

**UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO**

Petra TERPIN

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

**DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij**

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

**GRADUATION THESIS
University studies**

Ljubljana, 2010

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

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Barbaro Jeršek in za recenzenta prof. dr. Marjana Simčiča.

Mentorica: doc. dr. Barbara Jeršek

Recenzent: prof. dr. Marjan Simčič

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Petra TERPIN

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 577. 2. 08: 634. 51: 616 – 097 (043) = 163.6
KG alergeni v živilih / živila / oreh / *Juglans regia* / izolacija DNK iz živil / določanje
alergenov / PCR v realnem času / kvalitativna PCR v realnem času / specifičnost
PCR v realnem času / občutljivost PCR v realnem času
AV TERPIN, Petra
SA JERŠEK, Barbara (mentorica) / SIMČIČ, Marjan (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2010
IN DOLOČANJE OREHA KOT ALERGENA V ŽIVILIH S PCR V REALNEM
ČASU
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 66 str., 12 pregl., 21 sl., 44 vir
IJ SI
JI sl/en
AI Oreh sodi med poznane prehranske alergene. Namen diplomskega dela je bil
določiti oreh (*Juglans regia*) kot alergen v živilih s PCR v realnem času.
Eksperimentalno delo je potekalo v treh fazah tako, da smo najprej izbrali ustrezne
oligonukleotidne začetnike in sonde, optimizirali encimsko reakcijo ter določili
specifičnost in občutljivost metode. Nato smo preizkusili različne postopke
izolacije DNK iz živil, pripravili standardne orehove piškote in določili praktično
občutljivost PCR v realnem času za določanje oreha. V zaključnem delu smo s
PCR v realnem času v vzorcih orehovega peciva določali oreh. S pripravo
različnih mešanic za PCR v realnem času z različnimi koncentracijami sonde JugIP
smo določili optimalne razmere pomnoževanja specifičnega dela DNK, ki določa
protein *Jug r2*. Določene optimalne razmere encimske reakcije, ki je potekala s
standardnim temperaturno časovnim programom v aparatu ABI PRISM 7500, so
bile pri koncentracijah oligonukleotidnih začetnikov JugIF in JugIR 900 nmol/L in
sonde JugIP 50 nmol/L. Specifičnost oligonukleotidnih začetnikov JugIF in JugIR
ter sonde JugIP za oreh smo določili z analizami DNK sedmih različnih sort oreha
in DNK mandlja. Občutljivost encimske reakcije s čisto DNK oreha je bila
3,88 pg. Da bi optimizirali postopek priprave DNK živila za PCR v realnem času,
smo preizkusili 5 različnih postopkov izolacije DNK. Glede na
spektrofotometrično določene koncentracije DNK in rezultate PCR v realnem času
smo kot najustreznejši izbrali postopek izolacije s kompletom Nucleospin. Da bi
določili praktično občutljivost PCR v realnem času za določanje oreha kot
alergena, smo pripravili standardne orehove piškote, ki so v polnilu vsebovali od
0,01 % do 100 % oreha. V standardnih orehovitih piškotih smo s PCR v realnem
času lahko določili 0,01 % oreha. V vzorcih orehovega peciva smo nato izvedli
kvalitativno in kvantitativno analizo določanja oreha v živilih s PCR v realnem
času. Rezultati so pokazali, da PCR v realnem času omogoča kvalitativno
določitev oreha v živilih, medtem ko relativna kvantifikacija ni bila mogoča.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 577. 2. 08: 634. 51: 616 – 097 (043) = 163.6
CX food allergens / foods / walnut / *Juglans regia* / DNA isolation from foods / detection of allergens / real-time PCR / qualitative real-time PCR / specificity of real-time PCR / sensitivity of real-time PCR
AU TERPIN, Petra
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 2010
TI DETECTION OF WALNUT AS AN ALLERGEN IN FOODS WITH REAL-TIME PCR
TD Graduation thesis (University studies)
NO IX, 66 p., 12 tab., 21 fig., 44 ref.
LA Sl
AL sl/en
AB The walnut belongs among known food allergens. The purpose of this diploma thesis was to detect the walnut (*Juglans regia*) as an allergen in foods with real-time PCR. The experimental work consisted of three steps. First, specific primers and probe were chosen, the enzyme reaction was optimized and the specificity and sensitivity of the method was determined. After that, different methods for DNA isolation from foods were tried out, standard walnut model pastry was prepared and practical sensitivity and specificity of the method was determined. Finally, determination of walnut with real-time PCR for walnut in different walnut pastry was determined. Optimal amplification conditions of a specific DNA fragment for the protein *Jug r2* were determined by preparing real-time PCR mixes with different probe concentrations. Optimal conditions of the enzyme reaction, which proceeded with the standard ABI PRISM 7500 time-temperature programme, were at concentration 900 nmol/L of primers JuglR and JuglF and 50 nmol/L of probe JuglP. The DNA of seven different walnut and one almond species were analyzed for determining sensitivity and specificity of the reaction. The intrinsic detection limit of the method was 3.88 pg of walnut. To optimize the procedure of food DNA preparation, five different DNA isolation methods were tried out. According to spectrophotometric measuring of DNA concentration, Nucleospin kit was found as the best method for DNA isolation from foods. To determine the practical detection limit of real-time PCR for the detection of walnut as an allergen in foods, standard model pastry with different walnut content from 0,01 to 100 % of the fill was prepared. The practical detection limit of the walnut in standard model pastry was 0,01 % of walnut. In different samples of walnut pastry, qualitative and quantitative real-time PCR for detection of walnut in foods was carried out. Real-time PCR for detection of walnut in foods was found as a possible qualitative method for detecting walnut in foods, whereas quantitative real-time PCR for walnut in foods was not possible.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	II
KEY WORDS DOCUMENTATION	III
KAZALO VSEBINE	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE	IX
1 UVOD	1
1.1 CILJI NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 PREHRANSKE ALERGIJE	3
2.2 KLASIFIKACIJA ALERGENOV V ŽIVILIH	5
2.2.1 Delitev najpomembnejših alergeni proteinov iz živil	5
2.2.2 Alergeni v lupinastem sadju	6
2.3 OREH	6
2.3.1 Splošne lastnosti oreha	6
2.3.2 Oreh kot alergen	6
2.4 VPLIV POSTOPKOV PREDELAVE ŽIVILA NA ALERGENOST	7
2.5 PCR	7
2.5.1 PCR v realnem času	8
2.5.1.1 Nespecifične metode določanje pomnožkov	9
2.5.1.2 Specifične metode določanja pomnožkov	10
2.5.2 Kvantitativni PCR v realnem času	11
2.5.2.1 Metoda z razredčevanjem	12
2.5.3 Prednosti PCR v realnem času pred PCR	13
2.5.4 Prednost PCR v realnem času z oligonukleotidnimi sondami	14
2.5.5 Inhibitorji PCR	14
2.5.6 Vpliv izolacije DNK na PCR	14
2.5.7 Načini določanja koncentracije izolirane DNK	17
2.6 TEST ELISA	18
2.6.1 Princip testa ELISA	18
2.6.2 Primerjava PCR in testa ELISA	19

2.7.1 PCR.....	21
2.7.2 PCR v realnem času	21
2.7.4 Metode določanja oreha kot alergena.....	21
2.7.4.1 Test ELISA	21
2.7.4.2 PCR v realnem času.....	21
2.8 ZAKONODAJA S PODROČJA ALERGENOV	22
3 MATERIALI IN METODE	27
3.1 MATERIALI	27
3.1.1 Kemikalije za izolacijo DNK iz živil	27
3.1.1.1 Komplet Nucleospin	27
3.1.1.2 Komplet Fermentas	27
3.1.1.3 Komplet Qiagen.....	27
3.1.1.4 Druge kemikalije za izolacijo DNK iz živil	28
3.1.2 Reakcijska mešanica za PCR v realnem času	28
3.1.3 Vzorci.....	29
3.1.3.1 Vzorci alergenov	29
3.1.3.2 Standardni orehovi piškoti.....	29
3.1.3.3 Vzorci živil	30
3.1.4 Laboratorijska oprema	31
3.2 METODE	31
3.2.1 Postopki izolacije DNK iz vzorcev živil	31
3.2.1.1 Izolacija s kompletom Nucleospin	31
3.2.1.2 Izolacija s kompletom Fermentas	32
3.2.1.3 Izolacija s kompletom Qiagen	33
3.2.1.4 Izolacija z modificiranim postopkom za izolacijo DNK iz telečjega priželjca.....	34
3.2.1.5 Izolacija z modificiranim postopkom za izolacijo bakterijske DNK	35
3.2.2 Priprava in izvedba PCR v realnem času.....	36
3.2.2.1 Priprava reakcijske mešanice.....	36
3.2.2.2 PCR v realnem času in vrednotenje rezultatov.....	36
3.2.3 Optimizacija PCR v realnem času	37
3.2.4 Določitev specifičnosti PCR v realnem času.....	37
3.2.5 Določitev občutljivosti in učinkovitosti PCR v realnem času ter relativna kvantifikacija alergena v živilu	37
3.2.5.1 Občutljivost in učinkovitost PCR v realnem času, določena s čisto DNK oreha	37
3.2.5.2 Občutljivost in učinkovitost PCR v realnem času, določena s standardnimi orehovimi piškoti in relativna kvantifikacija alergena	37
3.2.5.3 Relativna kvantifikacija alergena v vzorcih živil	38
4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	39
4.1 OPTIMIZACIJA PCR V REALNEM ČASU ZA DOLOČANJE OREHA	39

4.2 UČINKOVITOST IZOLACIJE DNK OREHA	40
4.3 SPECIFIČNOST PCR V REALNEM ČASU ZA DOLOČANJE OREHA	42
4.4 DOLOČITEV OČUTLJIVOSTI PCR V REALNEM ČASU S ČISTO DNK OREHA	43
4.5 DOLOČITEV PRAKTIČNE OBČUTLJIVOSTI PCR V REALNEM ČASU	45
4.5.1 Vpliv časa pečenja standardnih orehovitih piškotov na določitev oreha s PCR v realnem času.....	45
4.5.2 Določitev praktične občutljivosti PCR v realnem času.....	50
4.5.2.1 Dodatne umeritvene krivulje	52
4.6 DOLOČITEV OREHOV V ŽIVILIH S PCR V REALNEM ČASU	54
4.6.1 Kvalitativna določitev	54
1.6.1 Relativna kvantifikacija	56
5 SKLEPI	59
6 POVZETEK.....	60
7 VIRI	62

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Metode Inštituta za varovanje zdravja RS za določanje nekaterih alergenov in genetsko spremenjenih organizmov s testi ELISA in PCR (Priloga..., ..., 2009).....	26
Preglednica 2: Laboratorijska oprema.....	31
Preglednica 3: Vrednosti C_t analize PCR v realnem času za določanje oreha z različnimi koncentracijami sonde JugLP	40
Preglednica 4: Koncentracije DNK oreha, izolirane po različnih postopkih in vrednosti C_t pri PCR v realnem času, dobljene pri 100 x razredčenih vzorcih. DNK mandlja je služila kot negativna kontrola.	42
Preglednica 5: Občutljivost PCR v realnem času za določanje DNK čistega oreha	44
Preglednica 6: Vrednosti C_t za standardne orehove piškote po različnih časih pečenja ...	48
Preglednica 7: Vrednosti C_t in odstotki oreha za standardne orehove piškote po 30 minutah pečenja.....	51
Preglednica 8: Koncentracija oreha v mg oreha / g vzorca in v ng DNK oreha / μ L DNK vzorca v standardnih orehovitih piškotih po 30 min pečenju	53
Preglednica 9: Analizirani vzorci živil s PCR v realnem času s specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki (JugLF, JugLR) in sondo (JugLP) za oreh (<i>Juglens regia</i>).....	55
Preglednica 10: C_t vrednosti in koncentracija oreha v orehovem pecivu (deklarirana in določena na osnovi PCR v realnem času)	56
Preglednica 11: Izmerjene in predvidene koncentracije DNK, izoliranih iz vzorcev orehovega peciva	57
Preglednica 12: Koncentracije oreha v vzorcih orehovega peciva izračunane glede na deklariran odstotek in določene s PCR v realnem času.....	57

KAZALO SLIK

Slika 1: Epitop (Ulm University, 2001)	5
Slika 2: Prikaz krivulje emisije fluorescence v odvisnosti od števila ciklov pri PCR v realnem času (Mackay, 2004)	9
Slika 3: Hidroliza TaqMan-sonde (Mackay in Landt, 2007)	11
Slika 4: Princip testa sendvič ELISA (Crowter, 1995).....	18
Slika 5: Prikaz sekvenc oligonukleotidnih začetnikov JuglR in JuglF ter sonde JuglP v genomu alergenege gena <i>Jug r2</i> , <i>Juglans regia</i>	29
Slika 6: Temperaturno-časovne faze pomnoževanja DNK v aparatu ABI Prism 7500	36
Slika 7: Rezultati PCR v realnem času za določanje oreha z različnimi koncentracijami sonde JuglP	39
Slika 8: Rezultati PCR v realnem času za določanje oreha, izvedenega s suspenzijami DNK oreha, izoliranimi po različnih postopkih	41
Slika 9: Določanje različnih sort oreha s PCR v realnem času	42
Slika 10: Določanje niza 10 kratnih razredčitev koncentracije čiste DNK oreha s PCR v realnem času.....	43
Slika 11: Umeritvena krivulja 1: Vrednosti C_t v odvisnosti od desetiškega logaritma koncentracije DNK čistega oreha [$\log(\text{ng DNK}/\mu\text{L})$]	44
Slika 12: Določanje oreha v standardnih orehovitih piškotih s PCR v realnem času pred pečenjem	45
Slika 13: Določanje oreha v standardnih orehovitih piškotih s PCR v realnem času po 15 minutnem pečenju	46
Slika 14: Določanje oreha v standardnih orehovitih piškotih s PCR v realnem času po 30 minutnem pečenju	47
Slika 15: Odvisnost vrednosti C_t od desetiškega logaritma odstotka oreha v standardnem piškotu pred pečenjem	48
Slika 16: Odvisnost vrednosti C_t od desetiškega logaritma odstotka oreha v standardnem piškotu po 15 min pečenja	49
Slika 17: Odvisnost vrednosti C_t od desetiškega logaritma odstotka oreha v standardnem piškotu po 30 min pečenja	49
Slika 18: Umeritvena krivulja 2: Odvisnost vrednosti C_t od desetiškega logaritma odstotka oreha v standardnem piškotu po 30 min pečenju.....	52
Slika 19: Umeritvena krivulja 3: odvisnost vrednosti C_t standardnih piškotov od desetiškega logaritma koncentracije DNK oreha v standardnem piškotu [$\log(\text{ng}$ DNK oreha/ $\mu\text{LDNK standardnega piškota})$], čas pečenja: 30 min.....	53
Slika 20: Umeritvena krivulja 4: odvisnost vrednosti C_t od koncentracije oreha v standardnem piškotu (mg oreha/g standardnega piškota) po 30 min pečenju	54
Slika 21: Določanje orehov v vzorcih orehovega peciva s PCR v realnem času	55

OKRAJŠAVE

bp	bazni par
C _p	presečišče krivulje fluorescence z osnovno linijo (ang. crossing point)
C _t	cikel meje določanja (ang. Threshold cycle)
E	učinkovitost reakcije (%)
ELISA	encimskoimunski test (ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
GMO	genetsko spremenjen organizem (ang. genetically modified organism)
IgE	imunoglobulin E
JuglP	oligonukleotidna sonda za določanje <i>Juglans regia</i>
JuglR, JuglF	oligonukleotidna začetnika za določanje <i>Juglans regia</i>
LOD	meja določljivosti (ang. limit of detection)
NTC	negativna kontrola pri PCR v realnem času
PCR	verižna reakcija s polimerazo
RCF	relativna centrifugalna sila (ang. Relative centrifugal force)
R ²	korelacijski faktor
ΔRn	velikost fluorescentnega signala

1 UVOD

Različna živila in sestavine živilskih proizvodov rastlinskega in živalskega izvora lahko pri določenih ljudeh povzročijo alergijske reakcije ali druge reakcije preobčutljivosti. Okoli 90 % vseh alergij oziroma reakcij preobčutljivosti na živila je povzročenih z osmimi živali: jajca, mleko, pšenica, soja, drevesno lupinasto sadje, arašidi, ribe in raki (IVZ RS, 2010).

