompleta: Wizard: Magnetic Purification za živila (Promega) in SureFood PREP Allergene (Congen, r-Biopharm). Spektrofotometrično so izmerili absorbanco in ocenili prisotnosti inhibitorjev ter določili koncentracije DNK. Kompleksni vzorci živil, ki so vsebovali čokolado in lecitin, so bili učinkovito izolirani z obema metodama. Učinkovito izolacijo so dosegli s kompletom Congen, ki je lažji postopek izolacije kot Wizard, uporablja se manjše količine vzorcev in prav tako je poraba organskih topil tudi za bolj zahtevne kompleksne matrikse živil manjša, kot pri kompletu Wizard (Bettazi in sod., 2008). Spektrofotometrično določanje čistosti DNK živil ni primerna metoda, saj ne dobimo dovolj informacij, če so v vzorcu prisotni kakšni inhibitorji. Najboljša metoda za določitev koncentracije in čistosti molekule DNK, je uporaba agaroznega gela (Bettazi in sod., 2008; Diaz-Amigo in Popping, 2010).

Elsanhoty in sod. (2010) so primerjali šest različnih metod ekstrakcije DNK iz vzorcev surove koroze in njenih proizvodov. Uporabljene ekstrakcijske metode so bile: 1. ekstrakcija z CTAB (cetiltrimetilamonijev bromid), 2. komplet Qbiogene, 3. komplet (Roche diagnostika GmbH) za pridobitev DNK iz GSO, 4. komplet Nucleospin (Clontech) Genomski-Prep (Amersham Pharmacia Biotech), 5. komplet Plant interogen pure link™ (Invitrogen) za čiščenje DNK iz rastlin in 6. ekstrakcija rastlinske genomske DNK (Biotechnology limited). Ocenili so različne metode izolacije DNK koroze (surova), koruzne moko (mehanska obdelava), koruznega škroba, koroze v pločevinkah (sladka), pokovke (ekstrudiran izdelek), koruznih prigrizkov in koruznega kruha (mehanska in toplotna obdelava). Primerjali so kakovost in količino izolirane DNK vzorcev z znanimi navedenimi standardnimi odstotki GSO v živilih. Za kvalitativno odkrivanje GSO v živilih so uporabili testni komplet GMOScreen 35S/NOS. Ta testni komplet se uporablja za zaznavanje genskih sprememb v živilih. Z vsemi uporabljenimi metodami so pridobili kakovostno izolirano DNK. Ugotovili so, da je s kompletom Roche bila dobljena najčistejša DNK, kakor tudi, da je ta komplet najustrežnejši za pridobitev zelo čiste DNK vzorca koroze in njenih proizvodov. Dobljeni rezultati so pokazali, da je bilo 17 vzorcev pozitivnih na prisotnost promotorja 35S, 34 % od teh vzorcev je bilo pozitivnih na gensko spremenjeno linijo Bt-176 (Elsanhoty in sod., 2010).

Piknova in sod. (2007) so DNK vzorcev izolirali z dvema kompletoma za izolacijo in jih testirali s PCR v realnem času. Uporabili so DNeasy Plant Mini komplet (Qiagen, Hilden) in primarni komplet za izolacijo DNK vzorcev živil komplet NucleoSpin (Machery-Nagel, Duren, Nemčija). Kvantifikacija DNK je bila izvedena flourometrično z uporabo kompleta Quant-iT PicoGreen (Invitro-gen Molecular Probes). Boljši komplet za izolacijo DNK preiskovanih vzorcev je bil komplet Nucleospin (Piknova in sod., 2007).

2.5.5 Načini določanja koncentracije izolirane DNK

Obstaja več načinov merjenja količine oziroma koncentracije DNK.

Najpogostejše uporabljena metoda, je spektrofotometrično določevanje izolirane DNK. Odčitana vrednost DNK pozameznega vzorca, dobljena spektrofotometrično pri valovni dolžini 260 nm, 280 nm in 230 nm nam omogoča kvantitativno določitev DNK. Spektrofotometrično izmerjeni rezultati nam omogočajo izračun koncentracije nukleinske kisline v vzorcu. Rezultate je možno odčitati direktno v ng/ μ L, če vzorce redčimo z vodo ali pufrom v razmerju 1:20. V vodni raztopini imajo nukleinske kisline absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 260 nm. V vodni raztopini ima DNK maksimum absorbance pri 260 nm. Izmerjena absorbanca 1 ustreza približno vsebnost 50 μ g/ml za dvojno vijačnico DNA, 40 μ g/ml za enojno vijačnico DNK ali RNK in 20 μ g/ml za enoverižne nukleotide (Sambrook, 1989). Proteini imajo maksimum absorbance pri 280 nm. Čistost izolirane DNK ocenimo iz razmerja A_{260}/A_{280} nm. O čisti izolirani DNK lahko govorimo v primeru, če so izmerjene vrednosti v obsegu od 1,8 do 2,0. Prisotnost nečistoč, kot so proteini ali aromatične komponente (fenoli), lahko motijo meritev. Koncentracijo DNK vzorcev živil, ki vsebujejo nečistoče je tako težje izmeriti. Vrednosti razmerja $A_{260/280}$ so tako občutno nižje, zaradi maksimuma absorbance nečistoč v istem območju kot DNK (Sambrook, 1989).

Elektroforetske metode omogočajo merjenje koncentracije enostavnih in kompleksnih vzorcev DNK. Pri tem merjenju se uporabljata dve barvili: SYBRGreen I in etidijev bromid. SYBRGreen I je bolj občutljiv in varnejši kot etidijev bromid, vendar je SYBRGreen dražji (Ahn in sod., 1996). PicoGreen je zelo stabilno barvilo, zato omogoča daljši čas osvetlitve in s tem tudi večjo fleksibilnost analiz. To barvilo je uporabno za kvantifikacijo širokega spektra vzorcev DNK. Picogreen je fluorokrom, ki se selektivno veže v dvoverižno molekulo DNK. Povečanje fluorescence ob vezavi barvila je veliko, povišanje fluorescence ozadja pa malo, saj nevezano barvilo skoraj ne fluorescira (Ahn in sod., 1996).

2.6 DOLOČANJE LEŠNIKA KOT ALERGENA V ŽIVILIH S PCR

Za določanje alergenih substanc v živilih je nujno vpeljati metode, s katerimi zagotovimo kontrolo pravilno označenih živil in s tem zaščito ljudi, ki so alergični na določene sestavine v živilih. Večino teh sestavin je mogoče določiti imunokemijskimi metodami in z molekularno-biološkimi tehnikami. Z testom ELISA je mogoče specifično določiti snovi, ki so beljakovinskega izvora, s tehnikami PCR pa se določijo odseki DNK, ki so specifični za določeno vrsto rastlinskega ali živalskega izvora. Nekatere metode določanja lešnika kot alergena so razvidne iz preglednice 1.

Preglednica 1: Metode določanja lešnika kot alergena v živilih

METODA	TARČNI ALERGEN	VELIKOST pomnožka (bp)	MEJA ZAZNAVE	TESTIRANA ŽIVILA	VIR
PCR	Cor a 1	182	0,001 % lešnika	lešniki, čokolada, prigrizki, muesli	Holzhauser in sod., 2002
PCR-ELISA	Cor a 1.0401	152	>10 ppm lešnika	živila in sestavine	Holzhauser in sod., 2002
PCR	Nad1	294	0,001 % oz. 10 ppm v čokoladi	čokolada	Herman in sod., 2003
PCR-HPLC	Cor a 1	156	5 pg	kosmiči, čokolada, piškoti, prigrizki	Germini in sod., 2005
RT-PCR	Cor a 1.04	82	0,1 ng DNA	semena, sadje, lešnik, kreme, kornfleks	Arlorio in sod., 2007
RT-PCR	Hsp 1	ni podatka	13 pg DNA, 0,01 % lešnik v pecivu	pečeni končni izdelki	Piknova in sod., 2007

Legenda: bp-bazni par, PCR-ELISA - verižna reakcija z polimerazo-encimsko imunski test, RT-PCR reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo.

Za določanje alergenov v živilih se uporablja tudi PCR v realnem času. Določanje alergenov s PCR v realnem času na primeru arašidov nakazuje, da vrednosti C_t , dosežene s PCR v realnem času, odražajo vsebnost alergenov v vzorcu. Primerjava PCR v realnem času s testom ELISA, specifičnih za arašid, kaže, da so vrednosti C_t , dobljene s PCR v realnem času, v korelaciji s količino proteina, izmerjeno s testom sendvič-ELISA. To nakazuje na potencial PCR v realnem času za določanje sledov arašidov in drugih alergenov v predelanih živilih če obstajajo primerni referenčni materiali z definirano vsebnostjo alergenov. Kvantifikacija točne količine alergena v hrani je težavna zaradi uporabe velikega števila različnih matrikov živil. Uporaba različnih matrikov lahko vodi v varirajoče možnosti izolacije bioloških tarčnih proteinov in DNK (Holzhauser in sod., 2006).

Piknova in sod. (2007) so s PCR v realnem času v živilih določali sledove lešnika. Oligonukleotidni začetniki in sonda so bili izbrani glede na tarčni gen *Hsp 1*, ki kodira protein toplotnega šoka z nizko molekularno maso (Piknova in sod., 2007). S PCR v realnem času so določili 13 pg DNK lešnika. Praktična občutljivost določevanja lešnika v živilih je bila 0,01 %. Metoda je bila sestavljena iz izolacije DNK in pomnoževanja tarčnega dela s specifičnimi oligonukleotidni začetniki in Taq-Man fluorescentno sondo. Uporabljeni oligonukleotidni začetniki in sonda, specifični za lešnik uporabljeni za PCR realnem času so bili: Nocc2F 5'-ggcaagtcgtgagcaggttc-3', Nocc1Rbis 5'-cttcggaatagtcacagtgcag-3', Nocc1P FAM-cctgacgatgcgagctcgaccag-BHQ1. Reakcija je pokazala pozitivne rezultate za 5 različnih sort lešnikov iz Slovaške in negativne za arašid, oreh, pistacijo, indijski orešček, kostanj. Ugotovili so, da je metoda visoko specifična in občutljiva, katero lahko izvedemo v enem delovnem dnevu oziroma v kratkem času. Vse alternativne metode, katere temeljijo na principu PCR za določanje orešchkov so visoko specifične, vendar manj občutljive kot ELISA (Piknova in sod., 2007).

Arlorio in sod. (2007) so s PCR v realnem času določali sledove lešnika v predelanih živilih. PCR je bila izvedena v aparatu ABI Prism 7900 HT SDS z uporabo barvila SYBRGreen in sonde TaqMan. Določili so praktično mejo občutljivosti s PCR v realnem času za določanje sledov lešnikov, ki je bila 0,1 ng. Dobra občutljivost te metode, je uporabna tako za oceno varnosti živil oziroma sestavin, kakor tudi za preverjanje navzkrižne kontaminacije (Arlorio in sod., 2007).

2.7 ZAKONODAJA S PODROČJA ALERGENOV

Zdravje v večini sodobnih družb velja kot največja vrednota, saj je dobro zdravje prebivalcev predpogoj za povečanje blaginje. Številne študije so pokazale, da pri otrocih več kot 75 % prehransko izzvanih alergijskih reakcij povzročijo jajca, arašidi, soja in sojine beljakovine, mleko, ribe in oreški, pri odraslih pa alergije pogostejše povzročajo sadje, zelenjava, arašidi in oreški. Podatek, da so kot možne povzročitelje alergij identificirali že več kot 70 živil, dovolj zgovorno priča, kako pomembno je, da je navajanje alergenih sestavin na embalaži predpakiranih živil zdaj obvezno (ZPS, 2007).

V Sloveniji velja Pravilnik o splošnem označevanju predpakiranih živil (2004), kjer je v prilogi 4 seznam 12 alergenih živil, katerih vsebnost mora biti označena na predpakiranem izdelku. To so: žita, ki vsebujejo gluten (pšenica, rž, ječmen, oves, pira, kamut, in njihove križane vrste) ali izdelki iz njih, raki in izdelki iz njih, jajca in izdelki iz njih, ribe in ribji izdelki, arašidi in izdelki iz njih, soja in sojini izdelki, mleko in mlečni proizvodi (ki vsebujejo laktozo) lupinasto sadje (oreški): mandelj, lešnik, oreh, indijski orešček, ameriški oreh, brazilski orešček, pistacija, makadamija in orehi in izdelki iz njih, listna zelena in izdelki iz nje, gorčično seme in izdelki iz njega, sezamovo seme in izdelki iz njega, žveplov dioksid in sulfiti v koncentraciji več kot 10 mg/kg ali 10 mg/l izdelka, izraženi kot SO₂ (velja za končni izdelek ne za posamezno sestavino).

V prilogi 4, Pravilnika o splošnem označevanju predpakiranih živil 2004, je lešnik (*Corylus avellana*) označen kot sestavina, ki lahko povzroča alergijo. Vse sestavine, ki so bile uporabljene pri proizvodnji živila in so še vedno prisotne v končnem proizvodu, čeprav v spremenjeni obliki, in so navedene v prilogi 4, ali ki izvirajo iz sestavin, navedenih v tej prilogi, se morajo navesti na označbi, z jasnim sklicevanjem na ime sestavine, iz katere izhajajo, razen če se ime, pod katerim se živilo prodaja, jasno nanaša na takšno sestavino. Direktiva komisije 2003/89/EC in 2007/68/EC prav tako v seznamu priloge alergenih sestavin (priloga IIIa) navaja seznam alergenih snovi, med katere sodi tudi lešnik. Seznam alergenih snovi se vedno posodablja na podlagi najnovejših znanstvenih spoznaj (Directive 2003/89/EC..., 2003; Directive 2007/68/EC..., 2007).

Danes še ni razvitega zdravila, ki bi preprečevalo vzroke alergij in drugih preobčutljivosti zato so ljudje z alergijami odvisni od zanesljivih in hkrati dobro vidnih informacij o sestavinah živila, ki ga kupujejo (IVZ RS, 2010; Heeres, 2006). Previdnost velja nameniti tudi "skritim" alergenom v hrani (Directive 2003/89/EC..., 2003). Navadno se ljudje, ki so preobčutljivi na neko živilo, držijo t. i. izključitvene diete, kar pomeni, da se živilom, ki jim lahko škodijo, izogibajo. Nekatera taka živila je zelo težko prepoznati, saj se lahko skrivajo kot sestavine drugih živil ali jedi (napr.: orehi in lešniki v slaščicah (ZPS, 2007)).

Evropska agencija za varnost (EFSA) se zaveda tveganja za potrošnika alergika, ki ga predstavljajo v izdelkih prisotni alergeni, ki na embalaži niso deklarirani. Za ljudi, ki so preobčutljivi je lahko usodno že zaužitje zelo majhnih količin alergeni snovi v živilu. Prisotni alergeni v živilu, ki niso deklarirani na embalaži, so največkrat posledica navzkrižne kontaminacije (Directive 2003/89/EC..., 2003). Pojem navzkrižna kontaminacija pomeni, da se lahko alergeni kljub zaščitnim ukrepom prenesejo v mikro količinah iz enega izdelka na drugega preko opreme, zraka ali surovin. Do navzkrižne kontaminacije lahko pride, ker se različni pekovski in drugi živilski izdelki delajo na isti strojni opremi. V pekarstvu je značilno suho čiščenje, ki ponavadi ni zadostno za popolno odstranitev alergenov. Pri nekaterih izdelkih kljub intenzivnemu čiščenju in ustrezno planirani proizvodnji (najprej se izdelujejo izdelki brez alergena, nato po izdelki, ki vsebujejo alergen), je popolna preprečitev kontaminacije nemogoča. Prisotnost alergena kot sestavine se zato lahko pojavi tudi v izdelkih ki alergena ne vsebujejo.

Zaradi boljšega varovanja zdravja potrošnika se v takšnih primerih na deklaracijo zapiše smiselno opozorilo, ki je najpogostejše v obliki »Lahko vsebuje sledove ...« (lahko vsebuje lešnik v sledovih, lahko vsebuje sledi lupinastega sadja (oreščkov), možni sledovi oreškov). Tako zapisane izjave pomenijo, da naj izdelek ne bi vseboval omenjenih alergeni živil ali njihovih sestavin, vendar pa proizvajalec ne more povsem zagotoviti, da niso prisotna v zelo majhnih količinah (sledovih). Alergena živila morajo biti na izdelku označena, pa čeprav jih vsebuje zelo malo (ZPS, 2007).

Pravila evropskih direktiv 2003/89/EC in 2006/142/EC za označevanje alergenih sestavin v živilih zagotavljajo, da so vsi potrošniki podrobno informirani z navedbo vseh sestavin na izdelku. Deklaracija vseh sestavin, ki jih vsebuje živilo omogoča popolno identifikacijo sestavin ljudem, ki so nagnjeni k preobčutljivostnim reakcijam in nudi popolno informacijo o živilu ki jo potrebujejo, da preprečijo nastanek alergijske reakcije. Potrebno je navesti vse sestavine na etiketi, četudi predstavljajo le majhen del izdelka (Directive 2003/89/EC..., 2003; Directive 2006/142/EC..., 2006).