Izraz prehranska alergija uporabljamo za neželene imunsko posredovane reakcije na običajno popolnoma neškodljivo hrano oziroma njene sestavine, ki temeljijo na imunskih mehanizmi. Snovi, ki izzovejo te reakcije, so alergeni (Wraber, 2004).

Zaradi okusa in pozitivnega vpliva na zdravje se lupinasto sadje pogosto uporablja v živilski industriji. Najpogostejši alergeni med lupinastim sadjem so arašidi, mandlji, brazilski oreški, ameriški orehi, lešniki in orehi.

Živilski izdelki, ki ne vsebujejo lupinastega sadja, in so proizvedeni na isti proizvodni liniji, kjer se obdeluje tudi lupinasto sadje, predstavljajo tveganje za navzkrižno kontaminacijo. Sledovi teh alergenov v izdelkih, ki naj ne bi vsebovali alergenov, lahko vodijo k mnogim hudim alergičnim reakcijam, zato so metode za odkrivanje alergenov in sledov alergenov iz lupinastega sadja zelo pomembno orodje za kontrolo proizvodnih postopkov in sanitacije v živilski industriji (Koppelman, 2006).

Oreh (*Juglans regia*) spada v botanično družino *Juglandaceae*. Spada med lupinasto sadje in ima izredno široko uporabno vrednost. Je cenjeno živilo, v katerem je veliko maščob, beljakovin, ogljikovih hidratov, rudninskih snovi in vitaminov (Ocepek, 1995). Zaradi vsebnosti alergenih genov lahko zaužitje oreha predstavlja veliko nevarnost za marsikaterega potrošnika (Brežná in sod., 2006). Alergeni proteini v orehu so *Jug r1*, *Jug r2*, *Jug r3*, *Jug r4* in *Jug r5* (Allergome, 2010; Jędrychowsky in sod., 2010). Alergeni *Jug r2* je najpomembnejši alergen v orehu (Breitender, 2006; Brežná in sod., 2006). Oreh je v prilogi 4 Pravilnika o splošnem označevanju predpakiranih živil (2004) označen kot sestavina, ki lahko povzroča alergijo.

Danes še ni zdravila, ki bi preprečevalo vzroke alergij in drugih preobčutljivosti. Posamezniki, nagnjeni k prehranskim alergijam, se lahko izognejo uživanju nevarnih živil oziroma njihovih sestavin le, če so dobro informirani o vseh sestavinah, ki jih živilo vsebuje. Za informiranje posameznika je zelo pomembno, da so na živilu primerno označene vse sestavine, ki lahko povzročajo alergije in reakcije preobčutljivosti, čeprav jih živilo vsebuje le v sledovih. Poleg tega mora sistem kontrole omogočati učinkovit nadzor skladnosti označevanja živil z dejansko vsebnostjo alergenov v živilih. Zato potrebujemo primerne metode odkrivanja alergenov v živilih (IVZ RS, 2010).

Zaradi kontrole primernosti označevanja živil in s tem zaščito ljudi, ki so alergični oziroma preobčutljivi na določene sestavine živil, je nujno vpeljevati metode za določanje alergenih substanc v živilih v zelo nizkih količinah (Odločba..., 2006).

Večina snovi v živilih, ki povzroča alergije, so beljakovinskega izvora in jih je možno specifično dovolj občutljivo določiti z imuno-kemijskimi (npr. ELISA) metodami. Tudi z nekaterimi molekularno-biološkimi tehnikami (npr. PCR) lahko določimo odseke DNK, ki so specifični za določeno vrsto rastlinskega ali živalskega tkiva (Odločba..., 2006).

Analiza specifičnih nukleinskih kislin v živilih omogoča določanje prisotnosti ali odsotnosti določene komponente v kompleksih izdelkih ali identifikacijo specifičnih značilnosti v komponentah živil (Greiner in Konieczny, 2007). Tako so bile narejene nekatere raziskave, ki vključujejo PCR v realnem času s specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki in sondo za oreh kot alergen (Brežna in sod., 2006; Wang in sod., 2009).

Obdelava živil lahko degradira molekule DNK ali povzroči spremembe, ki lahko vodijo do neželenih reakcij s sestavinami reakcijske mešanice za PCR, kar vodi do nejasnih ali lažno pozitivnih ter lažno negativnih rezultatov. Metode izolacije DNK iz različnih vzorcev živil morajo zagotoviti ustrezno odstranitev ostankov, aditivov in konzervansov oziroma inhibitorjev, ki lahko ovirajo pomnoževanje in vodijo do napačnih rezultatov (Pinto in sod., 2007). Prav to je bil glavni povod za naše delo, s katerim smo želeli vpeljati specifično in občutljivo metodo na osnovi PCR v realnem času za določanje oreha kot alergena v živilih.

1.1 CILJI NALOGE

Cilj naše naloge je bil postaviti metodo za določanje oreha kot alergena v živilih na osnovi PCR v realnem času. Za dosego tega cilja smo:

- izbrali ustrezne oligonukleotidne začetnike in sondo, ki so specifični za oreh;
- optimizirali razmere pomnoževanja specifičnega dela DNK oreha;
- določili specifičnost in občutljivost encimske reakcije;
- preizkusili različne postopke izolacije in čiščenja DNK iz živila;
- določili sledove oreha v živilu.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevamo:

- da bodo izbrani oligonukleotidni začetniki in sonda specifični za določitev oreha;
- da bo klasična izolacija DNK iz vzorcev oreha enako učinkovita, kot izolacija DNK s komercialnimi kompleti, vendar časovno bolj zamudna;
- da bo za izolacijo DNK oreha iz živil potrebna dodatna optimizacija postopka čiščenja DNK, da bomo čim bolj zmanjšali inhibicijo encimske reakcije, da bo metoda PCR v realnem času omogočala določitev oreha kot alergena v modelnem živilu;
- kvantitativno in kvalitativno določitev sledov oreha v živilu.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PREHRANSKE ALERGIJE

Različna živila in sestavine živilskih proizvodov rastlinskega in živalskega izvora lahko pri določenih ljudeh povzročijo alergijske reakcije ali druge reakcije preobčutljivosti. Okoli 90 % vseh alergij oziroma reakcij preobčutljivosti na živila je povzročenih z osmimi živali: jajca, mleko, pšenica, soja, drevesni oreški, arašidi, ribe in raki. Po oceni je 5 - 6 % populacije preobčutljive na hrano, okoli 2 % populacije ima alergijske reakcije na hrano. Pri dojenčkih in malih otrocih so deleži najmanj dvakrat večji (IVZ RS, 2010).

Neugodna reakcija na hrano je splošen izraz, ki se nanaša na klinično nenormalen odziv na zaužito živilo ali aditiv. Reakcije delimo na preobčutljivostne reakcije ali prehranske intolerance in na prehranske alergije (Taylor, 2006).

Prehranska intoleranca je splošen izraz, ki opisuje nenormalen fiziološki odziv na zaužito živilo ali aditiv. Te reakcije ne povzročajo neobičajnih imunskih odzivov in se tako razlikujejo od tistih, ki se pojavijo kot rezultat prehranske alergije (Jones in Burks, 2008; Taylor 2006).

Izraz prehranska alergija uporabljamo za neželene imunsko posredovane reakcije na običajno popolnoma neškodljivo hrano oziroma njene sestavine, ki temeljijo na imunskih mehanizmi. Snovi, ki izzovejo te reakcije, so alergeni (Wraber, 2004).

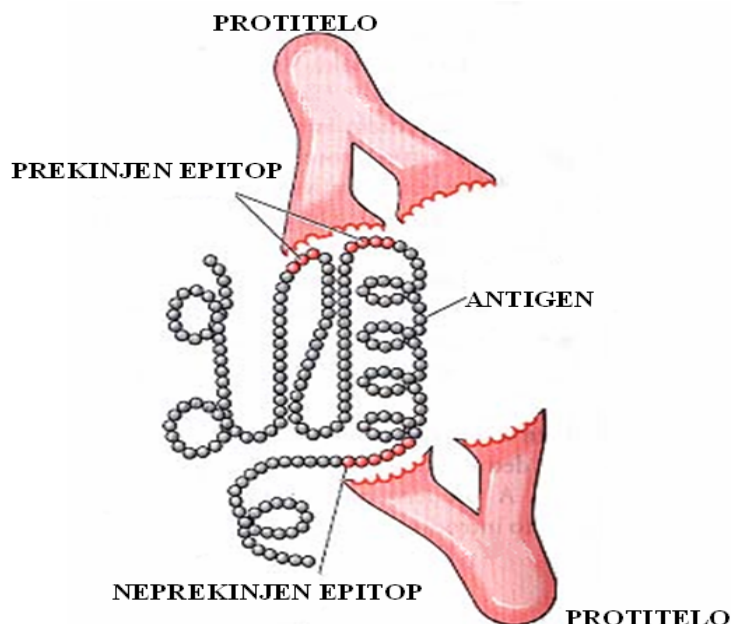
Prehranska alergija se pojavi, ko so proteinske frakcije živila ali druge velike molekule absorbirane v kri in sprožijo imunski odziv. Imunski sistem reagira tako na velike molekule kot tudi na druge antigene s produkcijo protiteles, histaminov ali drugih obrambnih snovi (Whitney in sod., 2002). Običajno so te posredovane z IgE (imunoglobulin E), pri čemer je anafilaksa najbolj tipičen primer. IgE se pojavlja v obliki monomere, sestavljene iz dveh lahkih verig (lambda in kapa), ki sta enaki kot pri ostalih imunoglobulinskih razredih, in dveh težkih verig eta, ki s svojo strukturo opredeljujeta tako antigenske, kot tudi biološke lastnosti imunoglobulinskega razreda E. Najbolj poznana biološka lastnost IgE je aktivacija mastocitov in bazofilnih granulocitov, ki jo omogoča vezava IgE na visokoafinitetni receptor za IgE (FcεRI) na membrani. To se zgodi ob vdoru alergena, na katerega je organizem občutljiv. Aktivacija teh celic in sproščanje mediatorjev iz granul (histamin, serotonin in triptaza), sinteza metabolitov arahidonske kisline (sulfidolevketrieni, prostaglandin D2 in trombocite aktivirajoči dejavnik) ter nenazadnje sinteza in izločanje nekaterih citokinov, so ključni dogodek za pojav in razvoj za IgE posredovane alergijske reakcije (Wraber, 2004). Funkcija protiteles IgE v naravi je zaščita pred okužbami. Čeprav je običajna raven IgE protiteles v človeškem telesu nizka, pri določenih posameznikih, ki trpijo za različnimi oblikami alergij, produkcija protiteles IgE, ki so specifična za prepoznavanje okoljskih antigenov, raste (Jones in Burks, 2008; Taylor, 2006).

Mehanizem alergičnih reakcij, posredovanih z IgE:

- 1. alergen stimulira nastanek protiteles IgE;
- 2. protitelesa IgE se vežejo na površino mastocitov in bazofilnih granulacitov;
- 3. mastociti in bazofilni granulaciti v prisotnosti alergena sproščajo histamin ali druge mediatorje in s tem sprožijo alergično reakcijo (Wraber, 2004; Taylor, 2006).

Alergeni ob vstopu v organizem najprej aktivirajo imunski sistem, da začne izdelovati specifična protitelesa. Ta se preko receptorjev vežejo na mastocite in bazofilne granulacite. Bazofilni granulaciti sodijo med limfocite in jih najdemo v krvi, mastociti so prvim sorodne celice, ki jih najdemo v različnih tkivih v koži, dihalih, dihalnem traktu in drugod po telesu (Wraber, 2004). Reakcije, posredovane z IgE so hitre (običajno v nekaj minutah do 2 urah) in so najbolj razširjene reakcije, povezane z živili. Znake povzroča sproščeni preoblikovani mediator iz tkivnih mastocitov in bazofilnih celic, ki so bili pred tem sintetizirani za specifičen antigen iz živila (Jones in Burks, 2008). Posamezniki, ki so razvili občutljivost na določen alergen, imajo molekule IgE, vezane na površino mastocitov in bazofilnih granulacitov. Značilnost IgE in drugih razredov protiteles je del molekule s specifičnim veziščem na alergen oz. antigen, ki je izzval njihov nastanek. Pri ponovnem vstopu alergena v telo se bo le-ta vezal na zanj specifične IgE. Mastociti in bazofilni granulaciti se pred tem aktivirajo in začne se izločanje mediatorjev za IgE posredovane alergijske reakcije. Iz zunajceličnih zalog se izločijo biogeni amini, med katerimi je pri človeku najbolj znan histamin. Histamin in drugi biogeni amini prizadenejo okolno tkivo, kar povzroči otekanje, krče gladkega mišičevja in obilno izločanje sluzi. To je vidno kot reakcije na koži, dihalnem traktu, gastrointestinalnem ali kardiovaskularnem sistemu (Wraber, 2004; Jones in Burks, 2008).