Nekatere sestavine v hrani so predelane v taki meri, da ne morejo več sprožiti neželenih učinkov. Seznam proizvodov (mandlji, orehi za okus žganja, zelena, olje in semena, zelena semena, jajčni albumin za bistrenje jabolčnika, želatina iz ribjih mehurjev, kot nosilec za okuse in bistrenje, mleko (kazein), gorčično seme, olje iz gorčičnih semen), ki so začasno izvzete iz zahtev za označevanje iz Direktive 2003/89/EC je bil objavljen v Direktivi 2005/26/EC. Izdelki, ki so vsebovali te sestavine so bili izvzeti iz označevanja do 31. maja 2009. Po tem datumu pa so začela spet veljati stara pravila (Directive 2005/26/EC..., 2005).

Da bi zagotovili čim boljšo sledljivost za vsa živila, krmo, živali za pridobivanje hrane in vse druge snovi, sestavine, namenjene uporabi ali za katere se pričakuje, da se bodo uporabile v živilih ali krmi, mora biti zagotovljena sledljivost v vseh fazah pridelave, predelave in distribucije. Sledljivost je zelo pomembna za odgovornost in varnost izdelkov. Velja načelo od vil do vilic oziroma od surovega materiala do končnega izdelka (Heeres, 2006).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Reagenti za izolacijo DNK iz živil

- Komplet za izolacijo DNK Nucleospin Food (50 preparations Macherey-Nagel, 740945.50, Nemčija) vsebuje (Macherey-Nagel, 2008):
 - pufer CF za odstranjevanje polisaharidov (Buffer CF, polysaccharide removal buffer, 100mL),
 - proteinaza K (Proteinase K, 6 mg),
 - pufer C2 za lizo celične stene (Buffer C2, lysis buffer, 20 mL),
 - pufer C3 za lizo celične stene (Buffer C3, lysis buffer, 5 mL),
 - pufer CE za izpiranje (Buffer CE, elution buffer, 15 mL),
 - kolone za izpiranje (Food Spin Columns, 50),
 - zbiralne mikrocentrifugirke (2 mL Collection Tubes, 200),
- Absolutni etanol (K33731571 436, Merck, Nemčija).
- Aceton (100020, Merck)

3.1.2 Reakcijska mešanica za PCR v realnem času

- Univerzalna mešanica za PCR (angl. TaqMan Universal MasterMix, 4304437 Applied Biosystems, ZDA),
- DNK/RNK prosta voda (angl. Nuclease Free Water (129115 Qiagen, Nemčija),
- sonda (Nocc1P) in par oligonukleotidnih začetnikov (Nocc1Rbis in Nocc2F) za *Corylus avellana* (Piknova in sod., 2007): 10 pmol/μL.
 - Nocc1P: 5'--FAM-CCTGACGATGGATGCTCGACCAG-BHQ1-3' (Applied Biosystems, ZDA),
 - Nocc2F: 5'--GGCAAGTTCGTGAGCAGGTTC-3' (Applied Biosystems, ZDA),
 - Nocc1Rbis: 5'--CTTTCGGAATAGTCACAGTGAG-3' (Applied Biosystems, ZDA),

```
gtcaatttgcaaagatgtcgatcgccccaaacaatgagcgagagcgagcagtgctccaat
ccctcctccagagacctgtgggacgtcttccggagcttcagagagaaccaccttcaggac
ccattcagcgatttacctttcgcttctacactctccacgctcttccctcactccccgttc
gggagctcgggtgaacaccaggctcgactggagggagacccccgagagcccacgtgctgaag
gcttctcttccggggttcgtggacgaggacgtgttggtggagctccaagacgaccgagtg
ctccaggtgagcgctcgagagtggcaagttcgtgagcagggtcaaggtccctgacgatgca
atgctcgaccagttgaaggcctcgatgcacaatggggttctcactgtgactattccgaaa
gcgaggcgagcaggccaaccgttcggaccatcgagatctctggctaaatatgtgatctt
cctttgccctgtctgtcactatgtttatatgttggtgtgtgtgtgggttggtgaaggttat
cgtgagctcctctgagtttggttatgaagggtgttgataaaatgcgtctaaagtttgat
gtttgtgtcggttcttgtgatgttgaccctttgcttagtgtgtcttaaatggttggtggg
ttgagaagaaaatacactatgttggttaacaacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaa
```

Slika 8: Prikaz sekvenc oligonukleotidnih začetnikov Nocc2F, Nocc1Rbis in sonde Nocc1P v genu *Hsp 1* ki kodira protein toplotnega šoka, specifičnega za *Corylus avellana* L. (NCBI, 2011)

3.1.3 Reagenti za gelsko elektroforezo

- Pufer TAE 1x (pripravili smo ga iz 10x TEA pufra in deionizirane H₂O)
 - 0,05 M Tris baze (pH=8)
 - EDTA (Etilendiamintetraocetna kislina), Titriplex III, 108418, Merck, Nemčija)
 - Ocetna kislina (10063, Merck, Nemčija)
- Priprava 1,5 % agaroznega gela
 - agarosa ME (Agarose, A9539, Sigma-Aldrich, USA)
 - pufer TAE 1x (pufrna raztopina, ki vsebuje tris bazo, ocetno kislino in etilendiamintetraocetno kislino)
 - 0,02 M raztopina Na₂-EDTA (E-5134, Sigma, ZDA)
- Barvilo za nanos pomnožkov (ang. loading buffer, GelPilot DNA, 40724, Qiagen GmbH, D- Hiden)
- Molekularni označevalec dolžin pomnožkov DNK, (angl. 100 bp DNA Ladder, 1 µg/µL, 15628-019, Invitrogen, ZDA)
- Raztopina etidijevega bromida (E 2028, Sigma, ZDA)
- Sterilna H₂O_{PCR}

3.1.4 Vzorci

3.1.4.1 Vzorci alergenov

- 7 vzorcev lešnikov *Corylus avellana* sort: Buttler, Mortarella, Nocchione; lešniki (jedrca ODLIČNO; Hrib d.o.o.; poreklo: Turčija); lešniki (mleti; Hrib d.o.o.; poreklo: Avstrija); lešniki (celi, letnik 2008; poreklo: Slovenija); lešniki (celi, letnik 2009; poreklo: Slovenija)
- 8 vzorcev orehov *Juglans regia* sort: Ronde de Montignac/04, A-117/04, G-139/04, ELIT/04, CISCO/04, CROSVERT/04, orehi (mleti ODLIČNO, Hrib d.o.o., poreklo: Moldavija)
- 3 vzorci arašidov *Arachis hypogaea*: arašidi (praženi v lupini; letina 2009; Hrib d.o.o.; poreklo: Kitajska); arašidi (pražena jedrca brez olja in jedilne soli; Hrib d.o.o., poreklo: Argentina); arašidi (praženi; Mercator IP d.o.o.; poreklo: Argentina)
- 1 vzorec mandljev (blanširani, Biamed, ZDA)
- 1 vzorec makadamija oreščka (*Macadamia nut*; Bimed d.o.o., poreklo: Južnoafriška republika)

3.1.4.2 Sestavine za izdelavo standardnih mešanic:

- lešniki *Corylus avellana* sort Butler, Mortarella (v lupini, letnik 2008 in 2009; poreklo: Slovenija)
- moka (Štajerska moka, bela ostra tip 400; Žito d.d.)

3.1.4.3 Vzorci živil

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili 23 vzorcev živil. 7 živil naj bi vsebovalo lešnik, 10 živil naj ne bi vsebovalo lešnika in 6 živil katera so imela na embalaži navedeno, da lahko vsebujejo sledove lupinastega sadja. Vzorci živil, katere smo uporabili pri eksperimentalnem delu so navedeni v preglednici 2.

Preglednica 2: Vzorci živil uporabljeni v eksperimentalnem delu

Vzorec	Sestavine	Neto količina	Proizvajalec
Orehovi rogljički 1	pšenična moka tip 500, sladkor, margarina, jajca, orehi (12 %), vanilja	500 g	Slaščičarstvo in pekarstvo Brodnik
Orehovi rogljički 2	pšenična bela moka, hidrogenirana rastlinska maščoba, sladkor, orehi 10 %, mleko v prahu, sredstvo za vzhajanje, pecilni prašek (E500, E450), emulgator sojin lecitin, barvilo beta karoten, vanilin sladkor. Lahko vsebuje: jajca, sledi lupinastega sadja	500 g	Grajske pekarnе, Žito d.d.
Orehovo čokoladno pecivo	pšenična moka tip 500, sladkor, margarina, jajca, vanilja, čokoladni preliv, orehi	500 g	Slaščičarstvo in pekarstvo Brodnik
Domači orehovi keksi	bela pšenična moka tip 500, rastlinske maščobe, sladkor, orehi (jedrca), sveža jajca, mleko v prahu, sredstvo za vzhajanje E 503, jedilna sol, aroma	400 g	Pekarna in čokoladnica PLEŠEC
Kifeljčki z orehi	pšenična bela moka, hidrogenirana rastlinska maščoba (rastlinske masti in olja, voda, jedilna sol, emulgatorja (E 322, E 471), konzervans (E 200), sredstvo za uravnavanje kislosti (citronska kislina), aroma, barvilo (E 160a)), sladkor, orehi 11 %, jajčni melanž, sladka smetana, vanilin sladkor. Lahko vsebuje sledove soje	500 g	Slaščičarska delavnica Kranjski kolaček
Domači prijatelj	pšenična moka tip 500, sladkor, jajca, rozine, orehi, koščki čokolade (sladkor, kakavova masa, kakavovo maslo, emulgator sojin lecitin), sredstvo za vzhajanje: difosfati in natrijev hidrogen karbonat, aroma, barvilo beta karoten; lahko vsebuje mleko v sledovih	400 g	Klasje Celje
Vrhniške linške oči	pšenična bela moka, mleko, margarina, jajca, sladkor v prahu, naravne arome, marmelada	500 g	Pekarna in keksarna Adamič
Vrhniško čajno pecivo s kakavovim oblivom	pšenična bela moka, margarina, jajca, mleko, sladkor v prahu, sladkor, kakavov obliv	450 g	Pekarna in keksarna Adamič
Čajno pecivo	pšenična moka, sladkor, rastlinska mast, dekstroza, laktoza, sredstva za vzhajanje (E 500 ii, E 503 ii), jedilna sol, mlečne beljakovine, arome	750 g	Mercator, Medex d.d.,
Keksi Otroško veselje	pšenična moka, sladkor, rastlinska margarina (rastlinsko olje, hidrogenirana rastlinska maščoba, voda, emulgator E 471, konzervans E 270, barvilo E 160 a), maslo, jajca, cvetlični med, voda, mleko v prahu, jedilna sol, sredstva za vzhajanje (E 500, E 502 i, E 504 i) in uravnavanje kislosti. Lahko vsebuje sledove lupinastega sadja, soje, sezama	350 g	Pečjak
Vanilijevi rogljički	pšenična moka, rastlinska margarina (rastlinsko olje, hidrogenizirana rastlinska maščoba, voda, emulgator E 471, konzervans E 270, barvilo 160 a), sladkor, jajca, rum, citróna, vanilin. Lahko vsebuje sledove lupinastega sadja, mleka, soje, sezama	350 g	Pečjak
Kakavove palčice	Vafelj izdelek z kakavovo kremo (81 %): sestavine: sladkor, hidrogenirano rastlinsko olje, pšenična moka, manj masten kakavov prah 5,3 %, sol, sredstvo za uravnavanje kislosti E 500, aroma, emulgator soja lecitin E 322. Izdelek vsebuje gluten in sojo. Možni sledovi lešnikov in mleka	250 g	Kraškommerce d.o.o
Speculaas	pšenična moka, sladkor, hidrogenirano rastlinsko olje, praženi mandeljni, sirotka v prahu, manj masten kakavov prah, začimbe, sredstvo za vzhajanje E 503 (ii), možni sledovi soje in lešnika	500 g	Koestlin, tvornica keksa i vafla d.d.; Hrvaška
Smoki	koruzni zdrob, arašid (22 %), hidrogenirana rastlinska maščoba, sojina moka, pšenični zdrob, jedilna sol	50 g	Soko-Nada Štark; Srbija

Se nadaljuje...

Nadaljevanje preglednice 2: Vzorci živil uporabljeni v eksperimentalnem delu

Vzorec	Sestavine	Neto količina	Proizvajalec
Horalky	pšenična moka, rastlinska maščoba, sladkor, preliv 7,4 % (sladkor, rastlinska maščoba, kakavov prah, emulgator (sojin lecitin, E476), aroma), posušena sirotka, arašidi v polnilu 8,6 %, pšenični kalčki, sojina moka, kakavov prah z manjšo vsebnostjo maščob, mleko v prahu, pšenični zdrob, jedilna sol, sredstvo za vzhajanje (E504 (i), E500 (ii), emulgator sojin lecitin)	35 g	Opava s.r.o.; Češka
Musli keksi	musli 38,5 % (ovseni, ječmenovi, pšenični, koruzni, sojini kosmiči), rezani praženi lešniki, koščki suhega sadja (hruške, rozine, slive, jabolka, marelice), margarina (rastlinske maščobe, voda, rastlinska olja, jedilna sol, emulgator (E471, sojin lecitin), kislina: citronska kislina, aroma, barvilo beta karoten), pšenična polbela moka, sladkor, pšenična polnozrnata moka, voda, sredstvo za vzhajanje, pecilni prašek (E500, E450), mleko v prahu, aroma. Lahko vsebuje sledi jajc in drugega lupinastega sadja	300 g	Žito d.d.
Čajno pecivo s figovim in pomarančnim polnjenjem	Karšuljci & Krašotice, sestavine: pšenična bela moka, figova in pomarančna marmelada (glukozno-fruktozni sirup, suhe fige 23,5 %, dekstroza, fige 12 %, sladkor, pomaranče 6 %, sadni sok, limone 4 %, sredstvo za zgostitev E440, sredstva za uravnavanje kislosti: E330, E333), sladkor, hidrogenirano rastlinsko olje, margarina (hidrogenirano rastlinsko olje, voda, sol, emulgatorja: sojin lecitin E322, E471, konzervansi E 200, sredstvo za uravnavanje kislosti E330, aroma, barvilo E160a), tapiokin škrob, glukozni sirup, sredstva za vzhajanje: E450 i, E550, sol, emulgator soja lecitin E322, aroma. Izdelek vsebuje gluten in sojo. Možni sledovi jajca, mleka, lešnikov, mandljev	200 g	Kraš, prehrambena industrija d.d.; Hrvaška
O'cake	polnozrnata moka (26 %), ovseni kosmiči (26 %), sladkor, rastlinska maščoba, lešnik (6 %), glukozni sirup, sredstvo za vzhajanje natrijev hidrogenkarbonat, jedilna sol, aroma	210 g	Jaffa Crvenka; Srbija
Vafelj izdelek polnjen z mlečno kremo, oblit z mlečno čokolado	Milka Wafelini Milk, sestavine: sladkor, pšenična moka, rastlinske maščobe, sirotka v prahu, kakavovo maslo, mlečni sladkor, posneto mleko v prahu 3,9 %, kakavova masa, mlečna maščoba, manj masten kakavov prah, emulgatorja sojin lecitin, E476; krompirjev škrob, lešnikova pasta, rastlinsko olje, arome, sredstva za vzhajanje E500, E503; sol. Mlečna čokolada vsebuje kakavov del najmanj 30 %, mlečna suha snov najmanj 18 %. Vsebuje pšenico, mleko, lešnike, sojo. Lahko vsebuje sledi drugih oreščkov	38 g	Kraft Foods
Vafelj izdelek z kakavovo kremo, oblit z mlečno čokolado	Milka Wafelini Čoko, sestavine: sladkor, kakavov vafelj 18,5 % (pšenična moka, manj masten kakavov prah 8,5 %, krompirjev škrob, rastlinsko olje, emulgator (sojin lecitin, E476), sredstva za vzhajanje (E500, E503, sol)), rastlinske maščobe, kakavovo maslo, mlečni sladkor, pšenična moka, posneto mleko v prahu, sirotka v prahu, kakavova masa, mlečna maščoba, majnmasten kakavov prah 1 %, lešnikova pasta. Mlečna čokolada vsebuje kakavov del 30 %, mlečna suha snov 18 %. Vsebuje pšenico, mleko, lešnike, sojo. Lahko vsebuje sledi drugih oreščkov	38 g	Kraft Foods
Mlečna čokolada s celimi lešniki	sladkor, celi lešniki (min. 25 %), kakavovo maslo, posneto mleko v prahu, kakavova masa, maščoba, dekstroza, emulgator sojin lecitin, aroma: vanilin. Lahko vsebuje sledi lupinastega sadja in pšeničnih beljakovin. Mlečna maščoba vsebuje: 30 % kakavovih delov, 20 % mlečne suhe snovi	100 g	Gorenjka, Žito d.d.