Epitopi so predeli antigena, ki ji protitelesa specifično prepoznajo. Ločimo prekinjene in neprekinjene epitope. Pri neprekinjenem epitopu ležijo aminokisliline, ki sestavljajo epitop, ena zraven druge. Pri prekinjenem epitopu aminokisliline primarne zgradbe proteina ne ležijo ena zraven druge, ampak se z gubanjem toliko približajo, da protitelo lahko prepozna epitop (slika 1) (Ulm University, 2001).



Slika 1: Epitop (Ulm University, 2001)

Današnji živilski proizvodi so pogosto sestavljeni iz številnih sestavin, ki so prisotne le v sledovih in so izvor tako imenovanih skritih alergenov (IVZ RS, 2010). Alergijske reakcije se lahko pojavijo že pri majhni zaužiti količini substance (Jones in Burks, 2008). Praktične izkušnje jasno namigujejo, da se imunski odgovor lahko pojavi že pri sledovih alergenov (Taylor, 2006). Posamezniki, ki trpijo zaradi različnih oblik prehranskih alergij, npr. anafilakso, imajo lahko reakcije, ki so povzročene že z npr. 100 µg alergena v živilu (IVZ RS, 2010).

2.2 KLASIFIKACIJA ALERGENOV V ŽIVILIH

2.2.1 Delitev najpomembnejših alergenih proteinov iz živil

Alergeni v živilih so običajno proteini. Zbrani so v družine, če imajo podobnost aminokislinskega zaporedja 30 % ali več. V isto družino spadajo tudi, če imajo manjše prileganje, vendar so podobni v funkciji ali strukturi. Družine proteinov, ki imajo manjšo podobnost aminokislinskega zaporedja, vendar njihove funkcije ali strukture nakazujejo isti evolucijski izvor, združujemo v nad-družine. Poznamo 1264 družin in 1232 nad-družin proteinov. Večina rastlinskih alergenih proteinov se uvršča v le nekaj družin in nad-družin. Spadajo v kupinsko nad-družino (ang. cupin superfamily), katere predstavniki sta družini 7S in 11S semenskih skladiščnih proteinov; prolaminsko nad-družino (ang. prolamin superfamily), kamor spadajo 2S albuminska družina, družina nespecifičnih lipidnih transfernih proteinov (nsLTP), družina alfa-amplaznih/tripsinskih inhibitorjev in družina prolaminskih skladiščnih proteinov iz žitaric; in papainsko nad-družino cisteinskih proteinaz (ang. papain superfamily of cystein proteinases) (Alergome, 2010; Taylor, 2006).

2.2.2 Alergeni v lupinastem sadju

Zaradi okusa in pozitivnega vpliva na zdravje se lupinasto sadje pogosto uporablja v živilski industriji. Že sledovi lupinastega sadja lahko povzročijo alergične reakcije. Poznamo veliko primerov nenamernega zaužitja lupinastega sadja. Živilski izdelki, ki ne vsebujejo lupinastega sadja, in so proizvedeni na isti proizvodni liniji, kjer se obdeluje tudi lupinasto sadje, predstavljajo tveganje za navzkrižno kontaminacijo. Sledovi teh alergenov v izdelkih, ki naj ne bi vsebovali alergenov, lahko vodijo k mnogim hudim alergičnim reakcijam, zato so metode za odkrivanje alergenov iz lupinastega sadja zelo pomembno orodje za kontrolo proizvodnih postopkov in sanitacije v živilski industriji. Pri določenem lupinastem sadju so bile zaznane alergične reakcije že pri 1 mg zaužitega živila. Znanе so tudi alergijske reakcije na olja iz lupinastega sadja. Alergen v teh oljih je sicer protein v sledovih, katerega količina je odvisna od postopkov rafinacije. Napogostejši alergen med lupinastim sadjem so arašidi, mandlji, brazilski oreški, ameriški orehi, lešniki in orehi (Koppelman, 2006).

2.3 OREH

2.3.1 Splošne lastnosti oreha

Oreh spada v botanično družino *Juglandaceae*. Najbolj razširjen rod je *Juglans* in vrsta *Juglans regia*. Spada med lupinasto sadje in ima izredno široko uporabno vrednost. Je cenjeno prvorazredno koncentrirano živilo, v katerem je veliko maščob, beljakovin, ogljikovih hidratov, rudninskih snovi in vitaminov. Jedrca vsebujejo tudi jod. Poleg tega je oreh cenjen tudi v proizvodnji zdravil in kozmetičnih sredstev, lesni industriji ter industriji predelave kože (Ocepek, 1995).

2.3.2 Oreh kot alergen

Zaradi alergenih genov lahko zaužitje oreha predstavlja veliko nevarnost za marsikaterega potrošnika (Brežná in sod, 2006).

Alergeni proteini v orehu so *Jug r1* in *Jug r3*, ki spadata v prolaminsko naddružino, *Jug r2* in *Jug r4*, ki spadata v kupinsko naddružino proteinov (ang. cupin superfamily) in v družino vicilinov (ang. vicilins) ter *Jug r5*, ki spada med profiline (ang. profilins) (Allergome, 2010; Jędrychowsky in sod., 2010; Breitner, 2006). Alergeni gen *Jug r2* je najpomembnejši alergen v orehu. Spada v 7S družino globulinov in je velik 47kDa (Breitender, 2006).

Velika skupina kupinske naddružine so semenski skladiščni proteini, ki so eni od pomembnejših komponent človeške prehrane. Skladiščni proteini iz stročnic in drevesnega lupinastega sadja so močno zastopani proteini in predstavljajo do 50 % celotne količine semenskih proteinov. Ti globulinski proteini se, glede na sedimentacijski faktor, delijo na 11S globuline iz stročnic in 7S vicilinske globuline. Predstavniki alergenih globulinov iz stročnic so nekateri alergen proteini soje, arašidov, lešnika in mandljev.

Velikost 7S vicilinskih globulinov je 150 - 190 kDa, vendar so pogosto podvrženi reverzibilni agregaciji na heksamere, odvisne od ionske moči okoljskega medija. Molekulska teža podenot je 40 - 80 kDa. Vicilinom primanjkuje cisteina, zato nimajo disulfidnih vezi. Obstajata dve vrsti vicilinov: vicilini običajne velikosti in veliki vicilini. Predstavniki alergeni vicilinov so najpomembnejša alergena gena arašida in oreha ter alergeni geni soje, leče, akažuja in sezama (Breitender, 2006).

2.4 VPLIV POSTOPKOV PREDELAVE ŽIVILA NA ALERGENOST

Alergeni iz lupinastega sadja so odporni proti obdelavi in prebavi. Toplotni postopki so v živilski industriji pogosti postopki predelave živil. Namenjeni so izboljšanju okusa in vonja (praženje, cvrtje) ali podaljšanju roka trajanja (pasterizacija). Značilni postopki pri obdelavi lupinastega sadja so sušenje pri sobni temperaturi, praženje pri 140 - 170 °C in cvrtje pri približno 180 °C ter kasnejši postopki v pripravi končnega izdelka, kot je na primer pečenje piškotov.

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, podvržena alergijski reakciji. Obdelava hrane torej ne zmanjša možnosti alergijskih reakcij (Koppelman, 2006).

2.5 PCR

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je metoda za encimsko pomnoževanje specifičnih sekvenc DNK *in vitro*. V kratkem času dobimo več kot milijon kopij originalne DNK.

PCR je sestavljena iz ponavljajočih se faz, z določenimi temperaturami:

- 1. faza: denturacija dvoverižne matrične DNK v enoverižno DNK pri 94 – 95 °C;
- 2. faza: prileganje oligonukleotidnih začetnikov na homologne sekvence pri 37 - 70 °C;
- 3. faza: polimerizacija nove verige DNK iz nukleotidov s pomočjo termostabilne DNK polimeraze pri 60 - 72 °C.

Za pomnoževanje tarčne sekvence DNK se uporabljata dva oligonukleotidna začetnika. Prvi je homologen sekvenci prve DNK verige, drugi pa sekvenci druge verige in je lociran na primerni razdalji, od 70 - 3000 bp. Z uporabo takih oligonukleotidnih začetnikov nastaneta s PCR dve vrsti novih DNK-verig v prvem ciklu PCR, ki se začneta z enim ali drugim oligonukleotidnim začetnikom in nadaljujeta z nekaj sto ali nekaj tisoč bp dolgih verig. V drugem ciklu se oligonukleotidna začetnika vežeta na originalno molekulo DNK in na nov, krajši pomnožek, ki je nastal v prvem ciklu. Ko so kot tarčne molekule za pomnoževanje uporabljeni novi deli DNK, se polimerizacija konča hitreje in pomnožki se začnejo s sekvenco enega oligonukleotidnega začetnika in končajo homologno sekvenco drugega začetnika (Kuchta, 2006).

Pomnožki se lahko enostavno določajo z agarozno elektroforezo v prisotnosti molekularnega označevalca dolžin pomnožkov.

Glavna uporaba PCR temelji na hitrem (15 min - 2 h), zelo občutljivem (meja zaznave je $\geq 10^0$ molekule) in visoko selektivnem ugotavljanju določenega dela DNK, ki ga je možno določiti tudi, če so v istem vzorcu prisotne večje količine drugih molekul DNK. Za analizo živil je PCR uporaben za ugotavljanje specifične sekvence DNK, ki je značilna komponenta določenega mikroorganizma, rastline ali živali (Kuchta, 2006).

2.5.1 PCR v realnem času

PCR v realnem času temelji na merjenju fluorescence pomnožkov med samim procesom pomnoževanja (Kuchta, 2006). Kratek segment DNK, ki se pomnožuje med PCR, imenujemo pomnožek (Applied Biosystems, 2004).

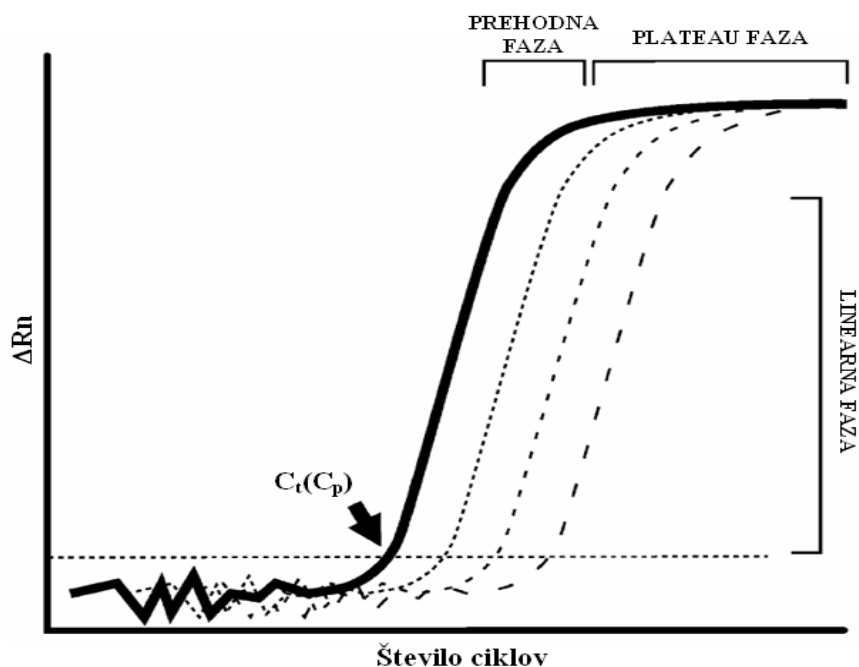
Spremljanje nastajanja pomnožkov s PCR v realnem času je možno z označevanjem oligonukleotidnih začetnikov, sond ali pomnožkov z molekulami, ki fluorescirajo. Te molekule, zaradi pomnoževanja tarčne DNK, povzročijo spremembo signala, ki je odvisen od količine pomnožka tekom vsakega cikla in se poveča, če se poveča količina specifičnega pomnožka (Mackay, 2004).

Izvor fluorescence je lahko interkalatični kompleks DNK z barvilom SYBR Green I ali z različnimi vrstami sond ali oligonukleotidnih začetnikov, označenih s fluorescentnimi barvili. V prvem primeru se meri količina vseh pomnožkov, tudi nespecifičnih, in zato se po zaključenem PCR v realnem času analizira temperaturna krivulja taljenja, ki je specifična za pomnožek (Kuchta, 2006).

TaqMan-sonde temeljijo na procesu FRET. 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).

Določanje fluorescentnega barvila omogoča spremljanje pomnoževanja specifičnih pomnožkov tekom PCR. Koncentracija fluorescentnega barvila je proporcionalna količini pomnožka. Uporaba sond, označenih z različnimi fluorescentnimi barvili, omogoča sočasno spremljanje večih različnih specifičnih DNK fragmentov hkrati (Kuchta, 2006).

Slika 2 prikazuje idealno krivuljo emisije fluorescence v odvisnosti od števila ciklov pri PCR v realnem času (Mackay, 2004).



Slika 2: Prikaz krivulje emisije fluorescence v odvisnosti od števila ciklov pri PCR v realnem času (Mackay, 2004)

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.

Ko je pomnožka dovolj, začne krivulja rasti eksponentno (linearna faza). V idealnih razmerah se količina pomnožka povečuje za $1 \log_{10}$ vsakih 3,32 ciklov. Ko se količina oligonukleotidnih začetnikov in encima začne zmanjševati in ko začne količina PCR produkta postajati inhibitorna, se reakcija upočasni, nastopi prehodna faza in nato plato, kjer se fluorescence povečuje le še malo ali se ne povečuje več. Točka, kjer se krivulja fluorescence povzpne nad fluorescenco ozadja, je cikel meje zaznavanja, in jo imenujemo vrednost C_t oziroma presečišče C_p (C_p – ang. crossing point) (Mackay, 2004).

Meja zaznavanja je linija, ki seka krivuljo fluorescence na točki C_t (Applied Biosystems, 2004).