Se nadaljuje...

Nadaljevanje preglednice 2: Vzorci živil uporabljeni v eksperimentalnem delu

Vzorec	Sestavine	Neto količina	Proizvajalec
Mlečna čokolada s celimi lešniki	sladkor, lešniki (23 %), kakavovo maslo, kakavova masa, smetana v prahu, posneto mleko v prahu, sirotka v prahu, laktoza, mlečna maščoba, emulgator sojin lecitin, naravna aroma. Kakavovi deli: najmanj 30 %. Suha snov mleka: najmanj 18 %. Lahko vsebuje sledove arašidov, drugih oreščkov in pšenice	100 g	Alfred Ritter Gmbtt and co.
Bela čokolada s celimi lešniki in hrustljivim rižem	sladkor, lešniki (23 %), kakavovo maslo, smetana v prahu (9 %), posneto mleko v prahu, sirotka v prahu, laktoza, riževa moka (3 %), emulgator sojin lecitin, jedilna sol, naravna aroma, ječmenov slad. Lahko vsebuje sledove arašidov, drugih oreščkov in pšenice	100 g	Alfred Ritter Gmbtt and co.

3.1.5 Laboratorijska oprema

Laboratorijska oprema, ki smo jo uporabljali pri raziskovalnem delu, je navedena v preglednici 3.

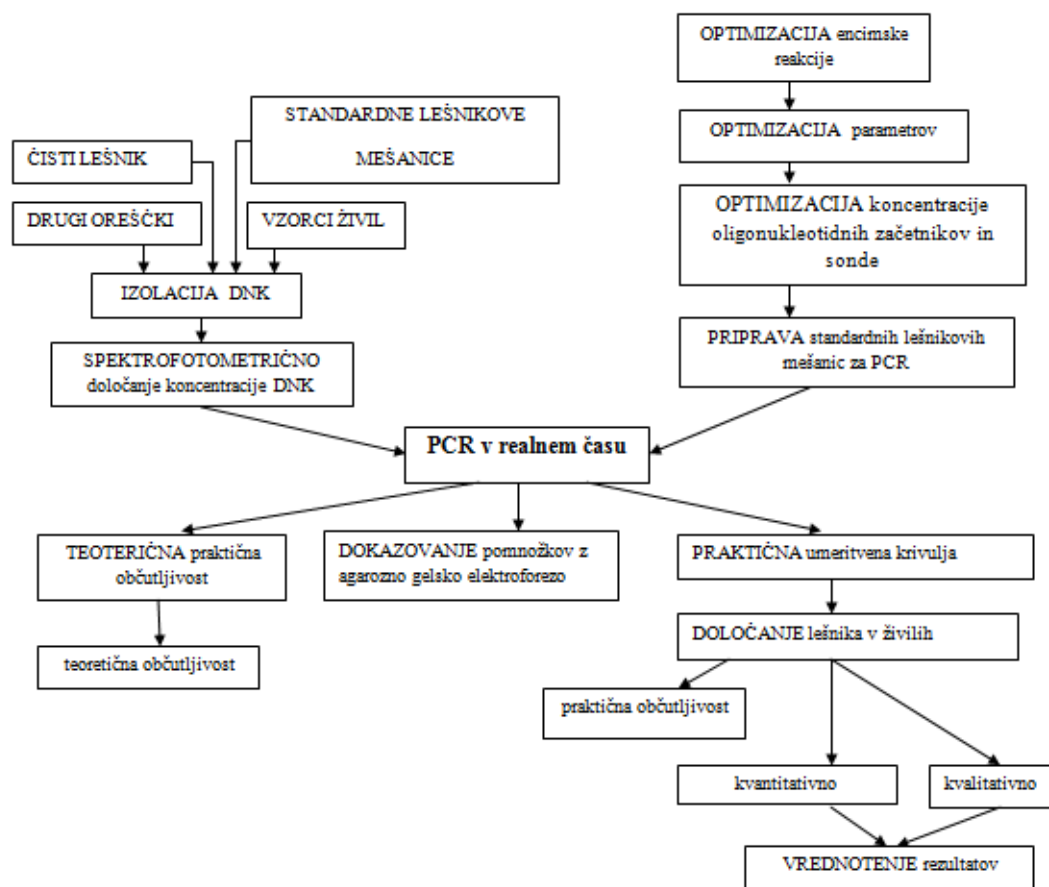
Preglednica 3: Laboratorijska oprema

APARAT	OZNAKA	PROIZVAJALEC
PCR v realnem času	ABI Prism 7500	Applied Biosystems, ZDA
avtomatske pipete in nastavki	0,5 - 10 µL, 20 - 300 µL, 50 - 1000 µL	Eppendorf, Francija
čitalec mikrotiterskih plošč	Tecan	Safire ² , Avstrija
centrifuga	Mini Spin PLUS	Eppendorf, Francija
hladilnik	/	LTH, Slovenija
hladilnik	/	Gorenje, Slovenija
tehtnica	MonoBloc PB 1502-S	Metter Toledo, Švica
precizna tehtnica	AB 204-S	Metter Toledo, Švica
vodna kopel	WB-30	Kambič, Slovenija
zamrzovalnik (-20 °C)	/	Gorenje, Slovenija
zamrzovalnik (-20 °C)	/	LTH, Slovenija
mlinček za mletje oreščkov		Pocajt, Slovenija
namizno mešalo	TTS 2	Yelowline, Nemčija
sistem za slikanje in obdelavo elektroforetskih gelov	Gel Doc 2000	BioRad, ZDA
elektroforezna kadička	PowerPac Basic	BioRad, ZDA

Zraven laboratorijske opreme (preglednica 3), smo pri raziskovalnem delu uporabili še splošno laboratorijsko opremo, kot so pestila, terilnice, Eppendorfove epruvete (0,5 mL, 1,5 mL, 2,0 mL), vrstične posodice s pokrovčki za PCR, žlice, aluminijasta folija, stojala, merilne valje, čaše, elenmajerice, pincete in vrstične posodice s pokrovčki za izvedbo PCR v realnem času (Applied Biosystems, 2004).

3.2 METODE

Shema poteka našega eksperimentalnega dela je razvidna iz slike 9.



Slika 9: Shema eksperimentalnega dela

3.2.1 Izolacija DNK

3.2.1.1 Izolacija s kompletom Nucleospin

Uporabili smo protokol za izolacijo DNK s kompletom Nucleospin. Protokol smo modificirali tako, da smo dodali razmaščevanje vzorca z acetonom. Izolacijo DNK vzorca smo izvedli v več stopnjah:

1: Homogenizacija vzorca: v terilnici smo strli vzorec tako, da smo dobili čim bolj homogeno zmes, nato pa v mikrocentrifugirko odtehtali 500 mg vzorca.

2: Razmaščevanje vzorca: vzorcu v mikrocentrifugirki smo dodali 1000 μL acetona in centrifugirali 5 min pri 14500 min^{-1} . Postopek smo ponovili 3 krat. Razmaščene vzorce smo prenesli na filtrirni papir in jih približno 2 uri sušili na zraku.

3: Liza celice: razmaščenemu vzorcu smo dodali 1100 μL pufra CF, segretega na 65°C in previdno mešali 15 s na namiznem mešalu. Nato smo dodali še 20 μL proteinaze, mešali 2-3 s na namiznem mešalu in vse skupaj inkubirali 30 min pri 65°C v vodni kopeli. Vsakih 10 min

smo zmes ponovno premešali. Po inkubaciji smo zmes centrifugirali 10 min pri hitrosti 14500 min^{-1} .

4: Prilagoditev pogojev za vezavo DNK: 300 μL čistega supernanata smo prenesli v novo mikrocentrifugirko v katero smo predhodno dodali 300 μL pufru C4 in 200 μL absolutnega etanola. Zmes smo 30 s mešali na namiznem mešalniku.

5: Vezava DNK: v kolono za izpiranje, ki smo jo vstavili v zbiralno mikrocentrifugirko smo odpipetirali 700 μL zmesi. Vse skupaj smo centrifugirali 1 min pri 12000 min^{-1} in zavrgli tekočo fazo.

6: Spiranje in sušenje silikonske membrane:

- prvo spiranje: 400 μL pufru CQW smo odpipetirali v kolono za izpiranje, centrifugirali 1 min pri 12000 min^{-1} in zavrgli tekočo fazo.
- drugo spiranje: 700 μL pufru C5 smo odpipetirali v kolono za izpiranje, centrifugirali 1 min pri 12000 min^{-1} in zavrgli tekočo fazo.
- tretje spiranje: 200 μL pufru C5 smo odpipetirali v kolono za izpiranje, centrifugirali 2 min pri 12000 min^{-1} , da smo popolnoma odstranili pufer C5.

7: Spiranje DNK: kolono za izpiranje smo vstavili v novo zbiralno mikrocentrifugirko. V kolono za izpiranje smo nato dodali 100 μL CE pufru, segretega na 70°C in inkubirali za 5 min pri sobni temperaturi ter centrifugirali 1 min pri 12000 min^{-1} . Mikrocentrifugirke z DNK smo za nadaljnjo analizo shranili v zamrzovalniku.

3.2.2 Spektrofotometrično določanje količine DNK

Za kvantitativno določevanje DNK smo izmerili vrednosti absorbanče pri valovnih dolžinah 230 nm, 260 nm in 280 nm. Odčitana vrednost pri valovni dolžini 260 nm omogoča izračun koncentracije nukleinske kisline v vzorcu. Razmerje med izmerjenima valovnima dolžinama ($A_{260/280}$) je merilo čistosti nukleinske kisline. Vrednosti razmerja $A_{260/280}$ v razponu od 1,8 do 2,0 nam povedo, da je izolirana DNK čista. Če je vzorec DNK kontaminiran z proteini ali fenoli bo razmerje $A_{260/280}$ občutno nižje, kot zgoraj navedene vrednosti, prav tako pa ne omogoča natančno določevanje količinske vsebnosti nukleinske kisline (Sambrook, 1989).

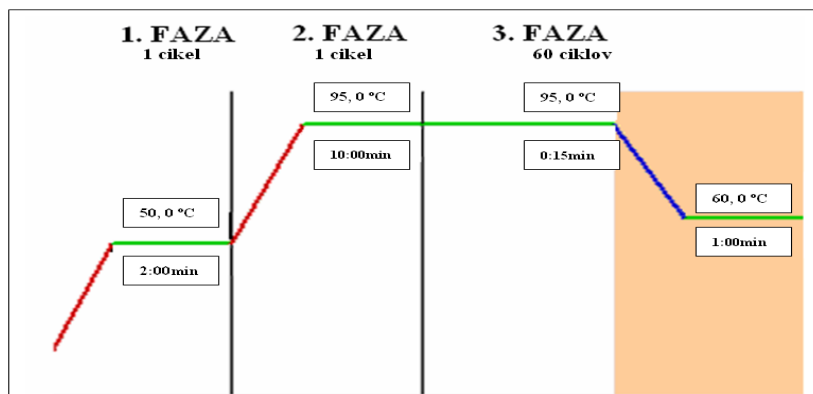
3.2.3 Priprava reakcijske mešanice za PCR v realnem času

V reakcijski mešanici, skupnega volumna 25 μL , za določanje lešnika smo dodali naslednje reagente:

- TaqMan Universal MasterMix 2 x: 12,5 μL ,
- par oligonukleotidnih začetnikov za *Corylus avellana* L.:
 - Nocc1Rbis (10 pmol/ μL): 0,75 μL
 - Nocc2F(10 pmol/ μL): 0,75 μL
- sonda za *Corylus avellana* L.:
 - Nocc1P (10 pmol/ μL): 0,125 μL
- $\text{H}_2\text{O}_{\text{PCR}}$: 5,878 μL
- DNK: 5 μL

3.2.4 Izvedba PCR v realnem času in vrednotenje rezultatov

Za določanje lešnika smo uporabili PCR v realnem času s specifičnim parom oligonukleotidnih začetnikov Nocc2F in Nocc1Rbis za lešnik in specifično sondo Nocc1P (Pinkova in sod. 2007). V posamezno reakcijsko mešanico (3.2.3) smo dodali 5 μ L pripravljene DNK. Za negativno kontrolo (NTC), smo reakcijski mešanici namesto DNK lešnika dodali H_2O_{PCR} . Uporabili smo univerzalni program aparata ABI Prism 7500 (Slika 10), le da smo v tretji fazi spremenili število ciklov iz 40 na 60, da bi lahko določili tudi alergene v sledovih, ki imajo običajno visoko vrednost C_t .



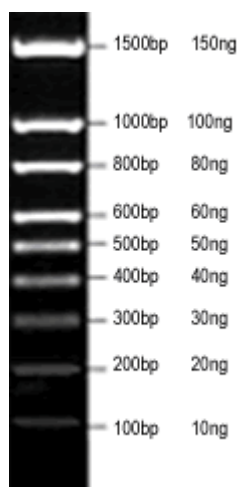
Slika 10: Temperaturno-časovne faze pomnoževanja DNK v aparatu ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, 2004)

Analizo pomnožkov smo izvedli s programom ABI Prism 7500 Sequence Detection system (Applied Biosystem, 2004). Po zaključeni encimski reakciji smo za posamezni vzorec določili vrednost C_t . Vrednost C_t pove koliko ciklov je potrebnih, da aparatura zazna normaliziran fluorescentni signal (ΔR_n), kar pomeni, da se pri določenih razmerah fluorescenca vzorca poveča nad fluorescenco ozadja (Applied Biosystems, 2004). Nastavitve aparata za PCR v realnem času za analiziranje rezultatov so bile vedno sledeče: mejo zaznavanja smo nastavili ročno na vrednost 0,05 ob avtomatski nastavitvi izhodišča zato, da smo lahko primerjali rezultate različnih PCR v realnem času. Pri tako postavljenih parametrih je bil pozitiven rezultat tisti, ki je imel vrednost C_t nad mejo zaznavanja.

3.2.5 Dokazovanje pomnožkov z agarozno gelsko elektroforezo

Pomnožke, dobljene s PCR v realnem času, smo v nekaterih primerih dokazali še z agarozno gelsko elektroforezo. Gel smo pripravili tako, da smo ustrezno količino agaroze vmešali v ustrezen volumen predhodno pripravljenega 1x pufra TAE. Agarozo smo popolnoma raztopili v mikrovalovni pečici in segrevali, dokler suspenzija ni postala bistra. Suspenzijo smo nato ohladili na 60 °C, razlili v ustrezen model in namestili glavniček. Ohlajen gel smo prestavili v elektroforetsko kadičko in ga zalili z 1x pufrom. Na tako pripravljen gel smo na začetek oziroma v prvo jamico nanесли molekularni označevalec DNK (100 bp DNK Ladder). K 2 μ L barvila za nanos pomnožkov smo primešali 8 μ L pomnožka. Pripravljeno raztopino smo po zaporedju nanесли v agarozni gel v pufru TAE 1x. Elektroforeza je potekala pri konstantni napetosti 120 V/cm. Po končani elektroforezi smo barvali gel v raztopini etidijevega bromida (EtBr), nato pa gel prenesli še v vodo za 5 min. Gel smo potem opazovali pod UV svetlobo in

ga računalniško dokumentirali. Velikost pomnožkov smo nato odčitali glede na velikost fragmentov molekularnega označevalca, kar je razvidno iz slike 11.



Slika 11: Velikost fragmentov molekularnega označevalca dolžin pomnožkov na agaroznem gelu (LightLabs, 2011)

3.2.6 Optimizacija PCR v realnem času

Z določanjem optimalne koncentracije oligonukleotidnih začetnikov Nocc2F, Nocc1Rbis in sonde Nocc1P smo optimizirali PCR v realnem času. Encimsko reakcijo s 100-krat razredčeno DNK lešnika smo izvedli z reakcijskimi mešanicami, ki so imele različne koncentracije oligonukleotidnih začetnikov (900 nmol/L, 600 nmol/L, 300 nmol/L) in različne koncentracije sonde (50 in 300 nmol/L). Kot najustreznejšo koncentracijo smo določili tisto, kjer je bila encimska reakcija učinkovita in kjer so bile vrednosti C_t najnižje.

3.2.7 Določitev specifičnosti PCR v realnem času

Specifičnost PCR v realnem času smo določali tako, da smo izolirali DNK iz različnih sort lešnika *Corylus avellana* (Butler, Mortarella, Nocchione), arašida, oreha in makadamija oreščka. Ugotavljali smo, ali encimska reakcija daje pozitiven rezultat pri vseh omenjenih sortah in s tem preverili, ali ima omenjeno lupinasto sadje alergeni gen *Hsp 1*. Oligonukleotidni začetniki in sonda, specifični za lešnik so bili izbrani glede na tarčni alergeni gen *Hsp 1*, ki kodira protein toplotnega šoka (Piknova in sod., 2007).