2.5.1.1 Nespecifične metode določanje pomnožkov

Nespecifično določanje pomnožkov poteka z uporabo fluorescentnega barvila SYBRGreen, ki se nespecifično vgradi v dvoverižno molekulo DNK. Omenjeno barvilo je nadomestilo za etidijev bromid, ki se uporablja pri klasični PCR, kjer se pomnožki določajo z agarozno elektroforezo in se nato agarozni gel oziroma DNK barva z etidijevim bromidom. Etidijev bromid je stupena in mutagena snov, zato se uporaba le-tega odsvetuje (Mackay in sod., 2002).

Barvilo SYBRGreen, ki se veže na dvoverižno DNK med pomnoževanjem. Potek:

- ko dodamo vzorec DNK v reakcijsko mešanico z barvilom SYBRGreen, se barvilo nemudoma veže v vse dvoverižne molekule DNK;
- tekom reakcije PCR v realnem času DNK-polimeraza pomnožuje tarčno sekvenco, s čemer se povečuje količina pomnožkov;
- barvilo SYBRGreen se veže v vsako novo kopijo dvoverižne DNK;
- z napredovanjem reakcije nastaja vedno več PCR produkta.

Ker se SYBRGreen veže v vse dvoverižne DNK molekule, je rezultat povečanje intenzitete fluorescence proporcionalno s količino novonastalega dvoverižnega PCR produkta. Barvilo se lahko veže tudi na nespecifične dvoverižne DNK sekvence, zato moramo možnost lažno pozitivnih rezultatov preveriti z analizo krivulje taljenja. Določanje specifične temperature taljenja specifične molekule DNK nam omogoča dodatna faza, to je faza disociacije na koncu pomnoževanja (Applied Biosystems, 2004).

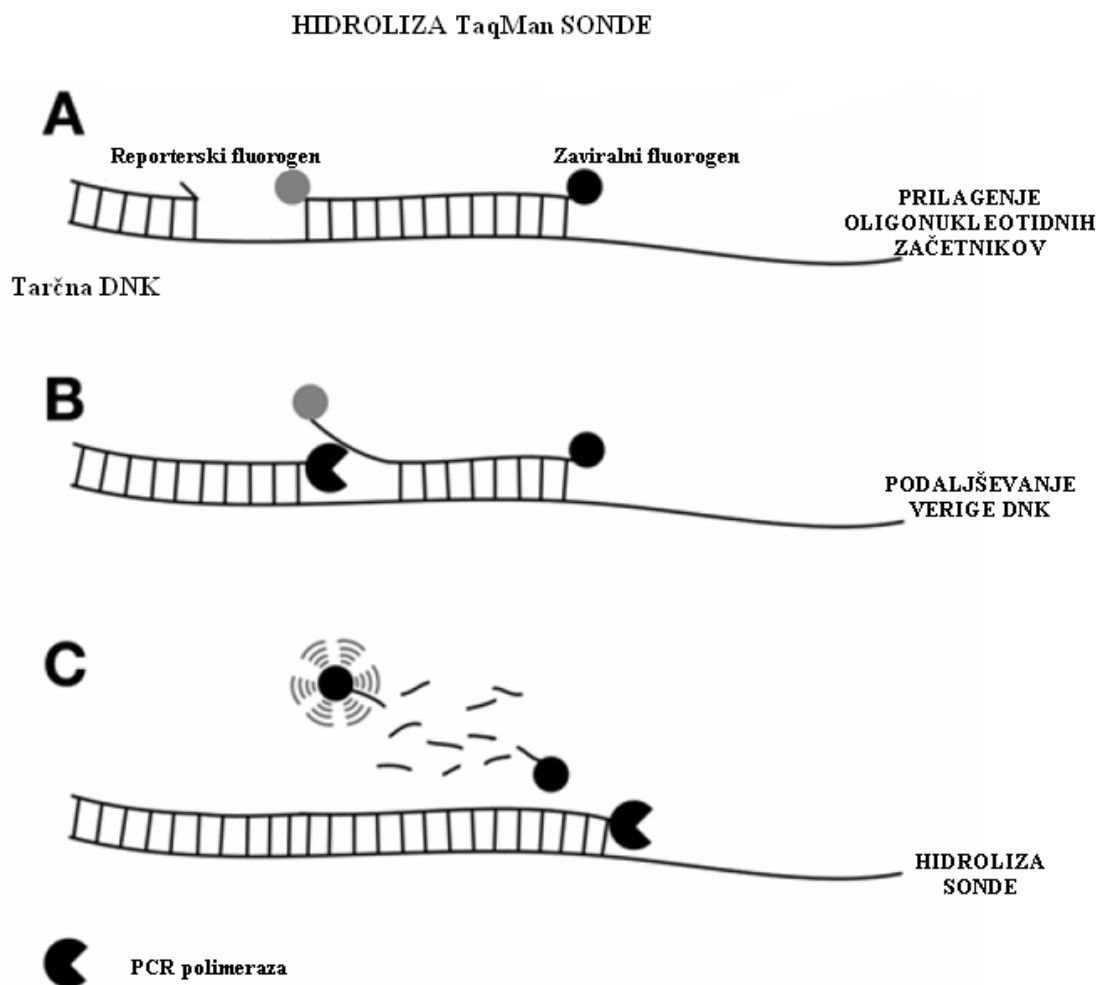
3.5.1.2 Specifične metode določanja pomnožkov

Kadar so v uporabi označene sonde ali oligonukleotidni začetniki, je na razpolago več načinov odkrivanja pomnožkov. Med njimi je 5'-nukleazna PCR, zahvaljujoč robustnosti, postala široko uporabna (Kuchta, 2006).

Metoda uporablja tako imenovano TaqMan-sondo, označeno z reporterskim fluorogenom, običajno FAM (6-karboksi fluorescein), ki se nahaja na 5'-koncu sonde, na 3'-koncu je vezan zaviralni fluorogen, največkrat 6-karboksi-tetrametil-rodamin – TAMRA (Kuchta, 2006; Mackay, 2004).

Oligonukleotidne sonde so narejene tako, da imajo temperaturo taljenja nekoliko višjo od temperature taljenja oligonukleotidnih začetnikov in se zato vežejo na tarčno DNK pred njimi (Kuchta, 2006).

Sonda v intaktnem stanju ne fluorescira. Med prileganjem oligonukleotidnih začetnikov in podaljševanjem verige DNK DNK-polimeraza odcepi zaviralni fluorogen od reporterskega, ki začne fluorescirati (Slika 3) (Mackay in Landt, 2007).



Slika 3: Hidroliza TaqMan-sonde (Mackay in Landt, 2007)

2.5.2 Kvantitativni PCR v realnem času

Kvantitativni PCR v realnem času je analiza, kjer se meri količina tarčne molekule nukleinske kisline med vsakim ciklom pomnoževanja PCR. Tarčna molekula je lahko DNK, cDNK ali RNA (Applied Biosystems, 2004).

Vrednost C_t (slika 2) se uporablja za izračun začetne količine tarčne DNK pri kvantitativni PCR v realnem času. Črtkane krivulje, predstavljajo razredčen vzorec DNK, ki ima nižjo začetno koncentracijo in zato višje vrednosti C_t (Mackay, 2004).

Kvantifikacija je lahko relativna ali absolutna. Pri relativni kvantifikaciji določamo spremembe v količini tarčne DNK v primerjavi s količino te sekvence v sorodnem ali istem materialu tako, da primerjamo signal tarčne sekvence s signalom notranje ali drugih referenčnih kontrol. Uporablja se predvsem za ugotavljanje sprememb izražanja genov v vzorcu na podlagi relativne primerjave z referenčnim standardom. Absolutna kvantifikacija je zahtevnejša in omogoča določitev točnega števila tarčne DNK v vzorcu z določenimi

enotami in s tem omogoča primerjanje rezultatov različnih metod in različnih laboratorijev (Mackay, 2004).

Zanesljivost kvantifikacije je pogojena s pravilno izbiro in dobro kvaliteto kontrol. Notranja kontrola omogoča kontrolo poteka PCR. Ta se uporablja za določevanje lažno-negativnih rezultatov in ugotavljanje sposobnosti podvojevanja DNK, v primeru kompetitivnega PCR pa tudi kvantifikacijo. Za kvantifikacijo se uporabljajo predvsem standardi, med katerimi ločimo zunanjo (eksogeno) kontrolo in notranji standard. Zunanjo kontrolo lahko predstavljajo čisti pomnožek, klonirani pomnožek ali del tarčnega genoma, kateri se pomnožujejo v isti reakciji, vendar ločeni epruvetki za PCR. Koncentracijo neznane DNK v vzorcu razberemo iz standardne krivulje. Pripravimo jo iz standardnih vzorcev, v katerih so decimalne razredčitve zunanje kontrole. Notranji standard je del tarčne DNK, ki se pomnožuje istočasno v isti epruvetki za PCR kot tarčna DNK z enakima oligonukleotidnima začetnikoma (Mackay, 2004).

Za kvantifikacijo uporabimo eksponentno fazo rasti fluorescentnega signala. Med eksponentno fazo obstaja linearna povezava med logaritmom začetnih kopij in številom ciklov pomnoževanja, ki so potrebni, da produkt doseže mejo določljivosti. Teoretično bi morala biti meja določljivosti postavljena na najnižji zanesljivo merljivi ravni, medtem ko mora biti natančnost kvantifikacije najvišja, ko so meritve narejene na najzgodnejši možni ravni znotraj eksponentne faze. Ta pristop se je izkazal za zelo natančnega in zanesljivega. Merjenje meje določljivosti pri kvantitativni PCR v realnem času temelji na analizah grafov odvisnosti fluorescence od števila ciklov (slika 2). Najenostavnejši pristop je določitev vrednosti fluorescence na meji določljivosti, ki jo označimo kot vrednost C_t . Vrednost C_t je torej tisto število ciklov, pri katerem se fluorescenca vzorca poveča nad fluorescenco ozadja. Mejo določljivosti lahko določimo ročno ali avtomatsko, kjer sistem upošteva standardno deviacijo točk, ki sestavljajo osnovno linijo (Sauders, 2004b).

2.5.2.1 Metoda z razredčevanjem

Pri metodi z razredčevanjem uporabimo kot vzorce 10 kratne razredčitve osnovnega vzorca in rezultate PCR v realnem času vrednotimo z izračunom premice, kot odvisnosti vrednosti C_t od koncentracije ali mase DNK vzorca (enačba 1).

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

Ob izračunu parametrov premice je potrebno določiti območje linearnosti in izračunati korelacijski koeficient (R^2), ki naj bi bil čim bližje 1,0 (Pfaffl in sod., 2002; Pfaffl, 2001).

Vrednotenje učinkovitosti PCR je nujen del pri kvantifikaciji rezultatov PCR v realnem času in učinkovitost reakcije (E) izračunamo po enačbi 2 ali 3 (Pfaffl, 2001).

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

$$E = (-1 + 10^{(-1/k)}) * 100 \quad \dots 3$$

E.....učinkovitost reakcije (%)

k.....naklon premice krivulje

Učinkovitost encimske reakcije je zadovoljiva, kadar je naklon premice (k) med vrednostmi -3,1 in -3,6 in če je izračunana učinkovitost med 1 in 2 (to je teoretično najboljša učinkovitost encimske reakcije) kadar je izračunana po enačbi 2 in med 90 in 110 % kadar je izračunana po enačbi 3 (Pfaffl, 2001). Ko je učinkovitost encimske reakcije izven območja 90 - 110 % to pomeni, da pomnoževanje ni več učinkovito in da se število novonastalih kopij DNK v posameznem ciklu PCR ne povečuje eksponentno. Teoretično se pri 100 % učinkovitosti število kopij povečuje od 1 – 2 – 4 – 8 – 16 – 32 – 64 – 128 – 256 -..., medtem ko se pri 70 % učinkovitosti število kopij povečuje 1 – 2 – 3 – 5 – 8 – 14 – 24 – 41 – 70 -..., torej veliko počasneje, in pri 130 % učinkovitosti 1 – 3 – 78 – 203 – 528 – 1373 – 3570 – 9282 -..., torej veliko hitreje. Kvantifikacija pri PCR v realnem času zato v primerih, ko je učinkovitost encimske reakcije izven zadovoljivega območja, ni pravilna.

Na učinkovitost PCR v realnem času vplivajo mnogi dejavniki, kot so inhibitorji in vzpodbujevalci encimske reakcije, degradacija DNK, degradacija vzorca, nespecifični pomnožki, dolžina pomnožka, sekundarna struktura pomnožka, vrsta in čistost oligonukleotidnih začetnikov (in sonde), koncentracija DNK, sestavine reakcijske mešanice, razmere pomnoževanja, fluorogena barvila, laboratorijska praksa, vrsta in značilnosti aparata za PCR (Pfaffl, 2004; Dorak, 2006).

2.5.3 Prednosti PCR v realnem času pred PCR

Glavni prednosti PCR v realnem času sta minimalna možnost kontaminacije v laboratoriju, ker se celoten proces odvija v zaprtih epruvtkah in možnost kvantifikacije specifičnih pomnožkov (Sauders, 2004b). Pri PCR v realnem času je možna karakterizacija pomnožka *in situ* z analizo temperature taljenja in/ali lastnosti hibridizacije sonde znotraj PCR mešanice (Sauders, 2004a).

Prednost PCR v realnem času pred klasičnim PCR je tudi v hitrosti pridobivanja rezultatov. Zmanjšano je število ciklov, postopki določanja pomnožkov po zaključenem pomnoževanju niso potrebni, visoko občutljiva oprema, ki meri fluorescenco, omogoča hitro zaznavanje pomnožkov (Mackay, 2004; Holzhauser in sod., 2006).

Določanje pomožkov pri PCR v realnem času se izvaja v začetku linearne faze pomnoževanja (slika 2), medtem ko pri klasičnem PCR pomnožke določimo na koncu linearne faze ali celo v fazi plato, kjer so zelo velika odstopanja in zato toliko večje napake (Applied Biosystems, 2004).

Slabost PCR v realnem času v primerjavi s klasično PCR je v investiciji v opremo (Mackay, 2004; Holzhauser in sod., 2006).

2.5.4 Prednost PCR v realnem času z oligonukleotidnimi sondami

Za metode, ki temeljijo na hibridizaciji sonde, je manj mogoče, da bodo dale lažno pozitivne rezultate, kot nespecifične metode, ki uporabljajo dodatek barvil (npr. SYBRGreen) in ugotavljanje sinteze dvoverižne DNK, ki temelji na analizi taljenja produkta. Hibridizacija in hidroliza sonde dajeta fluorescentne signale, ki se pojavijo samo, če se pomnožuje tarčna sekvenca in zato ne daje lažno pozitivnih rezultatov. Pomembna lastnost sistemov s sondami je, da so primerni za multipli PCR zaradi razpoložljivosti fluoroforov z različnimi emisijskimi spektri (Sauders, 2004a).

2.5.5 Inhibitorji PCR

Mnoge komponente rastlinskih in živalskih tkiv, kot so proteaze, polisaharidi, polifenoli, proteini, olja in maščobe lahko upočasnijo ali celo inhibirajo pomnoževanje s PCR (Holzhauser in sod., 2006; Mafra in sod., 2008, Pinto in sod., 2007).

Uporaba molekularnih metod na vzorcih živil zahteva metode izolacije in čiščenja DNK, ki zagotavljajo učinkovito pridobivanje nukleinske kisline in odstranitev številnih komponent, ki inhibirajo PCR. Inhibitorjev PCR (npr. polisaharidi, huminske kisline), ki so pogosto prisotni v živilih, s klasičnimi protokoli za izolacijo DNK ne moremo popolnoma odstraniti in kot kontaminanti ostanejo v končnih DNK-pripravih. Komponente inhibitorjev lahko ovirajo posamezne stopnje reakcije in vodijo do zmanjšanja učinkovitosti ali popolne inhibicije aktivnosti DNK-polimeraze. Pri izolaciji DNK s klasičnimi metodami, kjer se uporabljajo organska topila (npr. heksan), zaradi ostankov le-teh v vzorcih izolirane DNK, lahko pride do inhibicije PCR (Pinto in sod., 2007).

2.5.6 Vpliv izolacije DNK na PCR

Da dosežemo primerno občutljivost in specifičnost PCR, je način izolacije DNK velikega pomena, saj lahko pomanjkljiva metoda čiščenja DNK drastično zmanjša občutljivost analize. Pogosta in potrjena metoda ekstrakcije DNK za PCR je kombinacija protokola s cetiltrimetilamonijevim bromidom (CTAB) ali protokola z gvandin tiocianatom (GTC) in kasnejše čiščenje izolirane DNK s komercialno dostopnimi silikatnimi kolonami. Alternativa tej relativno časovno potratni metodi so komercialno dostopni kompleti, ki običajno temeljijo na ekstrakciji DNK z metodami, ki temeljijo na silikatih in so optimizirane za analizo predelanih živil (Holzhauser in sod., 2006).

Obdelava živil lahko degradira molekule DNK ali vpelje substance, ki lahko reagirajo s sestavinami reakcijske mešanice za PCR, kar lahko vodi do nejasnih rezultatov. Metode izolacije DNK iz različnih vzorcev živil morajo zagotoviti ustrezno odstranitev ostankov, aditivov in konzervansov, ki lahko ovirajo pomnoževanje. Ekstrakcija, čiščenje in koncentracija DNK, prvi kritični koraki v molekularni analitski metodologiji, zahtevajo metode, ki so sposobne odstraniti mnoge inhibitorje PCR (Pinto in sod., 2007).

Med predelovalno verigo gre živilo skozi mnoge fizikalne, biološke in kemične procese, ki večinoma negativno vplivajo na kvantiteto in koncentracijo razpoložljive DNK. Za izolacijo DNK iz rastlinskega tkiva se večinoma uporabljajo trije različni pristopi izolacije DNK: metoda CTAB (cetiltrimidamonijev bromid), silikatne kolone, na katere se veže DNK, v obliki različnih komercialnih kompletov, in kombinacija obeh. Obstoječe metode za izolacijo DNK iz živil ne morejo vedno izpolniti pričakovanj glede kvalitete in kvantitete izolirane DNK. Običajno zahtevajo do 100 mg vzorca živila, kar pa pogosto ni dovolj reprezentativno (Greiner in Konieczny, 2007).

Pinto in sod. (2007) so med seboj primerjali 12 vzorcev DNK, izoliranih in očiščenih z dvema komercialnima kompletoma, ki temeljita na uporabi silikatov: Wizard Magnetic® DNA Purification for Food (Promega Italia S.r.l., Milano Italija) in DNeasy Kit (QIAGEN, Hilden, Nemčija). Koncentracijo in čistost so izmerili spektrofotometrično in na izoliranih vzorcih DNK naredili analizo s PCR.

Spektrofotometrično pridobljeni rezultati vzorcev DNK, izoliranih s kompletom Wizard, so bili pri nekaterih vzorcih neskladni. Rezultat je bil negativen pri čokoladni kremi in koruznem olju. Pri vzorcih mleka in konjskega mesa so bile koncentracije izolirane DNK nizke. Pri vzorcih DNK, izoliranih s kompletom DNeasy je bil rezultat neskladen samo pri čokoladni kremi.

Analiza PCR na vzorce DNK, izolirane s kompletom Wizard, je pokazala negativen rezultat pri vzorcih čokolade, koruznega olja, krompirjevih cmokov, čokoladnega peciva in konjskega mesa. Rastlinski vzorci DNK, kot so GMO koruza, koruzna moka, perutninska krma in otrobi, so z analizo PCR pokazali pozitivne rezultate. Meje detekcije so bile med 0,05ng/μL in 2,5pg/μL.

S kompletom DNeasy so bili rezultati pozitivni pri vseh vzorcih, razen čokoladne kreme in koruznega olja. Pri analizi PCR s 4 μL nerazredčenega koruznega olja je bil rezultat pozitiven. Negativen rezultat je bil samo pri čokoladni kremi.

Primerjava dveh metod izolacije DNK je pokazala, da je komplet Wizard primeren za rastlinske matrikse, ki so bogati s polisaharidi in polifenoli, medtem, ko je komplet DNeasy pokazal večjo učinkovitost pri kompleksnih in obdelanih matriksih živil, kot so cmoki, čokoladno pecivo, rastlinski jušni koncentracije in češnjeva marmelada. Komplet je v teh primerih verjetno učinkovitejši zaradi pufrov in silikatnih kolon, ki omogočajo boljšo vezavo DNK in odstranjevanje inhibitorjev. Komplet ne zahteva uporabe organskih topil, (npr. heksana), ki lahko inhibirajo PCR in je primernejši za živalska tkiva in kompleksne matrikse (Pinto in sod., 2007).

Mafra in sod. (2008) so iz vzorcev soje in sojinih izdelkov izolirali DNK s štirimi različnimi metodami, in sicer dvema komercialnima kompletoma za izolacijo DNK: Nucleospin (Macherey-Nagel, Düren, Nemčija) in Genespin (Genescan, Freiburg, Nemčija) in dvema modificiranima protokoloma: CTAB (cetiltrimetilamonijev bromid) in s kolonami Wizard® (Promega, Madison, WI, ZDA).

Čistost in koncentracijo izolirane DNK so določili fluorimetrično z uporabo Picogreen reagenta (Molecular Probes) glede na navodila kompleta. Za standardno krivuljo so uporabili λ DNK, ki je priložena h kompletu. Čistost DNK je bila določena z razmerjem absorbanca pri 260 in 280 nm.

Učinkovitost izolacije DNK je bila določena s PCR, in sicer s serijo 10-kratnih razredčitev, in določitvijo najnižje razredčitve, kjer je bil PCR produkt na elektroforezi še viden. Učinkovitost reakcije so določili s PCR v realnem času z uporabo barvila SYBR Green. Rezultati so pokazali, da sta bila komercialna kompleta za izolacijo DNK Nucleospin in Genespin najučinkovitejša pri sojini moki, izolatih proteinov in tofuju. Metoda Wizard je bila podobno učinkovita pri tofuju, vendar je pokazala dosti nižjo količino izolirane DNK pri sojini moki in izolatih proteinov.

Vse štiri metode so bile uspešne pri večini izdelkov. Razen sojine omake, nekaterih desertov in vegetarijanskih živil, je bila izolirana DNK prisotna v zadovoljivi čistosti, kakovosti in količini, ki je zadostna za pomnoževanje s PCR. Najvišja učinkovitost izolacije se je pokazala pri obeh komercialnih kompletih, Nucleospin in Genespin, pri metodi CTAB je bila učinkovitost najnižja. Kompleta sta pokazala najvišjo učinkovitost tudi pri izolaciji iz tofuja. Pri vzorcih, kjer je izolacija težavna, sta CTAB in Wizard metodi pokazali najboljše rezultate. Drugi, močno predelani sojini izdelki, kot so sojini deserti in vegetarijanska hrana, so pokazali najboljše rezultate z metodo Wizard in podobne rezultate pri pomnoževanju pri izolaciji z metodama Wizard in CTAB.

Primerjava vseh štirih metod izolacije s PCR v realnem času je pokazala, da vse metode dajejo podobno dobre rezultate za kvantifikacijo PCR v realnem času, saj so bile učinkovitosti reakcije okoli 100 %.

Komercialna kompleta za izolacijo DNK sta torej primernejša za malo predelana živila in sta tudi hitrejša. V primeru, da je izolacija DNK iz živila kompleksnejša, Mafra in sod. (2008) priporočajo uporabo metode CTAB in metode Wizard. Metoda CTAB je manj uničujoča do DNK. Metoda Wizard daje podobne rezultate kot metoda CTAB, poleg tega je hitrejša, enostavnejša, bolj ekonomična in zato najprimernejša za izolacijo DNK iz močno predelanih sojinih izdelkov (Mafra in sod, 2008).

Arlorio in sod. (2007) so DNK lešnika izolirali s štirimi metodami: metodo po protokolu CTAB: fenol/kloroform/izoamilni alkohol (25 : 24 : 1) in s tremi kompleti za izolacijo DNK: Gene Elute Plant Genomic DNA (Sigma, Milano, Italija), Ultraclean Plant DNA (Cabru, Milano, Italija) in Wizard MAGnetic DNA purification system for food (Promega, Milano, Italija).

Spektrofotometrično pridobljeni rezultati so pokazali najvišjo koncentracijo izolirane DNK s kompletom Wizard, ki je namenjen izolaciji DNK iz maščobnih živil. Ker so olja in maščobe znani inhibitorji PCR, je ta komplet najprimernejši tudi za izolacijo DNK iz živil za analizo s PCR (Arlorio in sod., 2007).

Brežná in sod. (2006) so DNK oreha (*Juglans regia*) izolirali s komercialnim kompletom za izolacijo DNK GeneSpin kit (GeneScan, Freiburg, Nemčija) po navodilih, priloženih kompletu. Količino izolirane DNK so določili spektrofotometrično in izolate uporabili pri določanju alergena gena *Jug r2* oreha *Juglans regia*.

Wang in sod. (2009) so DNK oreha (*Juglans regia*) in nekaterih drugih živil (hikori, ameriški oreh, pistacija, akažu, arašid, sezam, seme korejskega bora, brazilski orešček, sončnično seme, bučno seme in pšenica) izolirali s kompletom Genomic DNA from food kit (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren, Nemčija) po navodilih, priloženih kompletu. Koncentracijo izolirane DNK so izmerili z UV spektrometrijo in izolate uporabili pri določanju alergena proteina oreha s PCR v realnem času.

2.5.7 Načini določanja koncentracije izolirane DNK

Obstaja več načinov merjenja količine oziroma koncentracije izolirane DNK.

Spektrofotometrija je najbolj pogosto uporabljana metoda za ta namen. V vodni raztopini ima DNK maksimum absorbance pri 260 nm. Rezultate je možno odčitati direktno (v ng/ μ L), če vzorec razredčimo z vodo ali pufrom v razmerju 1:20. Najnižja praktična meja določitve DNK je 50 - 100 ng DNK. Proteini imajo absorpcijski maksimum pri 280 nm. Čistost DNK ocenimo z razmerjem A_{260}/A_{280} . V kolikor je razmerje merjenega vzorca DNK v obsegu med 1,7 do 2,0, lahko govorimo o čisti DNK. Enoverižne DNK molekule, RNK molekule, komponente mešanice za PCR ali aromatične komponente (npr. fenol) meritev lahko motijo zaradi absorbiranja svetlobe v istem območju kot DNK. Vzorce DNK, ki vsebujejo encimske ali proteinske stabilizatorje je prav tako težko meriti spektrofotometrično.

Interkalatični fluorokromi, kot je etidijev bromid ali Hoechst 33258, se selektivno vežejo v dvoverižno DNK molekulo. Občutljivost Hoechst 33258 je približno 25 ng DNK/analizo. Prednostna vezava na področja z visoko vsebnostjo A-T (adenin-timin) in zmanjšana vezava na dele DNK, ki so manjši od 500 bp, lahko daje neustrezne rezultate. Obe barvili sta podvrženi bledenju na svetlobi, zato zahtevata visoko razvito opremo. Bledenje poslabša vezavo barvil na DNK, kar vodi tudi do manjše razlike med fluorescenco vezanih barvil in fluorescenco ozadja. Slabost teh barvil je tudi karcinogenost.

Elektroforetske metode omogočajo merjenje koncentracije enostavnih in kompleksnih vzorcev DNK. Barvili, ki se uporabljata v ta namen, sta etidijev bromid in SYBR Green I. SYBR-Green je bolj občutljiv od etidijevega bromida, meja določitve je približno 50 do 250 pg dvoverižne DNK. Metoda ni uporabna za rutinsko kvantifikacijo ali kvantifikacijo velikih 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. PicoGreen je zelo stabilno barvilo na svetlobno razbavljanje, kar omogoča daljši čas osvetlitve in s tem večjo fleksibilnost analiz. PicoGreen je zato uporaben za kvantifikacijo širokega spektra vzorcev DNK (Ahn in sod., 1996).

2.6 TEST ELISA

2.6.1 Princip testa ELISA

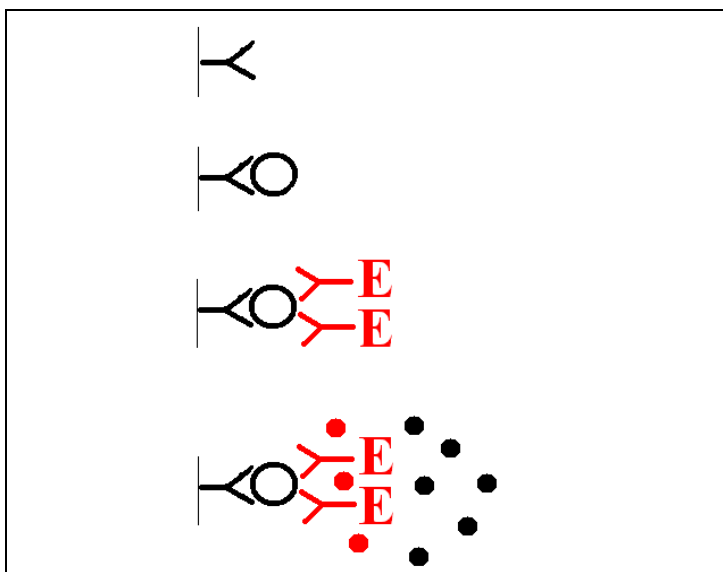
Encimsko-imunski testi ali testi ELISA (ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) temeljijo na uporabi specifičnih protiteles kot detektorjev za izbrani analit, na primer alergen v živilu.