3.2.8 Določitev občutljivosti in učinkovitosti PCR v realnem času

3.2.8.1 Občutljivost in učinkovitost PCR v realnem času, določena z čisto DNK lešnika

Občutljivost PCR v realnem času smo določili tako, da smo koncentracijo izolirane DNK čistega lešnika najprej izmerili spektrofotometrično. Nato smo DNK razredčili s H_2O_{PCR} in ugotavljali, katera je najnižja koncentracija DNK lešnika, pri kateri encimska reakcija še daje pozitiven rezultat. V našem primeru smo razredčili DNK čistega lešnika (osnovni vzorec) in dobili različne koncentracije vzorcev. Dobljene rezultate s PCR v realnem času smo ovrednotili z izračunom premice, kjer smo določili odvisnost vrednosti C_t od koncentracije

DNK vzorca (enačba 1). Iz koncentracije čiste DNK in pripadajočih vrednosti C_t smo izračunali umeritveno krivuljo 1 po enačbi 1.

$$y = k * x + n \quad \text{ali} \quad C_t = k * \log C + n \quad \dots 1$$

Legenda: k- naklon premice, n- presečišče grafa z ordinatno osjo, C_t - točka, kjer se krivulja fluorescence povzpne nad fluorescenco ozadja, C- koncentracija DNK

Z izračunom parametrov premice, ki je prikazovala odvisnost vrednosti C_t od destiškega logaritma koncentracije DNK, smo določili območje linearnosti, korelacijski koeficient (R^2), ki bi pa moral biti čim bližje 1,0, in učinkovitost reakcije. Učinkovitost PCR v realnem času smo določili po enačbi 2 (Pfaffl, 2001).

$$E = (-1 + 10^{(-1/k)}) * 100 \quad \dots 2$$

Legenda: E: učinkovitost reakcije, k: naklon premice, 100: kot 100% učinkovitost pri pomnoževanju tarčne molekule.

Učinkovitost je zadovoljiva, kadar je naklon premice (k) med vrednostmi -3,3 do -3,6 in če je izračunana učinkovitost med 90 do 110 % (Pfaffl, 2004). Kadar je učinkovitost encimske reakcije izven tega območja pomeni, da pomnoževanje ni učinkovito in da se število nastalih kopij DNK v posameznem ciklu ne povečuje več eksponentno. Kadar je učinkovitost encimske reakcije izven zadovoljivega območja, kvantifikacija pri PCR v realnem času ni pravilna (Pfaffl, 2004).

Mnogo dejavnikov vpliva na potek in učinkovitost PCR v realnem času. Ti dejavniki so degradacija vzorca, degradacija DNK, koncentracija DNK, inhibitorji, vzpodbujevalci encimske reakcije, sestavine reakcijske mešanice, primerna izbira in čistost oligonukleotidnih začetnikov in sonde, fluorogena barvila, razmere pomnoževanja ter vrsta in značilnosti aparata za PCR (Pfaffl, 2004).

3.2.8.2 Občutljivost in učinkovitost PCR v realnem času, določena s standardnimi lešnikovimi mešanicami

Standardne lešnikove mešanice smo pripravili tako, kot navajajo Wang in sod. (2009). Lešnike smo mleli ločeno v mlinčkih za mletje oreščkov, jih razmastili z acetonom, posušili na zraku in pripravili mešanice s pšenično moko. Mešanica z 0 % alergena je vsebovala samo moko. Mešanica z 10 % alergena je vsebovala 1 g razmaščenega alergena in 9 g moke, mešanica s 5 % alergena pa 0,5 g razmaščenega alergena in 9,5 g moke. 1 g 10 %, oziroma 5 % mešanice smo primešali 9 g moke in dobili 1 %, oziroma 0,5 % mešanico alergena. Na enak način smo pripravili še 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001, 0,0005 in 0,0001 % mešanice. Mešanice smo dobro homogenizirali (Wang in sod., 2009).

Iz standardnih mešanic smo nato izolirali DNK in koncentracije DNK določili spektrofotometrično. Iz spektrofotometrično določenih koncentracij izolirane DNK iz standardnih mešanic, smo za PCR v realnem času pripravili raztopine z enako koncentracijo DNK (30 ng/ μ L). Za PCR smo vedno uporabili 5 μ L DNK ali 150 ng DNK/ 25 μ L reakcijske mešanice. S PCR v realnem času smo v standardnih mešanicah določali ali se z različnim odstotkom spreminjajo vrednosti C_t . Narisali smo graf odvisnosti vrednosti C_t od desetiškega

logaritma koncentracije lešnika v standardni mešanici [$\log (\%)$] in tako dobili umeritveno krivuljo. Iz dobljene umeritvene krivulje in enačbe 2, smo izračunali učinkovitost reakcije PCR v realnem času.

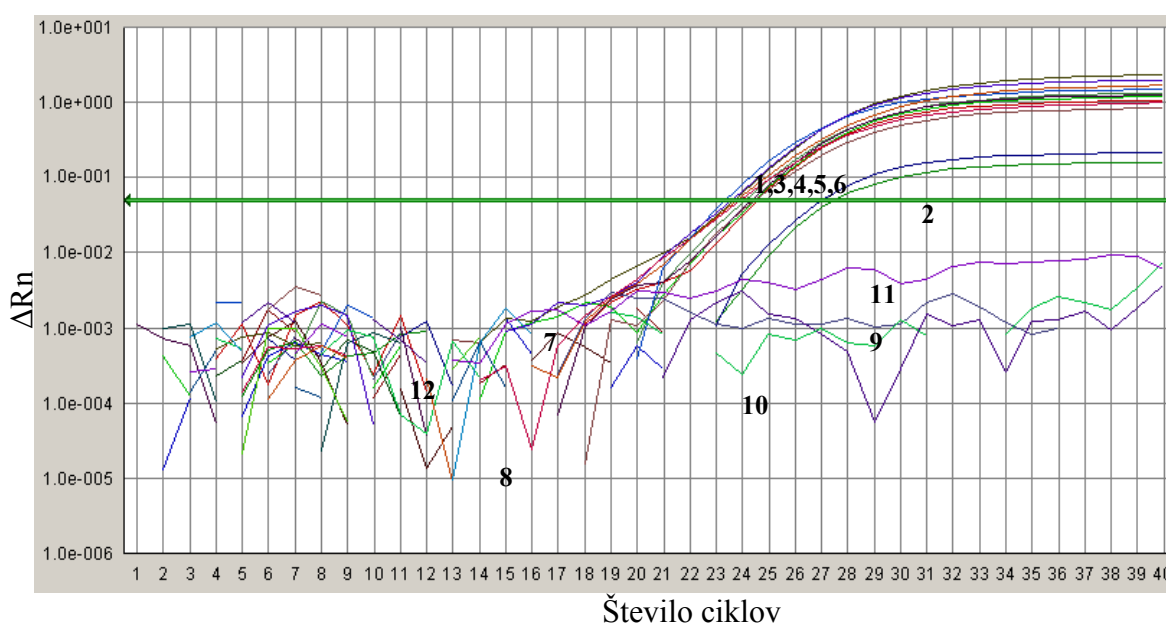
3.2.9 Relativna kvantifikacija lešnika kot alergena v vzorcih živil

Iz vzorcev različnih živil smo izolirali DNK. Spektrofotometrično smo izmerili absorbanco DNK vzorcev živil za PCR v realnem času. Absorbanco smo izmerili pri 3 različnih valovnih dolžinah ($A_{230\text{ nm}}$, $A_{260\text{ nm}}$, $A_{280\text{ nm}}$) in izmerili celotno koncentracijo DNK vzorcev. Koncentracije izolirane DNK iz posameznih vzorcev smo razredčili na 30 ng DNK/ μL . S PCR v realnem času smo določili vrednosti C_t . Dobljene vrednosti C_t živil smo vnesli v umeritveno krivuljo standardnih mešanic in izračunali odstotek lešnika v živilu.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 OPTIMIZACIJA PCR V REALNEM ČASU ZA DOLOČANJE LEŠNIKA

Optimizacija PCR v realnem času za določanje lešnika je zajemala določanje koncentracije oligonukleotidnih začetnikov Nocc1Rbis, Nocc2F (300 nM, 600 nM, 900 nM) in sonde Nocc1P (50 nM, 100 nM) pri standardnem programu aparata ABI Prism 7500. Koncentracije smo optimizirali tako, da smo pripravili različne reakcijske mešanice, v katerih so bile različne koncentracije sonde in različne koncentracije oligonukleotidnih začetnikov ter nato izvedli PCR v realnem času. Kot optimalno smo izbrali najnižjo koncentracijo sonde Nocc1P in koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov Nocc1Rbis, Nocc2F (preglednica 4), pri kateri je bil rezultat še pozitiven. Označeni vzorci od 1 do 12 (slika 12), predstavljajo različne koncentracije sonde in oligonukleotidnih začetnikov.



Slika 12: Optimizacija PCR v realnem času za določanje lešnika

Legenda :

ΔRn -normaliziran fluorescentni signal,

1: koncentracija Nocc1Rbis, Nocc2F 900 nmol/L, Nocc1P 50 nmol/L;

2: koncentracija Nocc1Rbis, Nocc2F 600 nmol/L, koncentracija sonde 50 nmol/L;

3: Nocc1Rbis, Nocc2F 300 nmol/L, Nocc1P 50 nmol/L;

4: Nocc1Rbis, Nocc2F 900 nmol/L, Nocc1P 100 nmol/L,

5: Nocc1Rbis, Nocc2F 600 nmol/L, Nocc1P 100 nmol/L koncentracija sonde 50 nmol/L,

6: Nocc1Rbis, Nocc2F 300 nmol/L, Nocc1P 100 nmol/L,

7-12: negativne kontrole

Vsi rezultati dobljeni s PCR v realnem času za določanje lešnika, so bili pozitivni ne glede na koncentracijo sonde v reakcijski mešanici (slika 12). Pri vzorcih, označenih z 1, 3, 4, 5, 6 na sliki 12 so bile vrednosti C_t nižje od vrednosti C_t vzorca, ki je označen z 2. Predvidevamo, da je takšen rezultat lahko posledica slabe učinkovitosti reakcije ali manjše nenatančnosti. Negativni rezultat vzorcev označenih od 7 do 12 je pravilen, saj je reakcijski mešanici namesto DNK, bila dodana H_2O_{PCR} . Za vse nadaljnje analize s PCR v realnem času za določanje lešnika v reakcijskih mešanicah smo uporabili 50 nmol/L sonde Nocc1P in 300 nmol/L oligonukleotidnih začetnikov Nocc2F in NoccRbis (preglednica 4).

Preglednica 4: Vrednosti Ct za določanje lešnika z različnimi koncentracijami sonde (Nocc1P) in oligonukleotidnih začetnikov (Nocc2F, Nocc1Rbis) pri PCR v realnem času

VZOREC	OZNAKA MEŠANICE ZA PCR	KONCENTRACIJE SONDE IN OLIGONUKLEOTIDNIH ZAČETNIKOV (nM)	POVPREČNA VREDNOST Ct n=2	STANDARDNI ODKLON C _t
Lešnik 4	A	50 / 900	23,30	0,12
negativna kontrola			negativno	-
Lešnik 4	B	50 / 600	25,70	0,25
negativna kontrola			negativno	-
Lešnik 4	C	50 / 300	22,97	0,20
negativna kontrola			negativno	-
Lešnik 4	D	100 / 900	22,72	0,62
negativna kontrola			negativno	-
Lešnik 4	E	100 / 600	22,16	0,03
negativna kontrola			negativno	-
Lešnik 4	F	100 / 300	22,37	0,04
negativna kontrola			negativno	-

Legenda: Lešnik 4 - lešniki jedra, Odlično

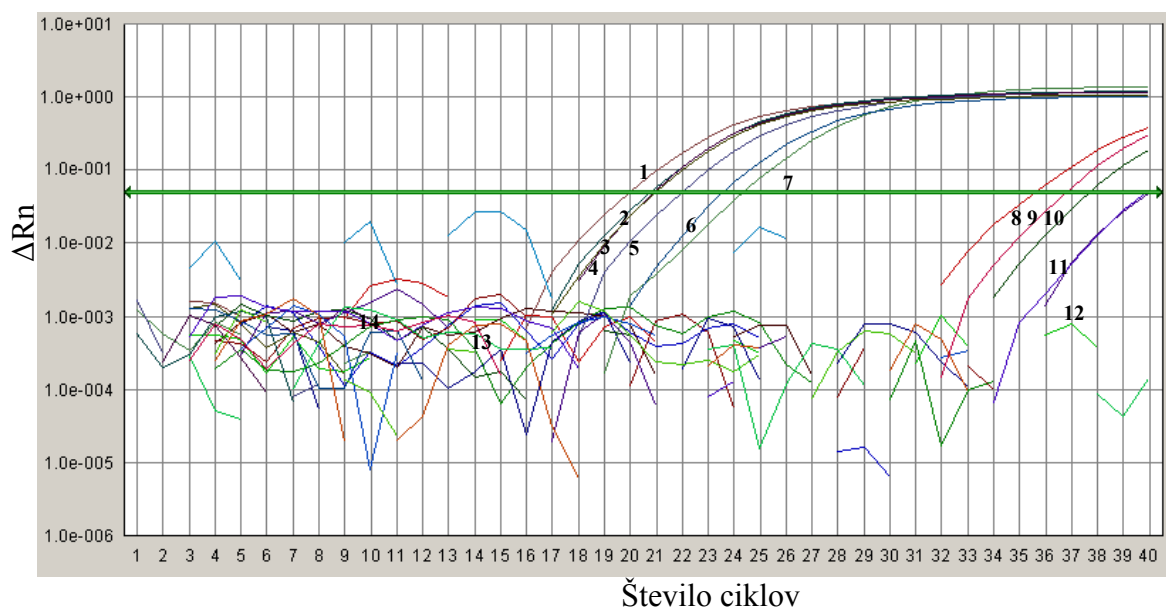
V našem eksperimentalnem delu, je bila kot optimalna določena koncentracija sonde Nocc1P 50 nmol/L. Enako koncentracijo so uporabili že Bettazzi in sod. (2008), Piknova in sod. (2007) pa so za določanje lešnika s PCR v realnem času uporabili višjo koncentracijo sonde (200 nmol/L). Terpin (2010) je prav tako s PCR za določanje oreha uporabila enako koncentracijo sonde JugL (50 nmol/L).

4.2 SPECIFIČNOST PCR V REALNEM ČASU ZA DOLOČANJE LEŠNIKA

Specifičnost PCR v realnem času za določanje lešnika smo določali tako, da smo izolirali DNK iz različnih vzorcev lešnika, arašida, oreha ter makadamija oreščka in preverili, ali ima omenjeno lupinasto sadje gen *Hsp 1*, ki je specifičen za lešnik.

Pred izolacijo DNK vzorcev, smo le-te predhodno razmastili z acetonom. Z razmaščevanjem smo iz vzorcev odstranili maščobno fazo in si s tem olajšali izolacijo DNK. Izolacija DNK vzorcev po predhodnem razmaščevanju z acetonom je bila lažja, saj ni bilo maščobne faze, ki lahko moti izolacijo.

Iz rezultatov na sliki 13 je razvidno, da so bili rezultati encimske reakcije pri vzorcih označenih z **1** do **10** pozitivni, rezultati pri vzorcih označenih od **11** do **13** pa negativni. Vzorci označeni od **1** do **7** so bili vzorci lešnikov. Vzorci označen z **8**: oreh 1 (sorte Ronde di Montignac), **9**: makadamia orešček in z **10**: oreh 15 (mleti orehi) so prav tako pozitivni. Ta rezultat je pravilen, saj je bilo na embalaži navedeno, da lahko ti vzorci vsebujejo sledove lešnikov. Negativen rezultat pri vzorcih z **11**: arašid 3 (praženi), **12**: arašid 1 (pražen v lupini) je tudi pravilen, saj arašidi ne vsebujejo gena *Hsp 1*.



Slika 13: Specifičnost PCR v realnem času za določanje lešnika

Legenda:

ΔRn -normaliziran fluorescentni signal,

1: lešnik 1 (lešnik sorta Butler), **2:** lešnik 4 (lešnik jedrca, Odlično), **3:** lešnik 6 (lešniki celi, letnik 2008), **4:** lešnik 5 (mleti lešniki, Hrib d.o.o), **5:** lešnik 3 (sorta Noccone), **6:** lešnik 7 (lešniki celi, letnik 2007), **7:** lešnik 2 (sorta Mortarella, razredčen 10^{-2}), **8:** oreh 1 (sorta Ronde de Montignac), **9:** makadamia oreščki, **10:** oreh 15 (mleti orehi, Hrib, d.o.o), **11:** arašid 3 (praženi, Mercator), **12:** arašid 1 (pražen v lupini, Hrib, d.o.o), **13:** mandelj (blanširani Bimed), **14:** negativna kontrola.