Testi ELISA so osnovani na uporabi encima, pritrjenega na protitelo, ki služi za ugotavljanje vezave antigena na protitelo. Encim spremeni brezbarvni substrat v obarvan produkt, ki dokazuje prisotnost kompleksa protitelo:antigen. Obstajata dve tehniki merjenja antigenov, t.i. sendvič ELISA in kompetitivna ELISA. Skoraj vsi komercialni kompleti testov ELISA za alergene uporabljajo sendvič tehniko (Yeung, 2006).

Princip testa sendvič ELISA (slika 4):

- 1. pasivna vezava protitelesa na površino;
- 2. izpiranje nosilca;
- 3. dodajanje antigena
- 4. izpiranje;
- 5. dodajanje protiteles, specifičnih za antigen in označenih z encimom;
- 6. izpiranje;
- 7. dodajanje substrata, ki razvije barvo;
- 8. določanje.

(Crowter, 1995)



Slika 4: Princip testa sendvič ELISA (Crowter, 1995)

Imunske analize so hitre, občutljive, selektivne in običajno cenovno ugodne. Narejene so lahko za terensko delo (semi-kvantitativne) ali kot standardni kvantitativni laboratorijski postopki. Primerne so za veliko število vzorcev in pogosto ne zahtevajo zahtevnejše priprave vzorcev. V živilski industriji se ELISA testi običajno uporabljajo za detekcijo antigenov, kot so alergeni, pesticidi, mikotoksini ali patogeni (Yeung, 2006).

2.6.2 Primerjava PCR in testa ELISA

Za označevanje prisotnih alergenov v živilih in živilskih izdelkih in za identifikacijo skritih alergenov v predelanih živilih je potrebno zagotoviti analitske metode, s katerimi lahko odkrijemo zelo nizke koncentracije ostankov alergenov v predelanih živilih. Vsaka metoda za detekcijo alergenov v živilih mora biti validirana na občutljivost, specifičnost in določljivost določenega živila, da zagotovimo njeno primernost.

Te metode temeljijo običajno na odkrivanju specifičnih proteinov z encimsko-immunsko reakcijo (ELISA). Razlogi za to so hitro in enostavno rokovanje in enostavna oprema.

Večina komercialnih kompletov in objavljenih postopkov za določanje alergenov temelji na analizi proteinov. Analiz, ki temeljijo na analizi DNK, je razvitih le malo. Razvoj tehnik ELISA traja že več kot 30 let, medtem ko so se analize živil s PCR začele komaj v 90-ih letih 20. stoletja (Holzhauser in sod., 2006).

Testi ELISA so občutljivi in specifični. V nekaterih primerih občutljivost in specifičnost imunoloških analiz ni zadovoljiva, zato imajo prednost metode, ki temeljijo na verižni reakciji s polimerazo (PCR) (Greiner in Konirtzny, 2007). PCR je metoda, ki temelji na določanju specifičnih DNK molekul, zato je primerna za identifikacijo alergenov v živilih (Holzhauser in sod., 2006).

V nasprotju s testi ELISA, ki temeljijo na poliklonskih protitelesih, so lahko vsi PCR reagenti in rekombinantna termostabilna DNK-polimeraza sintetizirani in izdelani v neomejenih količinah.

Specifični reagenti in sonde, potrebni za PCR, zadoščajo potrebi po občutljivosti in učinkovitosti. Test ELISA, ki temelji na poliklonskih protitelesih, je lahko zaradi manjše kompleksnosti pri identifikaciji specifičnih proteinov bolj dovzeten na učinke matriksa. Do lažno negativnih rezultatov lahko pride, če je tarčni protein ali tarčni epitop tekom obdelave živila poškodovan ali če drugi proteini, ki niso določljivi, predstavljajo pomembne skupine alergenov.

Prav tako s PCR ne moremo direktno odkrivati alergenih molekul, saj je tarčna molekula molekula DNK. Zaradi tega nista niti test ELISA niti PCR direktni metodi za odkrivanje alergenov. Obe metodi temeljita na odkrivanju specifičnih markerjev in omogočata ekstrapolacijo na prisotnost posameznega alergena (Holzhauser in sod., 2006). Metode, ki temeljijo na PCR, ne določajo direktno alergenov ali specifičnih proteinov, zato rezultatov ne moremo povezovati z dejanskim možnostjo nastanka alergične reakcije (Greiner in Konirtzny, 2007). Pred odkrivanjem alergenov s PCR je potrebno dokazati pozitivno korelacijo markerja DNK s prisotnostjo potencialno alergenih proteinov v živilu. DNK

najdemo v vseh tkivih rastlinskega ali živalskega porekla, zato lahko specifično odkrivanje DNK dokazuje prisotnost alergena v živilu (Holzhauser in sod., 2006).

Predelava hrane lahko vpliva na DNK drugače kot na proteine. Protein in DNK sta lahko tekom določenih korakov predelave ločena, kar lahko vodi do napačnih rezultatov o prisotnosti alergena v živilu (Greiner in Konirtzny, 2007). Če tehnološki postopki obdelave živila ločijo DNK markerja od frakcije alergenega proteina, ostanke alergenov v sestavinah hrane, kot so proteinski izolati, sladkorji, škrob, arome in visoko obdelana rastlinska olja, težko odkrivamo, in rezultate, dobljene s PCR, težko interpretiramo. Drugi problematični matriksi za PCR analize hrane so živilski proizvodi, kot so mleko, beljak, rastlinska olja in živalske maščobe, ki imajo nizko vsebnost DNK. V tem primeru je ustrežnejši test ELISA.

PCR ni metoda, ki bi bila specifična za določeno tkivo, temveč je specifična za DNK določene vrste ali organizma. Kljub temu ponuja neprimerno boljše določitev vrste in je zato dobra metoda za odkrivanje alergenih komponent rastlinskega ali živalskega izvora v živilu, ki se uporabljajo pri proizvodnji živil. Z uporabo enega samega protokola lahko iz kompleksnega matriksa živila izoliramo DNK mnogih vrst, zato je mogoča analiza večih analitov v enem vzorcu, ki je bil pripravljen z enim samim postopkom. PCR zato lahko postane presejalna metoda, saj trenutno dostopen test ELISA omogoča zgolj analizo enega analita in zahteva optimizirane pogoje ekstrakcije za vsako potencialno alergeno živilo posebej.

Občutljivost PCR je v veliki meri odvisna od količine in kakovosti tarčne DNK. V nekaterih primerih je lahko izolacija DNK uničujoča in onemogoči pomnoževanje. V živilih z nizko pH vrednostjo (npr. okisana ali fermentirana živila) je lahko DNK hidrolizirana, zato je PCR težko izvedljiva. Matriks lahko vpliva tudi na metode, ki temeljijo na proteinih, če so tarčni proteini nagnjeni k degradaciji.

Identifikacija proteinov v alergenih živilih daje več dokazov o možnosti nastanka alergije, kot analiza DNK s PCR. Poleg težav z navzkrižno kontaminacijo, PCR ni praktična metoda za direktno analizo v običajni živilski proizvodni liniji, ker potrebuje specializirane laboratorije. Test ELISA na potopni palčki (ang. dipstick ELISA) ali drugi hitri testi ELISA omogočajo hitro in enostavno rokovanje in so primerni za rutinsko analizo prisotnosti alergenov (Holzhauser in sod., 2006).

Kljub pomanjkljivostim imajo metode, ki temeljijo na DNK, mnoge prednosti pred testi, ki temeljijo na metodah določanja proteinov. Tarčna DNK je izolirana pod točno določenimi pogoji denaturacije, kar manj vpliva na kakovost molekule, kot vpliva ekstrakcija iz matriksa živila na kakovost proteina. Prednost analize DNK je tudi stabilnost DNK molekule na geografske in sezonske variacije, ki lahko vplivajo na vsebnost proteinov (Greiner in Konirtzny, 2007).

2.7 METODE DOLOČANJA ALERGENOC V ŽIVILIH

2.7.1 PCR

Nukleinske kisline, ki so prisotne v živilih, nimajo prehranske vrednosti, so pa značilne za mnoge biološke komponente v kompleksnih živilskih izdelkih. Analiza specifičnih nukleinskih kislin v živilih omogoča določanje prisotnosti ali odsotnosti določene komponente v kompleksnih izdelkih ali identifikacijo specifičnih značilnosti v komponentah živil. DNK, ki je stabilna molekula, in je zato primerna za analizo predelanih živil, je primerna tudi za analizo semen, surovih materialov in sestavin živil. Analize DNK se uporabljajo za genetsko predelana živila, patogene mikroorganizme v živilih, identifikacijo živalskih in rastlinskih vrst, alergenov in določenih sestavin ali kontaminantov živil in živilskih izdelkov. Zaradi visoke občutljivosti, specifičnosti in hitrosti je verižna reakcija s polimerazo (PCR) za ta namen učinkovita metoda (Greiner in Konieczny, 2007). Od sredine 90-tyh let 20. stoletja je postala ta metoda zanimiva kot metoda za določanje alergenov v sledovih v živilskih izdelkih, kar se kaže v povečanem številu objavljenih publikacij in komercialno dostopnih kompletov za PCR-analize (Holzhauser in sod., 2006).

2.7.2 PCR v realnem času

Določanje alergenov s PCR v realnem času na primeru arašidov nakazuje, da relativne vrednosti C_t , dosežene s PCR v realnem času, odražajo relativno vsebnost alergenov v vzorcu. Primerjava PCR v realnem času in testa ELISA, specifična za arašid, kaže, da so relativne vrednosti C_t , dobljene s PCR v realnem času, v korelaciji s količino proteina, izmerjeno s sendvič ELISA testom. 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 ni možna zaradi neznanih proizvodnih stopenj (na primer različni časi in temperature praženja lupinastega sadja) pri predelavi hrane in velikega števila različnih matrikov živil, ki vodijo v variirajoče možnosti določanja bioloških tarčnih molekul proteinov in DNK (Holzhauser in sod., 2006).

2.7.4 Metode določanja oreha kot alergena

2.7.4.1 Test ELISA

Neiemmann in Hefle (2003) sta s testom ELISA za oreh določila 1 ppm oreha ($1 \mu\text{g/g}$) v živilu. Test je bil specifičen, saj je bilo nekaj navzkrižnih reakcij le pri lešniku, ameriškem orehu, ki je bližnji sorodnik oreha, in sezamovih semenih, medtem ko pri več kot 50 drugih vzorcih živil ni bila zaznana nobena aktivnost. Metoda daje proizvajalcem hrane pripomoček za zagotavljanje varnosti njihovih proizvodov (Niemann in Hefle, 2003).

2.7.4.2 PCR v realnem času

Brežná in sod. (2006) so z metodo PCR v realnem času odkrili $0,24 \text{ ng}$ DNK oreha. Praktična meja določljivosti v modelnih piškotih z določeno vsebnostjo oreha je bila

0,01 %. Oligonukleotidni začetniki in TaqMan sonda so bili narejeni za tarčni gen *Jug r2*, ki kodira skladiščni protein iz družine vicilinov in je najpomembnejši alergeni gen oreha (*Juglans regia*). Metoda je bila pozitivna na 8 različnih sort oreha in negativna na 24 drugih rastlinskih tkiv, ki se uporabljajo v živilski industriji, vključno z dvema sortama ameriškega oreha, ki je soroden z orehom (*Juglans regia*). Analiziranih je bilo še 13 vzorcev pekovskih in slaščičarskih izdelkov, od katerih je bil rezultat pri dveh izdelkih pozitiven, čeprav oreh na izdelku ni bil deklariran. Ugotovili so tudi, da je PCR v realnem času uporabna občutljiva in selektivna metoda za ugotavljanje oreha v živilskih izdelkih, ki jo je možno izvršiti v kratkem času (Brežna in sod., 2006).

Wang in sod. (2009) so razvili metodo za določanje oreha s PCR v realnem času z večjo občutljivostjo in specifičnostjo od že objavljene metode Brežne in sod. (2006). Oligonukleotidni začetniki in sonda so bili narejeni in spremenjeni za tarčno sekvenco orehovega skladiščnega proteina iz družine vicilinov, na podlagi članka Brežne in sod. (2006). Analizirani vzorci različnih rastlinskih tkiv in semen so bili pečeni ali praženi. Za določanje teoretične meje določljivosti metode so uporabili 5 razredčitev čiste DNK oreha z destilirano vodo z vsebnostjo DNK oreha od 12,5 ng do 1,25 pg. Za določitev praktične meje določljivosti so bile narejene mešanice prahu orehov in pšenice z 10, 1, 0,5, 0,1, 0,01 in 0,001 % oreha. Pozitiven rezultat s PCR v realnem času na 14 različnih vzorcih je bil samo pri orehu in negativen pri vseh drugih rastlinskih materialih, vključno z ameriškim orehom, ki je ožji sorodnik oreha. Teoretična meja določljivosti metode je bila 0,125 pg DNK oreha, praktična meja določljivosti pa 0,001 % oreha. Obe količini vsebnosti sta bili nižji od količine v predhodno objavljenih metodah, zato je bila metoda PCR v realnem času ustrezno specifična in občutljiva za določanje orehovitih komponent v živilih. Ključna razlika med objavljeno metodo Brežne in sod. (2006) in novo, bolj specifično in občutljivo metodo, je bila v različnih oligonukleotidnih začetnikih in sondi. Novim oligonukleotidnim začetnikom so bili dodani bazni pari C, G in A na 5'-koncu *JuglF* in *JuglR* in tako postali specifični za protein iz družine vicilinov, vendar drugačni od tistega, ki kodira ameriški oreh. Pri sondi so odstranili A in G na 5' in 3'-koncih, da bi povežali C/G razmerje sonde in s tem znižali mejo določljivosti. Nova, izboljšana metoda za ugotavljanje oreha s PCR v realnem času, je postala bolj specifična in bolj občutljiva od že objavljene metode Brežne in sod. (2006) (Wang in sod, 2009).