Razlike v dobljenih vrednostih C_t pri vzorcih označenih od **1** do **7** so posledica različne učinkovitosti izolacije DNK iz posameznih vzorcev, medtem ko so veliko višje vrednosti C_t pri vzorcih označenih od **8** do **10** posledica prisotnosti zelo majhnih količin lešnika v vzorcih oreha in makadamija oreščkov (slika 13). Velja namreč, da čim je manjša vrednost C_t , več je prisotnega tarčnega gena in tudi, da je bila izolacija boljša. To pomeni, da je bilo več izolirane DNK ali da je bilo v reakcijski mešanici za PCR manj inhibitorjev, ki vplivajo na meritve (Applied Biosystems, 2004).

Specifičnost encimske reakcije za določanje lešnika je razvidna iz preglednice 5. Vse sorte lešnika so bile pozitivne. Negativen rezultat pri vzorcih arašid 1 (pražen v lupini) in pri blanširanih mandljih, je pravilen in pomeni, da pri teh vzorcih nismo določili prisotnosti lešnika v sledovih. Pozitivne vrednosti C_t , pomenijo prisotnost iskanega alergena (lešnik) pri preiskovanih vzorcih. Pozitiven rezultat pri vzorcu oreh 1 (čisti oreh, sorta Ronde di Montignac) lahko pomeni navzkrižno kontaminacijo v proizvodnji/pakirnici. Ker smo z eksperimentalnim delom določili gen *Hsp 1* v sedmih vzorcih lešnika in dveh vzorcih orehov ter vzorcu makadamija oreščka, ki so imeli deklarirano da lahko vsebujejo sledove drugega lupinastega sadja, ter v nobenem od vzorcev arašida in mandlja sklepamo, da je bil PCR v realnem času za določanje lešnika 100 % specifičen (preglednica 5).

Nukleinske kisline imajo svoj absorpcijski maksimum pri 260 nm, zato smo merili absorbanco pri tej valovni dolžini, saj smo hoteli določiti koncentracijo DNK v vzorcu. Za preverjanje čistosti izolirane DNK vzorca smo merili absorbanco pri 230 nm, 260 nm in 280 nm. Razmerja med izmerjenima valovnima dolžinama $A_{260/280}$ v razponu od 1,8 do 2,0 nam

povedo, da je izolirana DNK čista. V primeru, da je razmerje manjše kot 1,7 so v raztopini prisotni proteini ali fenoli (Nano-Drop spectrophometers, 2009).

Preglednica 5: Določitev specifičnosti PCR v realnem času za določanje lešnika

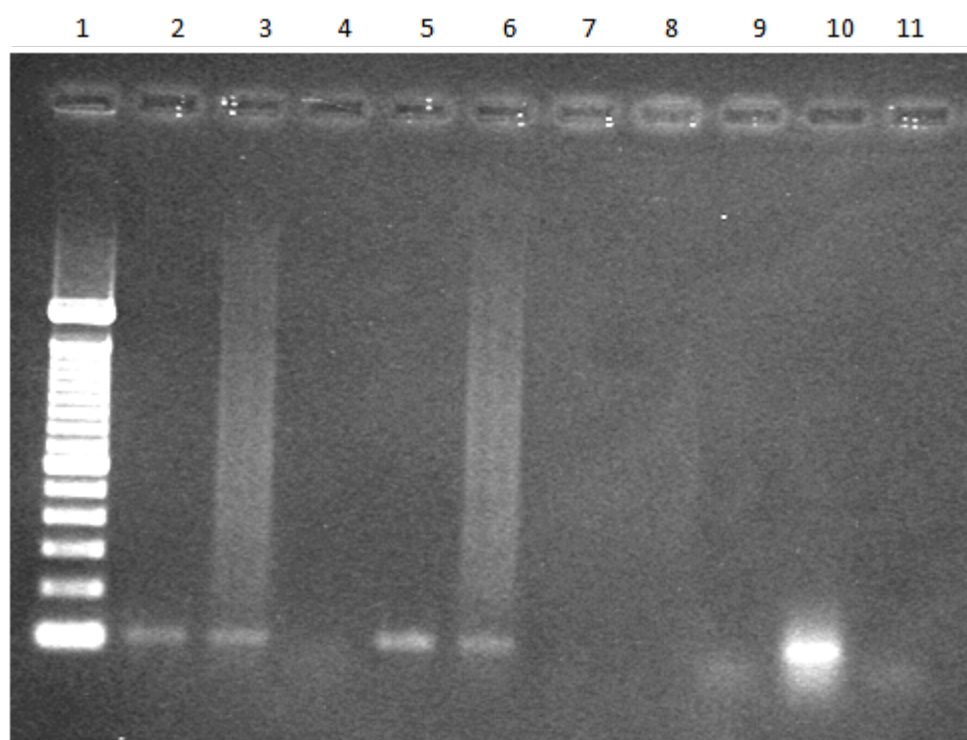
Vzorec	C (ng/μL)	A _{260/280}	A _{260/230}	Ct
lešnik 1, sorta Ronde di Montignac, 100 X R	83	1,65	1,25	20
lešnik 2, sorta Mortarella, 100 X R	82,95	1,65	1,23	24,30
lešnik 3, sorta Noccione	72,15	1,60	1,07	22,00
lešnik 4, lešnik jedrca, Odlično	117,65	1,72	1,27	20,78
lešnik 5, lešnik mleti, Hrib d.o.o	71,45	1,54	1,11	20,89
lešnik 6, lešnik celi, 2008	63	1,46	1,04	20,97
lešnik 7, lešnik celi, 2009	92,45	1,67	1,22	23,52
arašid 1, pražen v lupini, Hrib d.o.o.	72,6	1,47	0,96	-
arašid 3, praženi, Mercator	162,6	1,82	1,56	-
makadamia orešček	113	1,75	1,43	36,75
mandelj 2, beli, blanširani	62,05	1,38	0,87	-
oreh 1, sorta Ronde di Montignac	98,25	1,54	1,19	35,83
oreh 15, mleti orehi, Hrib d.o.o	113,1	1,73	1,39	37,62
NTC-neg.kontrola	-	-	-	-

Legenda: C- koncentracija, A- absorbanca, Ct- točka, kjer se krivulja fluorescence povzpne nad fluorescenco ozadja

Razmerje absorbance med izmerjenima valovnima dolžinama A_{260/230} nm se uporablja, kot sekundarno merjenje nukleinske čistosti. Vrednosti razmerja izmerjene absorbance A_{260/230} nm so pogosto višje od razmerja vrednosti valovnih dolžin A_{260/280} nm in to v razponu od 2 do 2,2. Če so vrednosti razmerja nižje, pomeni da so v vzorcu prisotni kontaminanti (fenol, aromatske snovi, trizol), ki absorbirajo pri valovni dolžini 230 nm (Nano-Drop spectrophometers, 2009).

Dobljeni rezultati (preglednica 5) povedo, da je izolirana DNK vzorcev, lešnik 2 (sorta Mortarella), lešnik 3 (sorta Noccione), lešnik 5 (mleti), lešnik 6 (cel, 2008), arašid 1 (pražen v lupini), mandelj 2 (bel, blanširan) in oreh 1 (sorta Ronde di Montignac), vsebovala še proteine in fenole. Spektrofotometrično izmerjene vrednosti so bile pod 1,7. Vzorca mandelj 2 (bel, blanširan) in lešnik 6 (cel, 2008), sta vsebovala največ primesi, saj so bile spektrofotometrično izmerjene vrednosti DNK mandlja 2 (beli blanširani) in lešnika 6 (cel lešnik, 2008) najnižje. Izolacija DNK nam je najbolje uspela pri vzorcu arašid 3 (praženi), saj je izmerjena DNK vzorca v mejah od 1,8 do 2,0. Zadovoljivo čisto DNK imajo še vzorci makadamia orešček, oreh 15 (mleti), lešnik 7 (cel, 2009) in lešnik 4 (jedrca).

Dobljene pomnožke smo dokazali še z gelsko elektroforezo. Na sliki 14 so prikazani rezultati gelske elektroforeze pomnožkov dobljenih s sondo Nocc1P (50 nM) in z oligonukleotidnimi začetniki Nocc1Rbis, Nocc2F (300 nM). Pomnožki so vsebovali DNK 100 % lešnika, DNK 0,1 % lešnika in DNK čistega lešnika (lešnik 6 iz lupine, 20068). Naredili smo 2 ponoviti vsakega vzorca.



Slika 14: Agarozna gelska elektroforeza specifičnih pomnožkov pridobljenih s PCR v realnem času za določanje lešnika

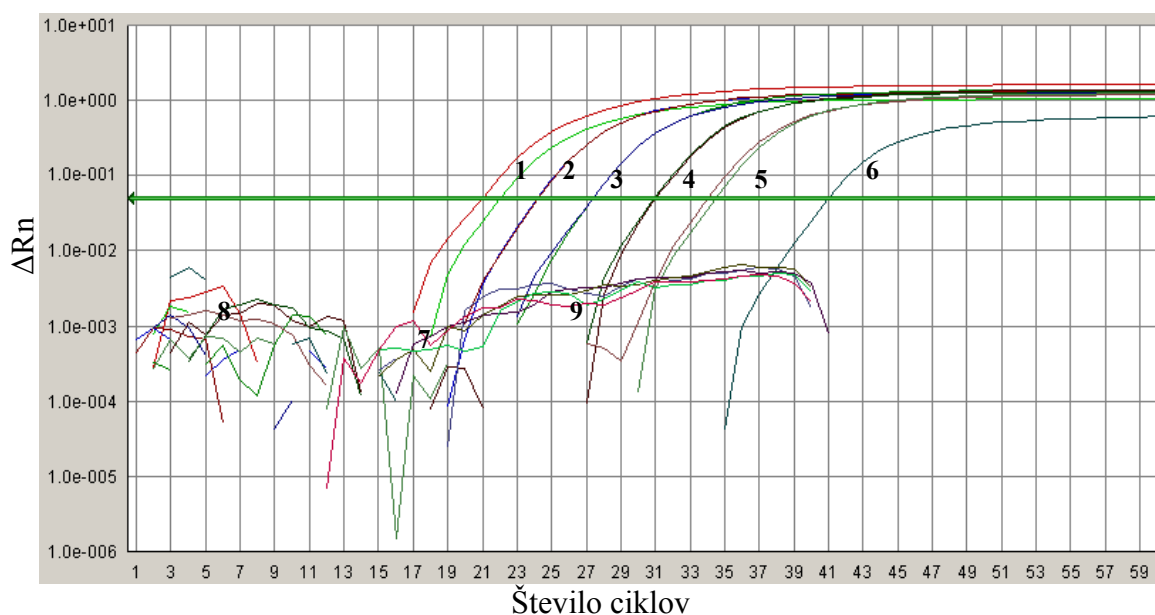
Legenda: **1:** molekularni označevalec pomnožkov DNK (100 bp DNK Ladder), **2:** 100 % lešnik, **3:** 0,1 % lešnik, **4:** negativna kontrola, **5:** 100 % lešnik, **6:** 0,1 % lešnik, **7:** negativna kontrola, **8:** lešnik 6 (celi lešniki v lupini), **9:** negativna kontrola, **10:** lešnik 6 (celi lešniki v lupini), **11:** negativna kontrola

Dobljeni pomnožki na progah 2, 3, 5, 6, 8, 9 imajo isto dolžino pomnožka 100 bp, v primerjavi z molekularnim označevalcem oziroma pozitivno kontrolo (proga 1). V vzorcih je bila prisotna DNK lešnika. Na podlagi teh rezultatov lahko trdimo, da je pomnoževanje specifično in da je bila izbrana koncentracija oligonukleotidnih začetnikov ustrezna. Pomnožki na progah 4 (negativna kontrola), 7 (negativna kontrola) in 11 (negativna kontrola) so bili negativni, prav tako pa ne vsebujejo pomnožka, saj je bila tem vzorcem namesto DNK dodana H_2O_{PCR} .

Naši rezultati (preglednica 5, slika 14) so primerljivi z že objavljenimi rezultati o specifičnosti PCR v realnem času za določanje lešnika. Piknova in sod. (2007) so izolirali DNK iz 20 različnih vzorcev živil in preverili ali so specifični na lešnik. Vsi vzorci, ki so vsebovali lešnik so bili pozitivni (7 vzorcev), vsi ostali (orehi, ameriški orehi, arašidi, indijski oreščki, mandlji, pistacija, sončnično seme, sezam, soja, kostanj, pšenica, riž, kakav) so bili negativni. Dobljeni podatki kažejo na specifičnost reakcije oziroma PCR v realnem času izvedene z oligonukleotidnima začetnikoma Nocc1Rbis, Nocc2F in sondo Nocc1P (Piknova in sod., 2007).

4.3 DOLOČITEV TEORETIČNE OBUČTLJIVOSTI PCR V REALNEM ČASU ZA DOLOČANJE LEŠNIKA

Za določitev teoretične občutljivosti PCR v realnem času, smo pripravili 10x- razredčitve DNK lešnika 4 (lešnik jedrca, Odlično) od 10^{-1} do 10^{-7} . Spektrofotometrično izmerjena koncentracija izolirane DNK lešnika je bila $90,5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ in s sedmimi razredčitvami smo vzorec redčili do $0,009 \text{ pg}/\mu\text{L}$. S tako pripravljenimi vzorci smo izvedli PCR v realnem času za določanje lešnika (slika 15). Mejo teoretične občutljivosti smo določili pri koncentraciji $0,9 \text{ pg}/\mu\text{L}$, pri kateri je bil rezultat še pozitiven. Območje kvantifikacije je od $90,5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ do $0,9 \text{ pg}/\mu\text{L}$. Vzorcju 9-NTC, je bila namesto DNK dodana $\text{H}_2\text{O}_{\text{PCR}}$.



Slika 15: Teoretična občutljivost PCR v realnem času za določanje lešnika

Legenda: ΔRn -normaliziran fluorescentni signal

1: Lešnik ($90,5 \text{ ng}/\mu\text{L}$), 2: Lešnik ($9,05 \text{ ng}/\mu\text{L}$), 3: Lešnik ($0,905 \text{ ng}/\mu\text{L}$), 4: lešnik ($90,5 \text{ pg}/\mu\text{L}$), 5: lešnik ($9,05 \text{ pg}/\mu\text{L}$), 6: lešnik ($0,905 \text{ pg}/\mu\text{L}$), 7: lešnik ($0,0905 \text{ pg}/\mu\text{L}$), 8: lešnik ($0,00905 \text{ pg}/\mu\text{L}$), 9: negativna kontrola

Vzorci označeni z 1 do 8 so bili 10 x-ne razredčitve DNK lešnika v območju od 10^{-1} do 10^{-7} (slika 15). Zadnji dve razredčitvi vzorca (slika 15, vzorca s št. 7 ($0,0905 \text{ pg}/\mu\text{L}$) in 8 ($0,00905 \text{ pg}/\mu\text{L}$)) s PCR v realnem času za določanje lešnika nismo zaznali. To pomeni, da je določena občutljivost PCR v realnem času za določanje lešnika $0,9 \text{ pg}/\mu\text{L}$ (preglednica 6). Z našimi poizkusi smo določili nižjo občutljivost kot pri že objavljenih metodah. Arlorio in sod. (2007), so kot najnižjo teoretično mejo določili $0,1 \text{ ng}$ DNK, Piknova in sod. (2007), so določili 13 pg DNK ter Terpin (2010), ki je s PCR za določanje oreha določila $3,88 \text{ pg}$.

Preglednica 6: Občutljivosti PCR v realnem času za določanje lešnika

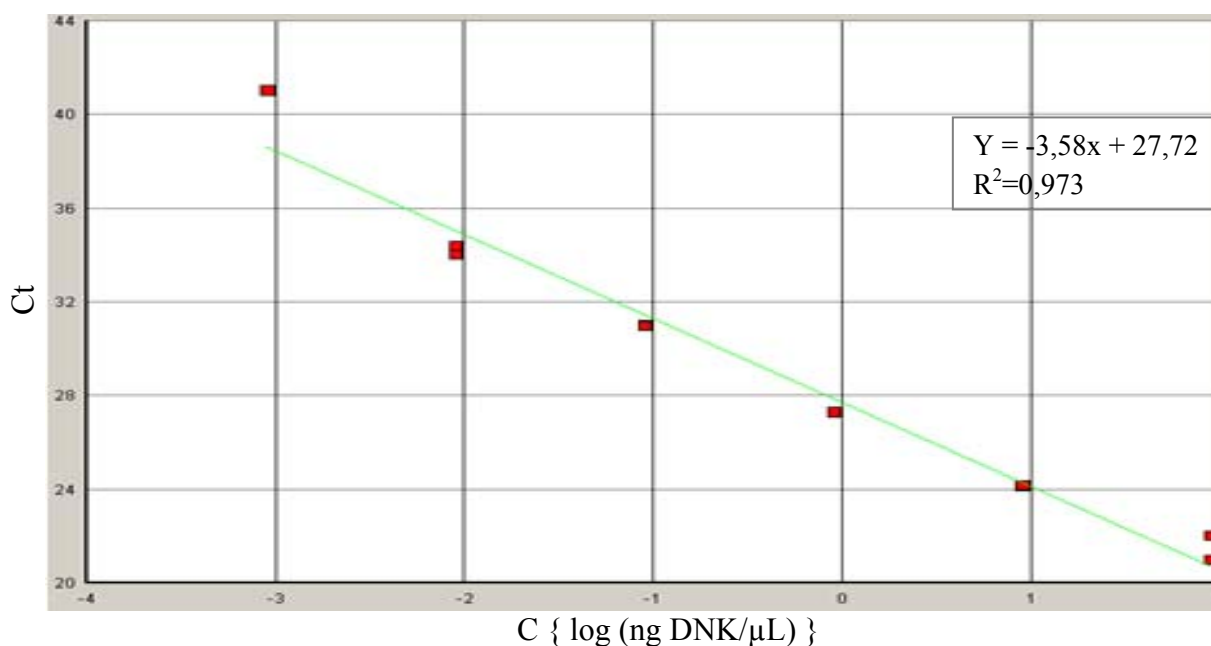
VZOREC	KONCENTRACIJA DNK lešnika (ng/ μ L)	VREDNOST C_t	ODKLON C_t VREDNOSTI
Lešnik 4, nerazredčen	90,5	21,00 22,01	0,716
Lešnik 4, 10xrazredčen	9,05	24,14 24,18	0,022
Lešnik4, 10^{-1} razredčen	0,905	27,31 27,28	0,023
Lešnik4, 10^{-2} razredčen	0,0905	31,02 30,96	0,040
Lešnik4, 10^{-4} razredčen	0,00905	34,03 34,39	0,259
Lešnik 4, 10^{-5} razredčen	0,000905	- 41,02	-
Lešnik 4, 10^{-6} razredčen	0,0000905	- -	-
NTC-negativna kontrola	-	-	-

Legenda: Lešnik 4- Lešniki jedrca, Odlično

Slika 16 prikazuje odvisnost vrednosti C_t od koncentracije čiste DNK lešnika. Z dobljenimi vrednostmi C_t s PCR v realnem času in s koncentracijo DNK lešnika v ng/ μ L, ki so razvidni iz preglednice 6, smo izračunali umeritveno krivuljo teoretične občutljivosti (3) za lešnik.

$$y = -3,58x + 27,72 \text{ oz. } C_t = -3,58 \log[C(\text{ng}/\mu\text{L})] + 27,72 \quad \dots 3$$

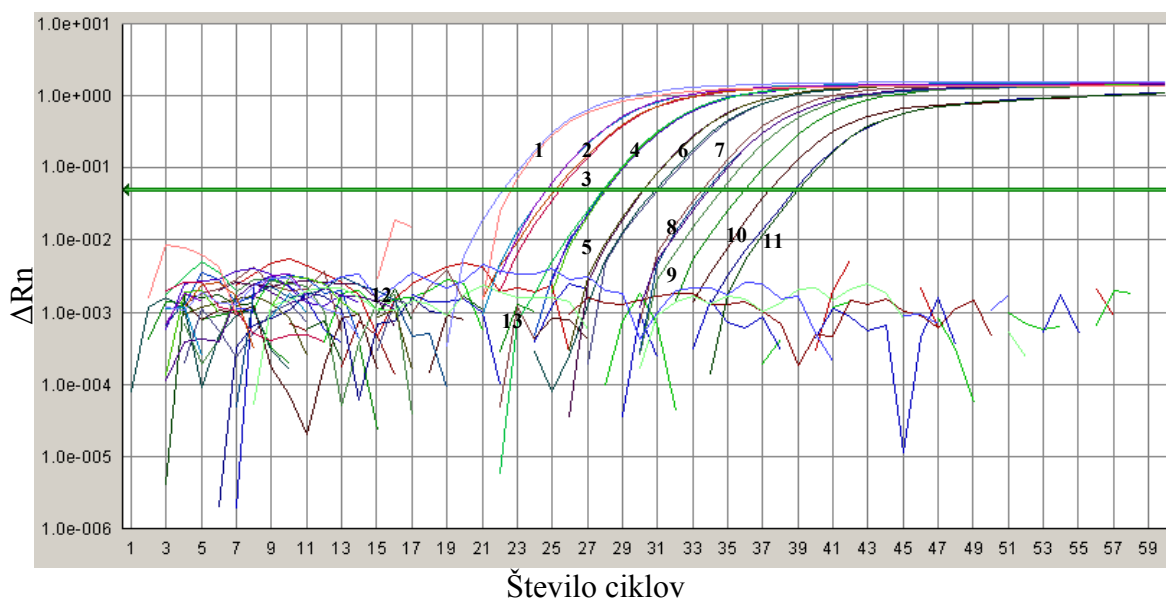
Y vrednost pomeni C_t posamezne razredčitve DNK, x vrednost pa desetiški logaritem koncentracije DNK v ng / μ L.

**Slika 16:** Umeritvena krivulja dobljena s čisto DNK lešnika

Naklon umeritvene krivulje (k) je bil $-3,58$, korelacijski koeficient pa (R^2) $0,973$. Učinkovitost reakcije smo izračunali po enačbi 2 in je znašala $90,3\%$, kar pomeni dobro učinkovitost reakcije PCR v realnem času. Korelacijski faktor R^2 premice je bil $0,97$ za območje kvantifikacije od $0,9$ pg do $90,5$ ng.

4.4 DOLOČITEV PRAKTIČNE OBČUTLJIVOSTI S PCR V REALNEM ČASU ZA DOLOČANJE LEŠNIKA

DNK lešnika smo izolirali iz standardnih lešnikovih mešanic. Za PCR v realnem času, smo vedno uporabili $5\ \mu\text{L}$ DNK vzorca. Koncentracija DNK vseh vzorcev v reakcijski mešanici je bila enaka, ($30\ \text{ng} / \mu\text{L}$). Dobljeni rezultati so razvidni iz slike 17, ki prikazuje PCR v realnem času za določanje lešnika v standardnih lešnikovih mešanicah.



Slika 17: Določanje lešnika v standardnih lešnikovih mešanicah

Legenda: ΔRn -normaliziran fluorescentni signal, standardne lešnikove mešanice: 1: lešnik 100 %, 2: lešnik 10 %, 3: lešnik 5 %, 4: lešnik 1 %, 5: lešnik 0,5 %, 6-lešnik 0,05 %, 7: lešnik 0,01 %, 8: lešnik 0,005 %, 9: lešnik 0,1 %, 10: lešnik 0,001 %, 11: lešnik 0,0005 %, 12: 0,0001 %, 13: negativna kontrola.

Dobljene visoke vrednosti C_t lahko pomenijo, da je v tem vzorcu prisotna zelo nizka koncentracija izolirane DNK. Nizke vrednosti C_t lahko pomenijo večjo koncentracijo izolirane DNK. Velja, da manjša kot je koncentracija DNK, več ciklov mora poteči, višja je vrednost C_t . Vrednost C_t je točka, kjer se krivulja fluorescence povzpne nad fluorescenco ozadja in označuje koliko ciklov je potrebnih, da se doseže meja zaznavanja. Vzorci kateri nimajo prisotne DNK v vzorcu se ne povzpnejo nad fluorescenco ozadja oziroma ne sekajo krivulje fluorescence na točki C_t . Rezultati vzorcev brez prisotnega DNK alergena v vzorcu so negativni.

Vrednosti C_t vzorcev označenih od 1 do 12, bi morale padati po vrsti. Rezultat vzorca (lešnik 100 %) ima najnižjo vrednost C_t , saj je vseboval 100 % lešnika, kar pomeni da je rezultat pravilen. Pri nižjih odstotkih dodanega lešnika (vzorci označeni od 6 do 12), C_t vrednosti ne

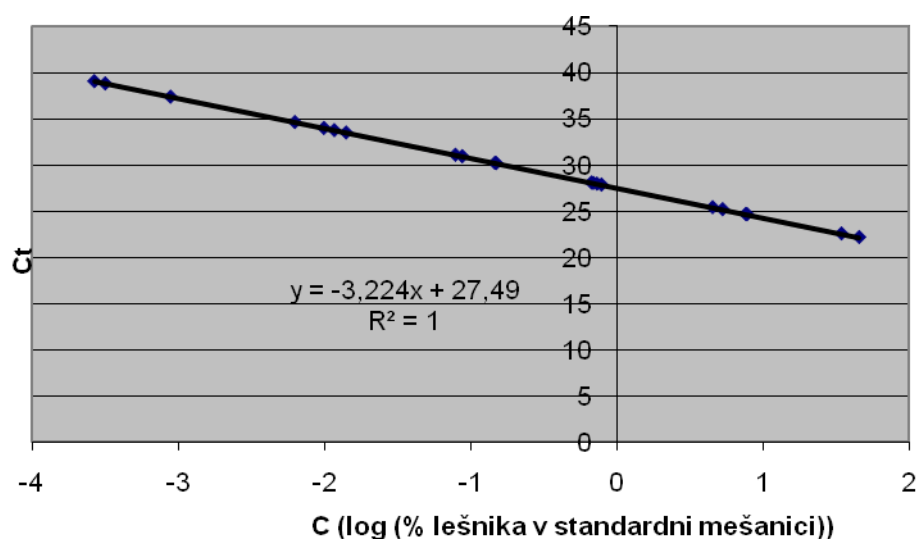
rastejo po vrsti (slika 17). Predvidevamo, da je do takšnega rezultata prišlo, ker nam ni uspelo doseči dovolj dobre homogenizacije standardnih lešnikovih mešanic. Negativen rezultat vzorca označenega z 12 (vsebnost DNK lešnika 0,0001 %), je lahko pravilen, kakor tudi nepravilen. Pravilen bi bil v primeru, če naša metoda ni dovolj občutljiva, da bi zaznala tako nizko vsebnost DNK lešnika v standardni mešanici. Nepravilen, pa v primeru, da nismo mogli zagotoviti dovolj dobre homogenizacije standardne mešanice. S PCR v realnem času, nam je uspelo določiti 0,0005 % lešnika v standardnih lešnikovih mešanicah. S PCR v realnem času smo dosegli zadovoljive rezultate.

Naši rezultati so primerljivi z rezultati drugih raziskovalcev, ki so določali lešnik s PCR v realnem času. Piknova in sod. (2007), so s metodo PCR v realnem času določili praktično mejo določljivosti lešnika v živilih 0,01 %. Prav tako so Koppel in sod. (2010) s PCR v realnem času določali praktično mejo 8 živilom, med katerimi je bil tudi lešnik, je bila 0,01 %. Arlorio in sod. (2008) so določili 0,01 % lešnika v živilih in Terpin (2010), ki je določila 0,01 % oreha v živilh.

Preglednica 7: Koncentracija lešnika v standardnih lešnikovih mešanicah z vrednostmi C_t

% DODANEGA LEŠNIKA	VREDNOST C_t
100	22,54 22,15
10	24,62 24,65
5	25,16 25,38
1	27,83 28,01
0,5	28,05 27,93
0,1	33,95 33,72
0,05	30,15 30,18
0,01	30,9 31,05
0,005	34,59 33,46
0,001	39,01 37,33
0,0005	38,77 36
0,0001	-

Slika 18 prikazuje odvisnost vrednosti C_t od desetiškega logaritma odstotka dodanega lešnika v standardnih lešnikovih mešanicah. Naklon umeritvene krivulje je bil $-3,224$, korelacijski faktor (R^2) je znašal 1.



Slika 18: Umeritvena krivulja dobljena s standardnimi lešnikovimi mešanicami

Izračunana učinkovitost je znašala 104,2 %, kar pomeni zelo dobro učinkovitost, saj je le ta v območju od 90-110 % (Pfaffl, 2004). Območje kvantifikacije od 0,0005 % do 100 %.

4.5 DOLOČITEV LEŠNIKA V ŽIVILIH S PCR V REALNEM ČASU

4.5.1 Kvalitativna določitev

Iz vzorcev različnih živil, smo s kompletom za izolacijo Nucleospin izolirali DNK in določili prisotnost lešnika v teh živilih s PCR v realnem času. Uporabili smo »plus/minus« analizo. To je kvalitativna analiza, s katero lahko določimo ali je iskana alergena sestavina prisotna ali ni prisotna v vzorcu. V našem primeru smo določili prisotnost (plus) oziroma odsotnost (minus) lešnika v živilih. Dobljeni rezultati določanja lešnika v vzorcih s PCR v realnem času so podani v preglednici 8. Zaradi boljše preglednosti so slike določanja vzorcev s PCR v realnem času podane v prilogah A, B in C.

Lešnik v sledovih so vsebovali vzorci (preglednica 8): horalky, speculass, orehovo čokoladno pecivo, musli keksi, vrhniške linške oči, čajno pecivo, vrhniško čajno pecivo, otroško veselje keksi, krašuljici, kakavove palčice, O`Cake, vafelj izdelek s kakavovo kremo oblit z mlečno čokolado, vafelj izdelek polnjen s kremo oblit z mlečno čokolado, čokolada z lešniki, bela čokolada s celimi lešniki in hrustljavim rižem in mlečna čokolada s celimi lešniki.

Vzorci Speculass, musli keksi, vrhniške linške oči, otroško veselje keksi, Krašuljici, kakavove palčice, vafelj izdelek s kakavovo kremo oblit z mlečno čokolado, vafelj izdelek polnjen s kremo oblit z mlečno čokolado, O`Cake, čokolada z lešniki, bela čokolada s celimi lešniki in hrustljavim rižem in mlečna čokolada s celimi lešniki so imeli na embalaži deklarirano, da so lahko prisotni lešnik, sledovi lešnika ali sledovi lupinastega sadja. Dobljeni pozitiven rezultat je pravilen. Z eksperimentalnim delom nam je uspelo dokazati sledove lešnika v živilih, kar je bil tudi namen diplomskega dela.

Vzorci Horalky, Čajno pecivo, Vrhniško čajno pecivo in orehovo čokoladno pecivo, so bili na iskani alergen pozitivni. Na deklaraciji niso imeli navedeno, da lahko vsebujejo sledove lupinastega sadja ali lešnika. Predvidevamo, da je lahko prišlo do navzkrižne kontaminacije teh vzorcev s vzorci z sledovi lupinastega sadja med samo proizvodnjo.

Preglednica 8: Rezultati določanja lešnika v vzorcih živil s PCR v realnem času in deklarirana vsebnost lešnika na izdelku

VZOREC ŽIVILA	REZULTAT S PCR v realnem času	Deklariranost lešnika na izdelku
O`Cake	+	6 %
Smoki	-	-
Horalky	+	-
Vaniljevi rogljički	-	sledi
Speculaas	+	sledi
Orehovi rogljički 2	-	sledi
Orehovo čokoladno pecivo	+	-
Kifeljčki z orehi	-	-
Orehovi rogljički 1	-	-
Musli keksi	+	lešniki
Domači orehovi keksi	-	-
Vrhniške linške oči	+	-
Domači prijatelj	-	-
Čajno pecivo	+	-
Vrhniško čajno pecivo	+	-
Otroško veselje keksi	+	sledi
Krašuljici, čajno pecivo s figovim in pomarančnim polnjenjem	+	sledi
Kakavove palčice	+	sledi
Vafelj izdelek s kakavovo kremo oblit z mlečno čokolado	+	lešniki
Vafelj izdelek polnjen z kremo oblit z mlečno čokolado	+	lešniki
Čokolada z lešniki	+	min. 25 % na celotno maso
Bela čokolada s celimi lešniki in hrustljivim rižem	+	23 %
Mlečna čokolada s celimi lešniki	+	23 %
Negativna kontrola	-	-

Legenda: + pozitiven rezultat, - negativen rezultat

4.5.2 Relativna kvantifikacija

Iz vzorcev živil smo izolirali DNK in nato spektrofotometrično določili koncentracijo DNK posameznega vzorca. Normalizirane koncentracije DNK smo analizirali s PCR v realnem času za določanje lešnika. Iz dobljenih vrednosti C_t smo iz umeritvene krivulje praktične občutljivosti (slika 18) izračunali % lešnika v posameznem vzorcu živila.

Koncentracijo DNK lešnika v posameznem vzorcu smo izračunali tako, da smo v enačbo $y = -3,224x + 27,492$ oziroma $C_t = -3,224 \log C + 27,492$ vnesli vrednosti C_t .