2.8 ZAKONODAJA S PODROČJA ALERGENOV

Danes še ni zdravila, ki bi preprečevalo vzroke alergij in drugih preobčutljivosti. Posamezniki, nagnjeni k prehranskim alergijam, se lahko izognejo uživanju nevarnih živil oziroma njihovih sestavin le, če so dobro informirani o vseh sestavinah, ki jih živilo vsebuje. Za informiranje posameznika je zelo pomembno, da so na živilu primerno označene vse sestavine, ki povzročajo alergije in reakcije preobčutljivosti, čeprav jih živilo vsebuje le v sledovih. Poleg tega mora sistem kontrole omogočati učinkovit nadzor skladnosti označevanja živil z dejansko vsebnostjo alergenov v živilih, zaradi česar potrebujemo primerne metode odkrivanja alergenov v živilih.

Evropska unija je uvedla zakonodajo za označevanje alergenih substanc v živilih, ki smo jo kot članica EU prevzeli tudi v Sloveniji.

Varnost živil in varovanje interesov potrošnika je čedalje večja skrb javnosti, nevladnih organizacij, strokovnih združenj, mednarodnih trgovskih partnerjev in trgovskih organizacij. Zagotoviti je potrebno zaupanje potrošnikov in trgovskih partnerjev z javnim in preglednim razvojem živilske zakonodaje in z obveščanjem s strani javnih oblasti, kadar obstaja utemeljen sum, da neko živilo lahko predstavlja tveganje za zdravje (IVZ RS, 2010).

Uredba Evropskega parlamenta in sveta o določitvi splošnih načel in zahtevah živilske zakonodaje, ustanovitvi Evropske agencije za varnost hrane in postopkih, ki zadevajo varnost hrane (2002), govori o pretoku varnih in kakovostnih živil, kot o pomembnem vidiku notranjega trga. Zagotoviti je potrebno visoko raven varovanja življenja in zdravja ljudi. To bi naj zagotavljalo povezovanje vrhunskih laboratorijev na regionalni in/ali medregionalni ravni v omrežje za zagotavljanje stalnega spremljanja in nadzora živil in bi imelo pomembno vlogo pri preprečevanju zdravstvenih tveganj. Kadar je namen živilske zakonodaje zmanjšati, odpraviti ali preprečiti tveganje za zdravje ljudi, se upošteva tri, med seboj povezane sestavne dele analize tveganja – oceno tveganja, obvladovanje tveganja in obveščanje o tveganju. Ti zagotavljajo sistematsko metodologijo za določanje učinkovitih, primernih in ciljno usmerjenih ukrepov ali drugih dejavnosti za varovanje zdravja.

Tveganje je po možnost ali verjetnost pojava neželenega učinka na zdravje in resnost tega učinka, ki je posledica ogroženosti. Analiza tveganja je definirana kot proces, sestavljen iz treh med seboj povezanih sestavnih delov: ocene tveganja, obvladovanja tveganja in obveščanja o tveganju. Ocena tveganja je proces na znanstveni podlagi, sestavljen iz štirih korakov: prepoznavanje nevarnosti, opredelitev nevarnosti, ocena izpostavljenosti in opredelitev tveganja. Obvladovanje tveganja je proces presojanja s posvetovanjem zainteresiranih strani o različnih možnostih delovanja ob upoštevanju ocene tveganja in drugih upoštevanja vrednih dejavnikov in po potrebi izbor primernih možnosti za preprečevanje in nadzor. Obveščanje o tveganju pomeni interaktivno izmenjavo informacij in mnenj v okviru analize tveganja o dejavnikih tveganja in tveganjih, drugih dejavnikih, ki vplivajo na tveganje in zaznavanjih tveganj med tistimi, ki skrbijo za obvladovanje tveganj, potrošniki, živilsko dejavnostjo, znanstveniki in drugimi zainteresiranimi skupinami, vključno s pojasnjevanjem ugotovitev ocene tveganja in podlag za odločitve o obvladovanju tveganja. Dejavniki tveganja je biološki, kemijski ali fizikalni dejavnik v živilu, oziroma lastnost ali stanje živila, ki lahko ogroža zdravje ljudi. Za zagotavljanje zaupanja v znanstveno podlago živilske zakonodaje se ocena tveganja izvede na neodvisen, objektiven in pregleden način na podlagi razpoložljivih znanstvenih informacij in podatkov. (Uredba..., 2002)

Po 14. členu oddelka 4 splošnih zahtev živilske zakonodaje (zahteve glede varnosti živil) se mora pri odločanju o tem ali je živilo varno ali ne, upoštevati:

- običajne pogoje uporabe živila s strani potrošnika in pri vsaki fazi pridelave, predelave in distribucije;
- informacije, ki jih je potrošnik prejel, vključno z navedbami na oznaki, ali druge informacije o preprečevanju posebnih neželenih vplivov nekega živila ali skupine živil na zdravje, ki so običajno na voljo potrošniku;

- verjetne takojšnje in/ali kratkoročne in/ali dolgoročne učinke živila na zdravje osebe, ki živilo uživa, in tudi na poznejše rodove;
 - verjetne kumulativne toksične učinke;
 - posebno zdravstveno preobčutljivost posebnih skupin potrošnikov, kadar je živilo namenjeno tej skupini.
- (Uredba..., 2002)

Oreh (*Juglans regia*) je v prilogi 4 Pravilnika o splošnem označevanju predpakiranih živil (2004) označen kot sestavina, ki lahko povzroča alergijo. Sestavine, omenjene v prilogi 4, ki so se uporabile pri proizvodnji živila, in so še vedno prisotne v končnem proizvodu, čeprav v spremenjeni obliki, ali tiste, 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 (pravilnik..., 2004).

Odločba sveta o posebnem programu za raziskave, tehnološki razvoj in predstavitvene dejavnosti v letih 2007 – 2013 (2006) govori o znanostih o življenju in biotehnologiji, kot pomembnih potencialih na področju zdravja in prehrane. Za zagotavljanje referenčnih materialov in validiranih metod sta pomembna dostop do široke palete naprednih biotehnoloških instrumentov in nadzor nad njimi.

Z integriranimi prizadevanji na področju nano-biotehnologije, fizike, biologije in kemije, usmerjenimi v tehnike za odkrivanje, bo JRC (Skupno raziskovalno središče) prispevalo k razvoju novih strategij in tehnologij za spremljanje okolja in zdravja, (ekološke) toksikološke študije, nadzor in varnost prehranske verige živil.

Vse dejavnosti na tem področju morajo biti v skladu s konceptom »od vil do vilic«. JRC naj bi zagotovilo potrditev metod in usklajenih postopkov za široko paleto živil in okrepilo svojo sposobnost obvladovanja kriz na področju prehrane s pomočjo strokovnega znanja pri analizi živil in po potrebi z vpeljavo novih področij. Pozornost bi naj posvečali tesnemu sodelovanju z Evropsko agencijo za varnost hrane.

Ukrepi s tega področja bodo pokrivali naslednja posebna področja:

- potrjevanje molekularne biologije in sklopljenih tehnik za nadzor živil, npr. na področju alergenov, funkcionalnih in ekološko predelanih živil;
- področja, povezana s prehrano in zdravjem, kjer se v prihodnosti pričakuje nova zakonodaja (npr. mikrobiologija, funkcionalna in ekološko predelana živila, alergeni, zdravstvene zahteve pri etiketiranju).

Ugotavljanje skladnosti označb na živilskih izdelkih z dejansko vsebnostjo alergenih substanc je mogoča s pomočjo analiziranja živil na sestavine, ki v živilih povzročajo reakcije preobčutljivosti. Večina snovi, ki povzroča alergije v živilih, so beljakovinskega izvora in jih je mogoče specifično dovolj občutljivo določiti z imunokemijskimi (npr. ELISA) metodami. Z molekularno-biološkimi tehnikami (npr. PCR) lahko določimo odseke DNK, ki so specifični za določeno vrsto rastlinskega ali živalskega tkiva.

Iz zgoraj opisanega je razvidno, da je nujno potrebno vpeljevati metode za določanje alergenih substanc v živilih v zelo nizkih količinah za namen kontrole primernosti označevanja živil in s tem zaščito ljudi, ki so alergični oziroma preobčutljivi na določene sestavine živil.

Visoko raven varovanja zdravja za potrošnika in pravico do obveščanja je mogoče zagotoviti, če je potrošnik ustrezno obveščen o sestavinah živil, med drugim s seznamom sestavin na deklaraciji, na primer sestavin, ki se uporabljajo v predelavi živil in so v končnem izdelku še prisotne ali drugih snovi, ki lahko povzročajo alergije in preobčutljivosti. Nekatere alergije in preobčutljivosti lahko pomenijo nevarnost za zdravje potrošnika. Reakcije so lahko blage ali celo smrtno nevarne. Najobičajnejši alergeni so prisotni v široki paleti predelanih živil. Običajne prehranske alergije so alergije na kravje mleko, sadje, stročnice (še posebej arašide in sojo), jajca, rake, drevesno lupinasto sadje, ribe, zelenjavo (npr. zeleno), pšenico in druge žitarice. Pojavijo se lahko tudi neželene reakcije na aditive. Ker vsi aditivi pogosto niso deklarirani, je izogibanje zaužitju le-teh težko. Zato je nujno potrebno deklarirati aditive, pripomočke pri predelavi živil in druge snovi z alergenim učinkom, ki so zapisani v členu 6 direktive 2000/13/EC, in so predmet pravil označevanja, z namenom posredovanja primernih informacij potrošnikom, ki so nagnjeni k prehranskih alergijam in preobčutljivosti.

Čeprav označevanje ni namenjeno posebnim skupinam potrošnikov, nagnjenim k alergijam ali preobčutljivostim, se svetuje, da tudi njim nudimo nadzorne informacije o sestavi živil. Seznam alergenih snovi naj bi vseboval tista živila, sestavine živil in drugih snovi, ki povzročajo alergijske ali preobčutljivostne reakcije. Označevanje sestavin in drugih snovi v živilu, ki so prisotne v majhnih količinah, je prav tako velikega pomena.

V prilogi člena 6 je med alergenim lupinastim sadjem omenjen tudi oreh (*Juglans regia*) (Uredba..., 2006)

Na Inštitutu za varovanje zdravja RS so v letu 2009 analizirali 345 vzorcev. Uspešno so sodelovali v medlaboratorijskih preiskunjah sheme FAPAS pri analizi različnih materialov na vsebnost alergenov oziroma drugih snovi preobčutljivosti. Izvedli so analize živil na prisotnost alergenov oziroma snovi preobčutljivosti na 345 vzorcih živil, od katerih je bilo 10 analiz narejenih na prisotnost oreha (IVZ RS, 2010).

Inštitut za varovanje zdravja (Oddelek za sanitarno mikrobiologijo) po standardu SIST EN ISO/IEC 17025:2005 s področja biologije in biokemije uporablja encimsko-imunske teste in teste PCR za ugotavljanje prisotnosti alergenov in GMO v vzorcih živil. Vzorci in metode so podani v preglednici 1 (Priloga..., 2009).

Preglednica 1: Metode Inštituta za varovanje zdravja RS za določanje nekaterih alergenov in genetsko spremenjenih organizmov s testi ELISA in PCR (Priloga..., 2009)

Preskusna metoda	Oznaka standarda ali nestandardne preskusne metode	Iskani alergen	Območje preskušanja
PCR	202-I/PCR interna metoda	kvalitativno določanje gensko spremenjenih rastlin	LOD za 35 S: % kopij tarčne DNA, LOD za t-nos: 7,5 kopij tarčne DNA
ELISA	210/ELISA interna metoda	kvantitativno določanje vsebnosti glutena (gliadinov in pripadajočih prolaminov) v živilih	(5 - 400) mg/kg glutena
ELISA	214-I/ELISA interna metoda	kvalitativno določanje vsebnosti arašida (<i>Arachis hypogaeae</i>)	(2,5 – 20) mg/kg
ELISA	215/ELISA interna metoda	kvantitativno določanje vsebnosti lešnikov (<i>Corylus avelana</i>)	(2,5 - 20) mg/kg
PCR v realnem času	217-I/PCR interna metoda	kvalitativno določanje vsebnosti soje (<i>Glycine max</i>)	LOD za lecitin (sojin) gen: 10 mg/kg

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije za izolacijo DNK iz živil

3.1.1.1 Komplet Nucleospin

- komplet za izolacijo DNK Nucleospin Food (50 preparations Macherey-Nagel, 740945.50, Nemčija):
 - 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).

3.1.1.2 Komplet Fermentas

- komplet za izolacijo DNK Genomic DNA Purification Kit (#K0512,100 preparations Fermentas, Kanada):
 - raztopina za lizo celice (Lysis solution),
 - raztopina za obarjanje (Precipitation Solution),
 - raztopina NaCl (NaCl Solution),
- kloroform (1070242500 Merck, Nemčija),
- 96 % etanol (K33731571 436 Merck, Nemčija),
- 70 % etanol (K33731571 436 Merck, Nemčija),
- sterilna H₂O_{KEM}.

3.1.1.3 Komplet Qiagen

- komplet za izolacijo DNeasy Mini Kit (#69104, Qiagen, Nemčija) vsebuje:
 - brezbarvne kolone za izpiranje (DNeasy Mini Spin Columns, 50),
 - vijoličaste kolone za izpiranje (QIAshredder Mini Spin Columns, 50),
 - zbiralne mikrocentrifugirke (Collection Tubes 2 mL, 50),
 - pufer AP1 (Buffer AP1, 40 mL),
 - pufer AP2 (Buffer AP2, 18 mL),
 - pufer AP3/E (Buffer AP3/E, 30 mL),
 - pufer AE (2 x 12 mL),
 - osnovna raztopina RNase (RNase stock solution, 100g/μL, (100 mg/μL), 220 μL).