Preglednica 9: Vrednosti C_t in koncentracija lešnika v živih

VZOREC ŽIVILA	VREDNOST C_t	Izračunana vsebnost lešnika (%)	Deklarirana vsebnost lešnika (%)
O`Cake	37,42	+	6
Horalky	40,10	+	-
Speculaas	40,20	+	sledi
Orehovo čokoladno pecivo	37,63	< 1	-
Musli keksi	29,21	0,29	lešniki
Vrhniške linške oči	38,03	< 1	-
Čajno pecivo	36,29	< 1	-
Vrhniško čajno pecivo	35,74	< 1	-
Otroško veselje keksi	36,02	< 1	sledi
Krašuljici, čajno pecivo s figovim in pomarančnim polnjenjem	38,87	+	sledi
Kakavove palčice	34,21	< 1	sledi
Vafelj izdelek s kakavovo kremo oblit z mlečno čokolado	31,14	< 1	lešniki
Vafelj izdelek polnjen z kremo oblit z mlečno čokolado	38,85	< 1	lešniki
Čokolada z lešniki	23,34	19,4	min. 25 na celotno maso
Bela čokolada s celimi lešniki in hrustljivim rižem	22,78	28,94	23
Mlečna čokolada s celimi lešniki	22,80	28,53	23
Negativna kontrola	-	-	-

Legenda: +*: vzorci izven območja kvantifikacije, - : glede na deklaracijo izdelek ne vsebuje lešnika

Glede na deklarirano vsebnost lešnika, bi najvišjo izračunano koncentracijo DNK lešnika moral imeti vzorec čokolada z lešniki. Izračunana koncentracija DNK lešnika vzorca čokolada z lešniki je nižja od deklarirane. Prav tako je bila izračunana koncentracija DNK lešnika nižja od deklarirane pri vzorcu O`Cake. Najnižje izmerjene vrednosti C_t sta imela vzorca Bela čokolada s celimi lešniki in hrustljivim rižem in Mlečna čokolada s celimi lešniki. Izračunana koncentracija DNK lešnika je bila višja od deklarirane. Vsebnosti določene s PCR v realnem času niso enake deklariranim.

Izmerjene vrednosti C_t vzorcev (Vrhniške linške oči, Vrhniško čajno pecivo, Čajno pecivo, Orehovo čokoladno pecivo, Horalky) s PCR v realnem času so bile pozitivne glede na iskani tarčni gen *Hsp 1*, kar pomeni, da smo v teh vzorcih našli sledove lešnika. Vzorci Vrhniške linške oči, Vrhniško čajno pecivo, Čajno pecivo, Orehovo čokoladno pecivo, Horalky, na embalaži niso imeli deklarirano, da vsebujejo lešnik ali da so lahko prisotni sledovi lupinastega sadja.

Vaniljevi rogljički in Orehovi rogljički 2, sta vzorca, katera sta na embalaži imela deklarirano, da lahko izdelek vsebuje sledove lupinastega sadja. S PCR v realnem času za določanje lešnika, sledi alergena nismo zaznali.

Rezultati vzorcev O`Cake, Horalky, Speculaas in Krašuljici niso zanesljivi, saj so bili izven območja kvantifikacije.

Iz dobljenih rezultatov (preglednica 9) je razvidno, da vsebnosti določene s PCR v realnem času za določanje lešnika niso vedno enake deklariranim vrednostim. Vsebnost lešnika v posameznem izdelku bi morali preveriti še s kakšno drugo analitsko metodo. Do razlik je

lahko prišlo tudi zaradi prisotnih inhibitorjev PCR. Inhibitorji, pa so posledica premalo učinkovite izolacije DNK iz posameznega živila.

Za natančno kvantifikacijo se uporabljajo standardi, med katerimi ločimo zunajo kontrolo in notranji standard. Notranji standard je del tarčne DNK, ki se pomnožuje istočasno v isti epruvetki za PCR v realnem času kot tarčna DNK z enakima oligonukleotidnima začetnikoma (Mackay, 2004). Če bi za umeritveno krivuljo uporabili referenčne standarde, bi dobili pravilnejše rezultate, prav tako, pa bi dobili pogled na učinkovitost pomnoževanja v vsaki reakciji.

Speculaas, Otroško veselje keksi, Krašuljici čajno pecivo s figovim in pomarančnim polnjenjem, Kakavove palčice, Musli keksi, so vzorci kateri so na embalaži imeli deklarirano da lahko vsebujejo sledove lešnika ali lupinastega sadja. Vafelj izdelek s kakavovo kremo oblit z mlečno čokolado in Vafelj izdelek polnjen z kremo oblit z mlečno čokolado sta na embalaži imela deklarirano, da lahko vsebujeta lešnik in da lahko vsebujeta sledove drugih oreščkov. S PCR v realnem času za določanje lešnika nam je v teh vzorcih uspelo določiti sledove lešnika. Rezultati pridobljeni s PCR v realnem času, so primerljivi z deklariranimi vrednostmi.

5 SKLEPI

Lešnik (*Corylus avellana* L.), kot alergen v živilih smo določali s PCR v realnem času. Na podlagi eksperimentalnega dela in dobljenih rezultatov lahko povzamemo, da:

- so sonda Nocc1P in oligonukleotidna začetnika Nocc1Rbis, Nocc2F specifični za določanje lešnika,
- so optimalne razmere pomnoževanja specifičnega dela proteina pri koncentraciji sonde 50 nmol/l in pri koncentraciji oligonukleotidnih začetnikov Nocc1Rbis in Nocc2F 300 nmol/μL,
- je občutljivost PCR v realnem času za določanje sledov lešnikov 0,9 pg,
- je učinkovitost izolacije DNK iz lešnika in različnih živil po predhodni razmastitvi vzorca s kompletom Nucleospin odvisna od vrste živila,
- da lahko v standardnih lešnikovih mešanicah s PCR v realnem času določimo do 0,0005 % lešnika,
- PCR v realnem času omogoča določitev sledov lešnika v živilih.

6 POVZETEK

Glavni namen diplomskega dela, je bil določiti sledove lešnika (*Corylus avellana* L.) kot alergena v živilih s PCR v realnem času. Lešnik je v prilogi 4 Pravilnika o splošnem označevanju predpakiranih živil (2004) označen kot sestavina, ki lahko povzroča alergijo. Alergeni v lešniku so Cor a 1, Cor a 2, Cor a 8, Cor a 9, Cor a 10, Cor a 11, Cor a 12 in Cor a 13. Najpogostejši alergen lešnika je Cor a 2 (Allergome, 2011). Zaradi vsebnosti alergenih proteinov, predstavlja lešnik nevarnost za potrošnike z alergijo na lešnik.

Da smo lahko določili lešnik kot alergen v živilu, smo najprej izbrali sondo (Nocc1P) in oligonukleotidne začetnike (Nocc2F, Nocc1Rbis), ki so specifični za gen *Hsp 1*, kateri kodira protein toplotnega šoka z nizko molekulsko maso. Optimalne razmere smo določili s pripravo mešanic za PCR v realnem času z različnimi koncentracijami sonde in oligonukleotidnih začetnikov in izbrali najbolj ustrezno, glede na dobljeni rezultat. Določena optimalna koncentracija sonde je bila 50 nmol/L, koncentracija oligonukleotidnih začetnikov pa 300 nmol/l. DNK lešnika in DNK živil smo izolirali z izolacijskim kompletom Nucleospin. Da smo dosegli boljšo in kakovostnejšo izolacijo, smo vzorce predhodno razmastili z acetonom. Koncentracijo DNK smo določili spektrofotometrično.

Za določitev specifičnosti encimske reakcije PCR v realnem času, smo izolirali DNK različnih sort lešnika, DNK arašida, DNK oreha, DNK mandlja in DNK makadamia oreščka. Encimska reakcija je bila pozitivna na vse vrste lešnika. Reakcija je bila pozitivna tudi pri vzorcih oreh 1 (sorta Ronde de Moningac), makadamia oreščkih in orehu 15 (mleti orehi). Pozitiven rezultat pri orehu 1 je nepravilen, zato predvidevamo, da je v tem primeru prišlo do navzkrižne kontaminacije. Ostali rezultati so pravilni, saj je bilo na embalaži navedeno, da lahko vsebujejo izbrani vzorci še kakšne druge oreščke. Na podlagi omenjenih rezultatov lahko potrdimo postavljeno hipotezo. Uspelo nam je določiti sledove lešnika v vzorcih. Ugotovili smo, da je PCR v realnem času z izbrano sondo Nocc1P in izbranimi oligonukleotidnima začetnikoma Nocc2F, Nocc1Rbis specifičen za lešnik. Nato smo čisto DNK lešnika razredčili in določili občutljivost metode PCR v realnem času za določanje čistega lešnika. Dosežena občutljivost encimske reakcije je bila 0,9 pg.

Standardne lešnikove mešanice smo pripravili tako, kot navajajo Wang in sod. (2009), v območju od 0,0001 % do 100 % vsebnosti alergena. Mešanice smo dobro homogenizirali. Iz standardnih mešanic alergena in moke smo nato izolirali DNK in koncentracije DNK določili spektrofotometrično. Iz spektrofotometrično določenih koncentracij DNK iz standardnih lešnikovih mešanic smo za PCR v realnem času pripravili razredčene DNK z enako koncentracijo DNK, to je 30 ng/μL. V standardnih mešanicah smo s PCR v realnem času določali lešnik in iz vrednosti C_t ugotavljali, ali se z različnim odstotkom alergena v mešanici vrednost C_t spreminja. Narisali smo graf odvisnosti C_t vrednosti od desetiškega logaritma koncentracije oreha v standardni mešanici [$\log (\%)$]. Hkrati smo določili tudi občutljivost PCR v realnem času v standardnih lešnikovih mešanicah (0,0005 %). Za zaključek raziskovalnega dela, smo izolirali DNK iz vzorcev živil slovenskega tržišča. Preverili smo dobljene rezultate z deklariranimi vrednostmi. Pozitivno dobljeni rezultati so bili vsi vzorci, ki so imeli na deklaraciji naveden lešnik. Nekateri vzorci, ki na deklaraciji niso imeli zavedenega lešnika in so bili prav tako pozitivni. Predvidevamo, da je prišlo do navzkrižne kontaminacije ali da je bil celo izdelek neprimerno označen in vsebuje lešnik v sledovih. Naša metoda za določanje sledov alergena v živilu je bila dovolj specifična, da smo lahko zaznali sledove lešnika, kar pa je bil tudi namen diplomskega dela.

7 VIRI

- Ahn S. J., Costa J., Emanuel R. J. 1996. PicoGreen quantitation of DNA: Effective evaluation of samples pre- of post- PCR. *Nucleic Acid Research*, 24: 2623-2625
- Alasalvar C., Amaral J.S., Shahidi F., 2006. Functional lipid characteristics of Turkish Tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 10177–10183
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2002. The adaptive immune system, B cell and antibodies. V: *Molecular biology of the cell*. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (eds.). New York, Taylor and Francis Group: 1552-1557
- Allergome. 2011. Allergen databases. Latina, Allergy Data laboratories: Database. http://www.allergome.org/script/dettaglio.php?id_molecule=232 (avgust 2011)
- Arlorio M., Cereti E., Cod'sson J.D., Travaglia F., Martelli A. 2007. Detection of hazelnut (*Corylus* spp.) in processed foods using real-time PCR. *Food Control*, 18: 140-148
- Applied Biosystems. 2004. Real-Time PCR Systems, 7900HT Fast Real-Time PCR System and 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR Systems: Chemistry guide. Carlsbad, Life Technologies: 3-1 – 3-50
- Bettazzi F., Lucarelli F., Palchetti I., Berti F., Marrazza G., Mascinia M. 2008. Disposable electrochemical DNA-array for PCR amplified detection of hazelnut allergens in foodstuffs. *Analytica Chimica Acta*, 614: 93–102
- BioRad. 2006. Real-time PCR application guide. München, Life Science Group: 1-44 <http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-guide-bio-rad.pdf> (december, 2011)
- Breitender H. 2006. Classifying food allergens. V: *Detecting allergens in food*. Koppelman S.J., Hefle S.L. (eds.). Cambridge, Woodhead Publishing Limited: 23-44
- Cristofori V., Ferramondo S., Bertazza G., Bignami C. 2008. Nut and kernel traits and chemical composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88: 1091-1098
- Čadež N., Štorman A. 2004. Metodologija mikrobiološke analitike z poudarkom na novejših mikrobioloških metodah. V: *Varnost živil. 22. Bitenčevi živilski dnevi*. Radenci, 18. in 19. marec 2004. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 81-89
- Diaz-Amigo C., Popping B. 2010. Detection of food allergens. V: *Molecular biological and immunological techniques and applications for food chemists*. Popping B., Diaz-Amigo C., Hoenicke K. (eds.). Hoboken, John Wiley & Sons, Inc: 175-198

Directive 2003/89/EC of European Parliament and the Council of 10 November 2003 in 2000/13/EC as regards of the ingredients present in foodstuffs. 2003. Official Journal of the European Union, 46, L 308: 10-20

Directive 2005/26/EC establishing a list of food ingredients or substances provisionally excluded from Annex IIIa of Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council. 2005. Official Journal of the European Union, 48, L 75:33-34

Directive 2006/142/EC amending Annex IIIa of Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council listing the ingredients which must under all circumstances appear on the labelling of foodstuffs. 2006. Official Journal of the European Union, 49, L 368: 110-111

Directive 2007/68/EC amending Annex IIIa to Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council regards certain food ingredients. 2007. Official Journal of the European Union, 50, L 310: 11-14

Ehn B.M., Ekstrand B., Bengtsson U., Ahlstedt S. 2004. Modification of IgE binding during heat processing of the cow's milk allergen h-lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 398-1403

Elsanhoty R. M., Ramadan M. F., Jany K. D. 2010. DNA extraction methods for detecting genetically modified foods: A comparative study. *Food Chemistry*, 126, 4: 1883-1889

Fielder R., Higgs W., Barden K. 2010. Nut allergen detection. V: *Molecular biological and immunological techniques and applications for food chemists*. Popping B., Diaz-Amigo C., Hoenicke K. (eds.). Hoboken, John Wiley & Sons, Inc: 377-405

Fraga D., Meulia T., Fenster S. 2008. *Real-Time PCR: Current protocols essential laboratory techniques*. Ohio, John Wiley & Sons, Inc: 10.3.1-10.3.34

Germini A., Scaravelli E., Lesignoli F., Sforza S., Corradini R., Marchelli R. 2005. Polymerase chain reaction coupled with peptide nucleic acid high-performance liquid chromatography for the sensitive detection of traces of potentially allergenic hazelnut in foodstuffs. *European Food Research and Technology*, 220, 5-6: 619-624

Greiner R., Konietzny U. 2007. Modern molecular methods (PCR) in food control: GMO, pathogens, species identification, allergens. *World of Food Science*, 3: 8 str. <http://www.worldfoodscience.org/cms/?pid=1003869> (avgust, 2011)

Gruehn S., Suphioglu C., O' Hehir R.E., Volkmann D. 2003. Molecular cloning and characterization of hazel pollen protein (70 kD) as a luminal binding protein (BiP): a novel cross-reactive plant allergen. *International Archives of Allergy and Immunology*, 131, 2: 91-100

Hansen K.S., Ballmer-Weber B.K., Lüttkopf D., Skov P.S., Wüthrich B., Bindslev-Jensen C., Vieths S., Poulsen L.K. 2003. Roasted hazelnuts-allergenic activity evaluated by double-blind, placebo-controlled food challenge. *Allergy*, 58, 2: 132-138

- Heeres H. 2006. EU regulation of undeclared allergens in food procedures. V: Detecting allergens in food. Koppelman S.J., Hefle S.L. (eds.). Cambridge, Woodhead Publishing Limited: 380-403
- Herman L., Block J.D., Viane R. 2003. Detection of hazelnut DNA traces in chocolate by PCR. *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 6: 540-633
- Holzhauser T., Stephan O., Vieths S. 2002. Detection of potentially allergenic hazelnut (*Corylus avellana*) residues in food: A comparative study with DNA PCR-ELISA and protein sandwich-ELISA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5808-5815
- Holzhauser T. 2006. Polymerase chain reaction (PCR) methods for the detection of allergenic foods. V: Detecting allergens in food. Koppelman S.J., Hefle S.L. (eds.). Cambridge, Woodhead Publishing Limited: 125-140
- Huang J., Honda W. 2010. CED: A conformational epitope database. London, BMC Immunology, BioMed Central, 7: 1-8
- IVZ RS. 2010. Realizacija terciarne dejavnosti v letu 2009. Poročilo o subspecialnih laboratorijev Inštituta za varovanje zdravja Republike Slovenije. Nacionalni registri in nacionalne evidence. Ljubljana, IVZ RS Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 10-25
http://www.ivz.si/javne_datoteke/datoteke/2165-letnocporoc09cterciarkratko.pdf (avgust, 2011)
- Koppel R., Dvorak V., Zimmerli F., Breitenmoser A., Eugster A., Waiblinger H.S., 2010. Two tetraplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from eight allergens in food. *European Food Research Technology*, 230: 367-374
- Koppelman S. 2006. Detecting tree nuts and seed in food. V: Detecting allergens in food. Koppelman S.J., Hefle S.L. (eds.). Cambridge, Woodhead Publishing Limited: 202-217
- Kuchta T. 2006. Polymerase chain reaction as a method for food analysis. V: Application of polymerase chain reaction to food analysis. Kuchta T., Drahovska H., Pangallo D., Siekel P. (eds.). Bratislava VUP, Research Institute: 13-24
- LightLabs. 2011. 100bp – 1,5kb DNA ladder, original form. Dallas, LightLabs: Database.
<http://www.lightlabsusa.com/100-bp-1.5kb-DNA-Ladder-Original-Form.html> (november 2011)
- Macherey-Nagel. 2008. Genomic DNA from food: Protocol for genomic DNA purification from food: user manual. Düren, Macherey-Nagel: 13 – 14
- Mackay I.M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10: 190-212
- Mackay I.M, Mackay J.F., Nissen M.D., Sloots T.P., 2007. Real-time PCR: History and fluorogenic chemistries. V: Real-time PCR in microbiology: from diagnosis to characterization. Mackay I.M. (ed.). Norfolk, Caister Academic Press: 1-25

- Mills E.N.C., Moreno J., Sancho A., Jenkins J.A. 2004. Processing approaches to reducing allergenicity in proteins. V: Proteins in food processing. Jada R.Y. (ed.). Cambridge, Woodhead Publish Limited: 403-406
- Monagas M., Garrido I., Lebron-Aguilar R., Gomez-Cordovés M.C., Rybarczyk A., Amarowicz R., Bartolomé B. 2009. Comparative flavan-3-ol profile and antioxidant capacity of roasted peanut, hazelnut and almond skins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 10590-10599
- Moreira D., 1998. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. *Nucleic Acids Research*, 26, 13: 3309–3310
- Nano-Drop Spectrophotometers. 2009. 260/280 and 260/230 Ratios. Thermo Fisher Scientific-NanoDrop products. T042□Technical bulletin, Rev 2/09. Wilmington, Delaware: 1-2
<http://www.phenogenomics.ca/transgenics/docs/NanoDrop%20Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf> (december 2011)
- NCBI. 1999. Nucleotide database. Bethesda, National Center for Biotechnology Information: Database.
www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF021807.1 (december, 2011)
- Olivera I., Sousa A., Sa´Morais J., Ferreira I.C.F.R., Bento A., Estevinho L., Pereira J.A. 2008. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities of tree hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 1801-1807
- Odzemir M., Ackurt F., Yildiz M., Biringen G., Gurcan T., Locer M. 2001. Effect roasting on some nutrients of hazelnuts (*Corylus avellana* L.). *Food Chemistry*, 73, 2: 185-190
- Pajk Žontar T. 2006. Označevanje alergenih sestavin v hrani. *Revija Vip*, 16, 10: 11-14
- Pastorello E.A., Vieths S., Pravettoni V., Farioli L., Trambaioli C., Fortunato D., Lüttkopf D., Calamari M., Ansaloni R., Scibilia J., Ballmer-Weber B.K., Poulsen L.K., Wütrich B., Hansen K.S., Robino A.M., Ortolani C., Conti A. 2002. Identification of hazelnut major allergens in sensitive patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 109, 3: 563–570
- Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT PCR. *Nucleic Acid Research*, 29, 9: 2002-2007
- Pfaff M.W. 2004. Quantification strategies in real-time PCR. V: A-Z of quantitative PCR. Bustin S.A. (ed.). La Jolla, CA, International University Line: 87–112
- Piknova L., Pangallo D., Kutcha T. 2007. A novel real-time polymerase chain reaction (PCR) method for detection of hazelnuts in food. *European Food Research and technology*, 226, 5: 1155-1158
- Pinto A. D., Forte V.T., Guastadisegni M.C., Martino C., Schena F.P., Tantillo G. 2007. A comparison of DNA extraction methods for food analysis. *Food Control*, 18: 76-80

- Pravilnik o splošnem označevanju predpakiranih živil. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 50: 6751-6761
- Rakoski J. 1998. Specialistična posvetovalnica: Alergije spoznavanje, zdravljenje, preprečevanje. Logatec, Kele & Kele: 16-105
- Sambrook J. 1989. Commonly used techniques in molecular cloning. Appendix E.5. V: Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. (eds.). New York, Cold Spring Harbor Press: 834-850
- Sancin V. 1988. Sadje z našega vrta. Trst, Založništvo tržaškega tiska: 245-252
- Sathe S. K., Teuber S. S., Roux K. H. 2005. Effects of food processing on the stability of food allergens. Biotechnology Advances, 23: 423-429
- Sauders N.A. 2004. An introduction to real-time PCR. V: Real time PCR: An essential guide. Edwards K., Logan J., Sauders N.A. (eds.). Wymondham, Horizon Bioscience: 1-11
- Shipley G.L. 2006. An introduction to real-time PCR. V: Real-time PCR: Advanced methods. Dorak M.T. (eds.). New York, Taylor and Francis Group: 1-30
- Taylor S. 2006. The nature of food allergy. V: Detecting allergens in food. Koppelman S.J., Hefle S.L. (eds.). Cambridge, Woodhead Publishing Limited: 7-16
- Terpin P. 2010. Določanje oreha kot alergenov s PCR v realnem času. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 40-51
- Vickers T. 2010. PCR inhibitors: Competitive inhibition. San Francisco, MCB Project, Wikimedia Foundation: 1 str.
http://openwetware.org/wiki/Image:Inhibitor_schematic.png (avgust, 2011)
- Vozej M. 2000. Temelji imunologije. Ljubljana, DZS: 405-420
- Wang H., Yuan F., Wu Y., Yang H., Xu B., Liu Z., Chen Y. 2009. Detection of allergen walnut component in food by an improved real-time PCR method. Journal of Food Protection, 72, 11: 2433-2435
- Wensing M., Penninks A.H., Hefle S.L., Akkerdaas J. H., Van Ree R., Koppelman S.J., Bruijnzeel-Koomen C.A., Knulst A.C. 2002. The range of minimum provoking doses in hazelnuts-allergic patients as determined by double-blind, placebo-controlled food challenges. Clinical and Experimental Allergy, 32: 1757-1762
- Wigotzki M., Steinhart H., Paschke A. 2002. Influence of varieties, storage and heat treatment on IgE-binding proteins in hazelnuts (*Corylus avellana*). Food and Agricultural Immunology, 12: 217-229

Wraber B. 2004. Prehranske alergije in prehranski alergeni. V: Varnost živil. 22. Bitenčevi živilski dnevi. Radenci, 18. in 19. marec 2004. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 65-74

ZPS. 2007. Označevanje alergenih snovi v hrani. Ljubljana, Zveza potrošnikov Slovenije: 5 str.

<http://www.zps.si/hrana-in-pijaca/oznacevanje-zivil/oznacevanje-alergenih-snovi-v-hrani-2.html?Itemid=413> (november, 2011)

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici, izr. prof. dr. Barbari Jeršek za izjemno podporo, stokovno pomoč, usmerjanje, potrpežljivost, nasvete in za ves vložen trud.

Za opravljeno recenzentsko delo se zahvaljujem prof. dr. Marjanu Simčiču.

Petri Terpin se zahvaljujem za pomoč pri uvajanju, usmerjanju, izvedbi eksperimentalnega dela in vzpodbudo.

Saši Piskernik se zahvaljujem za pomoč pri izvedbi eksperimentalnega dela.

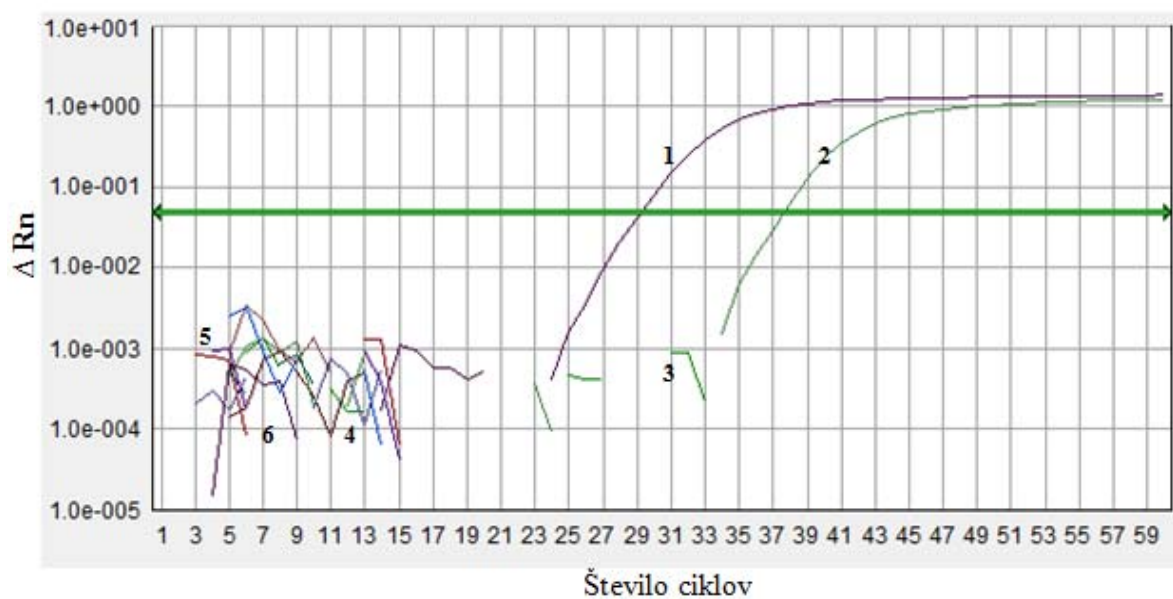
Prav tako gre zahvala Lini Burkan Makivić pri iskanju literature, za pregled referenc in za končni pregled diplomskega dela.

Zahvaljujem se tudi Katji Černe iz fotokopirnice za njeno pomoč pri oblikovanju, vezavi in tiskanju diplomskega dela.

Zahvaljujem se tudi domačim, mami Binci, očetu Dušanu, bratu Blažu, dedku Antonu, babici Ivanki, teti Darji in stricu Zoranu za vso moralno in čustveno podporo, potrpežljivost kakor tudi za omogočanje študija.

Hvala tudi prijateljem in sošolcem za vso naklonjenost, spodbudne besede in podporo.

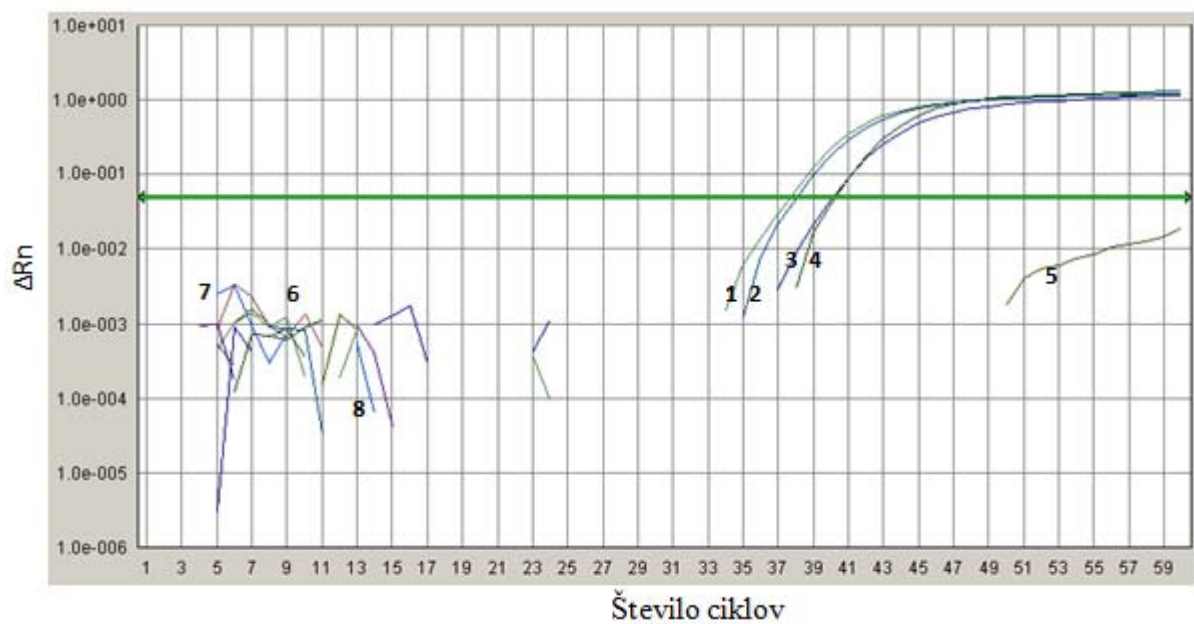
PRILOGE



Priloga A: Določanje lešnika v musli keksih, O`Cake-u, smokijih in vaniljevih rogljičkih z orehi ter kifeljčkih z orehi s PCR v realnem času

Legenda:

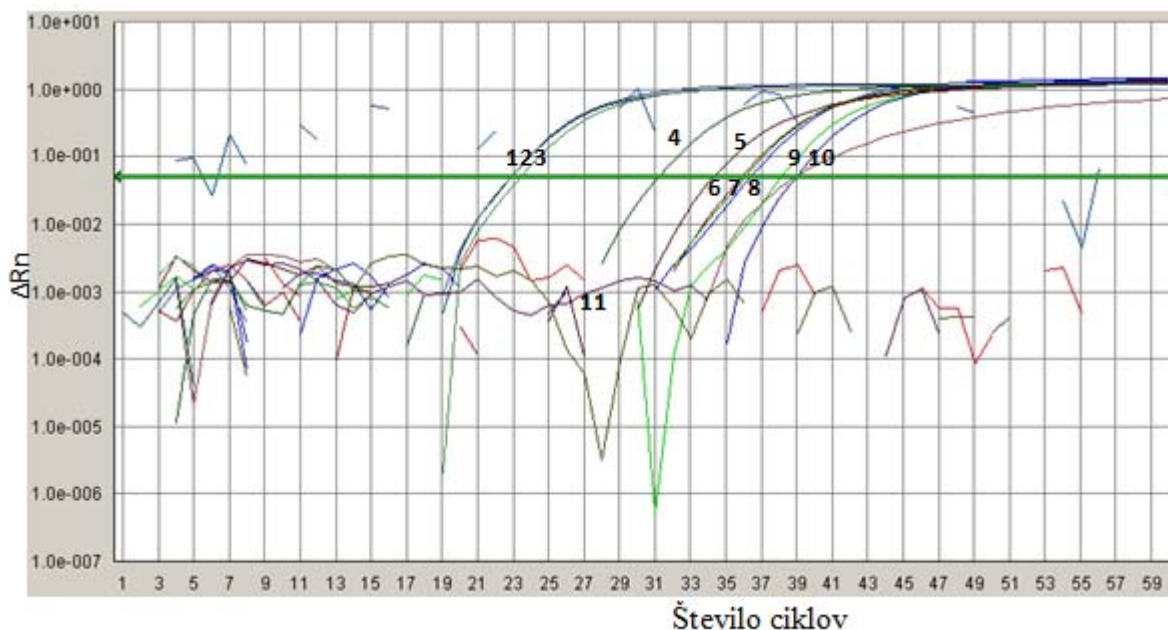
ΔRn -normaliziran fluorescentni signal, **1**: musli keksi, **2**: O`Cake, **3**: smoki, **4**: vaniljevi rogljički, **5**: kifeljčki z orehi, **6**: negativna kontrola



Priloga B: Določanje lešnika v orehovem čokoladnem pecivu, vrhniških linških očeh, horalky-u, domačih orehovitih keksih, orehovitih rogljičkih 1 in 2 ter domačem prijatelju s PCR realnem času

Legenda:

ΔRn -normaliziran fluorescentni signal, **1**: orehovo čokoladno pecivo, **2**: vrhniške linške oči, **3**: horalky, **4**: speculaas, **5**: domači orehovi keksi, **6**: orehovi rogljički 1, **7**: orehovi rogljički 2, **8**-domači prijatelj



Priloga C: Določanje lešnika v mlečni čokoladi s celimi lešniki, beli čokoladi s celimi lešniki in hrustljavim rižem, čokoladi s celimi lešniki, vaflju polnjenim s kremo in oblitim z mlečno čokolado, kakavovih palčicah, čajnem pecivu, v otroških veselje keksih, vrhniškem čajnem pecivu, krašuljicah in v vaflju oblitim z mlečno čokolado s PCR realnem času

Legenda:

ΔRn -normaliziran fluorescentni signal, **1:** mlečna čokolada s celimi lešniki, **2:** bela čokolada s celimi lešniki in hrustljavim rižem, **3:** čokolada s celimi lešniki, **4:** vafelj izdelek polnjen z kremo oblit z mlečno čokolado, **5:** kakavove palčice, **6:** čajno pecivo Brodnik, **7:** otroško veselje keksi, **8:** vrhniško čajno pecivo, **9:** Krašuljici, čajno pecivo s figovim in pomarančnim polnjenjem, **10:** vafelj izdelek s kakavovo kremo oblit z mlečno čokolado, **11:** negativna kontrola