3.1.1.4 Druge kemikalije za izolacijo DNK iz živil

- kloroform (1024421000, Merck, Nemčija),
- sterilna bidestilirana voda,
- absolutni etanol (K33731571 436 Merck, Nemčija),
- citratni pufer:
 - 0,15M raztopina natrijevega klorida (NaCl) (H5271 Promega, ZDA),
 - 0,015 M raztopina natrijevega citrata (1405407 Kemika, Hrvaška),
- citratni pufer z NaDS (SSC + NaDS reagent (EtOH + NaDS)):
 - NaDS (BKL – 03/p2, Sigma, ZDA),
- fenol/kloroform (77619, Fluka, Švica),
- nasičena raztopina NaCl (5,4 mol/L) (H5271 Promega, ZDA),
- 96 % etanol ((K33731571 436 Merck, Nemčija),
- raztopina za spiranje SSC:
 - 0,15 M raztopina natrijevega klorida (NaCl) (H5271 Promega, ZDA),
 - 0,015 M raztopina natrijevega citrata (1405407 Kemika, Hrvaška),
- pufer TE (pH = 8,0):
 - 0,05 M raztopina Tris-baze (pH = 8,0) (H5131 Promega, ZDA),
 - raztopina Na₂-EDTA (E-5134 Sigma, ZDA),
- pufer TE s sarkozinom:
 - 0,05 M raztopina Tris-baze (pH = 8,0) (H5131 Promega, ZDA),
 - 0,02 M raztopina Na₂-EDTA (E-5134 Sigma, ZDA),
 - 5 % raztopina N-lauroil sarcosina (L-9150 Sigma, ZDA),
- pufer TE s proteinazo:
 - 0,05 M raztopina Tris-baze (pH = 8,0) (H5131 Promega, ZDA),
 - 0,02 M raztopina Na₂-EDTA (E-5134 Sigma, ZDA),
 - proteinaza K: 25 mg/mL (P-2308 Sigma, ZDA),
- fenol nasičen s Trisom (93331-1L, Fluka, Švica),
- kloroform (1024421000, Merck, Nemčija),
- 3 M raztopina natrijevega acetata (S-2889 Sigma, ZDA),
- 96 % in 80 % etanol (K33731571 636 Merck, Nemčija).

3.1.2 Reakcijska mešanica za PCR v realnem času

- TaqMan Universal MasterMix, (4304437 Applied Biosystems, ZDA),
- Nuclease Free Water (129115 Qiagen, Nemčija),
- sonda (JugIP) in par oligonukleotidnih začetnikov (JugIF in JugIR) za *Juglans regia* (Brežná in sod., 2006): 10 pmol/μL.
 - JugIP FAM-ATTGTGCCTCTGTTGCTCCTCTTCCCG-TAMRA (1866212, Applied Biosystems, ZDA),
 - JugIF GCGCAGAGAAAGCAGAG (1866210, Applied Biosystems, ZDA),
 - JugIR CTCATGTCTCGACCTAATGCT (1866211, Applied Biosystems, ZDA)

```
gacgtggcagagacgacgatgacgagagagaatccgctgacccacgagaacagatcgcgaatgccaggagtagtgcgggag
gcaagggc aaggacagcgtcaacagcagcaatgccaaatcaggtgcgaggagcggtagaaggaggaccaaagaagtc aaga
agaaaggggagcggcggcagagagcgtagacgaccagaatccgcgagacccagaacagcggtagagcagtgtagca
acagtgtgaaaggcaacgaagggtcaggagcaaacactatgccggagaaaggtgtgagcaacggagacaacaagaagaaag
agagcgc caacgtggc agagaccgacaagatccccacaacagtaccacagatgccaacgccgatgccagatacaagagcaa
agccccggaaaaggcaaatgccagcaacgatgcgaacgacaatacaaggagcagc aaggcagagaacggggac caga
ggcaagcccgcgcagagaaagcagaggccgggaaggaggagcaacagaggcacaatccctactacttctactccagagcatt
aggctcagagacatgagtcggaggaaggtgaagttaaatacttgagaggttcacggagagaac cagctccttctgtggcattgaga
attaccgtgtgttatcttgatgcaaatcctaaccctcatgctcccacatcacaagatgcgggaatctgttggcgtagtcaaacg
agggaaggcgcaccctc accttagtatctcaagagacaagagagtcgttcaacctcgaagtgtgagatgttataagggttcctgcgg
gtgctaccgtgtatgtgattaaccaagacagtaacgagaggctagagatggtgaaactcctccagcccgtcaacaatcctggc caa
tttaggggaatactatgc agctgtgtgctaaaagtcctgatcaatcatatctcagggtattc agcaatgatattctcgtcgcagctctaat
acccccgagggcagaggttagagaggttcttcgacagcaggagcagcgggaaggagtaatcctc agagcctcacaagagaagct
cagggcattgagccaacacgccatgtctgccggccagaggccatggggccgccgctcctctgggggtcttatcagctcaaaaag
cgaaaagtcctcctactcgaatcagttggcagttcttcgaggttgccccgaggagcacaggcaactgcaagagatggatgtcc
ttgtcaattacgccgaaatcaaacgaggagctatgatggtgccccactacaattctaaagccacagttgtagtgtatgtgtagaag
ggactggacgctatgaaatggcctgccacatgttcaagccagagctacgaaggccaaaggagagaacaagaggaggga
agagagc actgggcgatccagaaggtaacggctcgtttggcacgtggagatatattgtaatccggcagggcacccgattgcga
taactgccctcagaatgagaatctgcgttactcggcttcgacattaatggcgagaacaaccagagagacttcttggcggc aaa
acaacataaataacagtttagagagagaagcaaaaggagctgtcgttcaacatgccacgagaagagatagaagagataattgaaag
ccagatgggaatcttattttgtgccacggaaaggcagagccgacgtggccaaggagagaccaccattggc atcaattttggact
tcgcttcttcaagtaggctagcaaaagtatgtc caaattatcc atatcatgcaatgctttgttggttttgtatgtaataatgtcttaataat
ataagatagtagatcagacggatgagtactgaggcgtgtgttaaaagtgttaagcagcc ttatggagtaactaagtagtacttc
tgtattcggatgaaagttgtc tagctttgatgatcagatgcataaataaaacaaagttccatgtgttgctc aaaaaaaaaa aaaaaaa
aaaaaaa
JugIR GCGCAGAGAAAGCAGAG
JugIF CTCATGTCTCGACCTAATGCT
JugIP FAM-ATTGTGCCTCTGTTGCTCCTTCCCG-TAMRA
```

Slika 5: Prikaz sekvenc oligonukleotidnih začetnikov JugIR in JugIF ter sonde JugIP v genomu alergenege gena *Jug r2*, *Juglans regia*

3.1.3 Vzorci

3.1.3.1 Vzorci alergenov

- orehi *Juglans regia* sort: /, Ronde de Montignac/04, A-117/04, G-139/04, ELIT/04, CISCO/04, CROSVERT/04,
- mandlji (blanširani, Biamed, ZDA).

3.1.2.2 Standardni orehovi piškoti

Sestavine za izdelavo standardnih orehovitih piškotov:

- orehi *Juglans regia* sorte /,
- listnato testo (Mercator):
 - sestavine: pšenična moka Tip 500, hidrogenirana rastlinska maščoba, voda, kis,
 - neto količina: 500 g,
 - proizvajalec: Žito Ljubljana,
- mandlji (blanširani, Biamed, ZDA).

3.1.3.3 Vzorci živil

- Orehovi rogljiči:
 - sestavine: pšenična moka tip 500, sladkor, margarina, jajca, orehi (12 %), vanilja,
 - neto količina: 500 g,
 - proizvajalec: Slaščičarstvo in pekarstvo Brodnik.
- Orehovo čokoladno pecivo:
 - sestavine: pšenična moka tip 500, sladkor, margarina, jajca, vanilja, čokoladni preliv, orehi,
 - neto količina: 500 g,
 - proizvajalec: Slaščičarstvo in pekarstvo Brodnik.
- Orehovo pecivo:
 - sestavine: pšenična moka tip 500, sladkor, margarina, jajca, orehi (20,6 %), vanilja, naravne arome,
 - neto količina: 500 g,
 - proizvajalec: Slaščičarstvo in pekarstvo Brodnik.
- Orehova potica:
 - sestavine: pšenična moka tip 500, orehi (46 %), pekovski kvas, mleko, sladkor, maslo, jajca, vaniljin sladkor, limonina lupinica, rum,
 - neto količina: 500 g,
 - proizvajalec: Hotel Slon.
- Orehov jurček:
 - sestavine: pšenična moka tip 500, orehi (30 %), margarina, sladkor, čokolada, jajca, maslo sredstvo za vzhajanje pecilni prašek,
 - proizvajalec: domača proizvodnja.

3.1.4 Laboratorijska oprema

Laboratorijska oprema, ki smo jo pri raziskovalnem delu uporabljali, je navedena v preglednici 2:

Preglednica 2: 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
centrifuga	Mini Spin PLUS	Eppendorf, Francija
hladilnik	/	LTH, Slovenija
hladilnik	/	Gorenje, Slovenija
tehtnica	MonoBloc PB 1502-S	Mettler Toledo, Švica
precizna tehtnica	AB 204-S	Mettler Toledo, Švica
vodna kopel	WB-30	Kambič, Slovenija
zamrzovalnik (-20 °C)	/	Gorenje, Slovenija
zamrzovalnik (-20 °C)	/	LTH, Slovenija
zamrzovalnik (-80 °C)		Heto Ultra Freeze, ZDA
mlinček za mletje oreščkov		Pocajt, Slovenija
namizno mešalo	TTS 2	Yelowline, Nemčija
centrifuga	Rotanta 460 R	Hettich Zentrifugen, Nemčija
sonifikator	UCX-750 Ultrasonic processor	Sonics & Materials, Inc. Newton, ZDA
spektrofotometer	LAMBDA Bio PLUS Spectrophotometer	Perkin-Elmer, Norwalk, Conn., ZDA
konvekcijska peč	MIWE aeromat 4,64 T	MIWE, Nemčija

Poleg laboratorijske opreme, ki je navedena v preglednici 2, smo pri raziskovalnem delu uporabili še splošno laboratorijsko opremo: terilnice, pestila, Eppendorfove mikrocentrifugirke (0,5 mL, 1,5 mL, 2,0 mL), žlice, aluminijasto folijo, stojala, merilne valje, čaše, elenmajerice, pincete in vrstične posodice s pokrovčki za izvedbo PCR v realnem času (Applied Biosystems).

3.2 METODE

3.2.1 Postopki izolacije DNK iz vzorcev živil

3.2.1.1 Izolacija s kompletom Nucleospin

Protokol za izolacijo DNK s kompletom Nucleospin (Macherey – Nagel, 2008):

- korak 1: Homogenizacija vzorca: v terilnici smo homogenizirali vzorec in v mikrocentrifugirko odtehtali 200 mg vzorca.
- korak 2: Liza celice: dodali smo 550 µL pufra CF, segretega na 65 °C, 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. Po inkubaciji smo zmes centrifugirali 10 min pri hitrosti 9700 RCF.

- korak 3: Prilagoditev pogojev za vezavo DNK: prenesli smo 300 μL čistega supernanata v novo mikrocentrifugirko. Dodali smo 300 μL pufru C4 in 300 μL absolutnega etanola. Zmes smo 30 s mešali na namiznem mešalniku.
- korak 4: Vezava DNK: odpipetirali smo 750 μL zmesi v kolono za izpiranje, vstavljeno v zbiralno mikrocentrifugirko, centrifugirali 1min pri 9700 RCF in zavrgli tekočo fazo.
- korak 5: Spiranje in sušenje silikonske membrane:
 1. spiranje: 400 μL pufru CQW smo odpipetirali v kolono za izpiranje, centrifugirali 1 min pri 9700 RCF in zavrgli tekočo fazo.
 2. spiranje: 700 μL pufru C5 smo odpipetirali v kolono za izpiranje, centrifugirali 1 min pri 8100 RCF in zavrgli tekočo fazo.
 3. spiranje: 200 μL pufru C5 smo odpipetirali v kolono za izpiranje, centrifugirali 2 min pri 8100 RCF, da smo popolnoma odstranili pufer C5.
- korak 6: Spiranje DNK: kolono za izpiranje smo vstavili v novo zbiralno mikrocentrifugirko. 100 μL CE pufru, segretega na 70 °C, smo odpipetirali v kolono za izpiranje, inkubirali 5 min pri sobni temperaturi in centrifugirali 1 min pri 8100 RCF.

3.2.1.2 Izolacija s kompletom Fermentas

DNK vzorca živila smo izolirali po protokolu kompleta za izolacijo DNK Fermentas (Fermentas, 2008):

- korak 1: vzorec smo eno uro zamrzovali pri -80 °C in ga nato s pomočjo tekočega dušika v terilnici zdrobili;
- korak 2: 200 mg vzorca smo odtehtali v mikrocentrifugirko, dodali 400 μL raztopine za lizo celice in inkubirali 5 min pri 65 °C;
- korak 3: takoj po inkubaciji smo dodali 600 μL kloroforma in s previdnim obračanjem mikrocentrifugirke premešali. Zmes smo nato 2 min centrifugirali pri 6700 RCF;
- korak 4: raztopino za obarjanje smo pripravili z mešanjem 720 μL sterilne deionizirane $\text{H}_2\text{O}_{\text{KEM}}$ in 80 μL 10 x koncentrata raztopine za obarjanje;
- korak 5: zgornjo, vodno fazo, smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in dodali 800 μL sveže pripravljene raztopine za obarjanje, previdno mešali z obračanjem 1-2 min in centrifugirali 2 min pri 6700 RCF;
- korak 6: zavrgli smo supernatant in pelet popolnoma raztopili v 100 μL 1,2 M raztopine NaCl;

- korak 7: dodali smo 300 μL na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ohlajenega etanola in DNK obarjali 10 min pri temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zmes smo centrifugirali 3-4 min pri 6700 RCF, odlili etanol in raztopili DNK v 100 μL sterilne deionizirane $\text{H}_2\text{O}_{\text{KEM}}$ z nežnim mešanjem na namiznem mešalu.

3.2.1.3 Izolacija s kompletom Qiagen

DNK vzorca živila smo izolirali po protokolu kompleta za izolacijo DNK Qiagen (Qiagen, 2006):

- korak 1: vzorec smo 1 uro zamrzovali pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in ga nato s pomočjo tekočega dušika v terlnici zdrobili;
- korak 2: 100 mg vzorca smo odtehtali v 2 mL mikrocentrifugirko in mu dodali 400 μL pufra AP1, 4 μL osnovne raztopine RNase in premešali na namiznem mešalu. Zmes smo nato inkubirali pri $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min in med inkubacijo 3 krat premešali z obračanjem mikrocentrifugirke;
- korak 3: po inkubaciji smo dodali 130 μL pufra AP2 in zmes premešali na namiznem mešalu ter inkubirali 5 min na ledu in centrifugirali 5 min pri 13100 RCF;
- korak 4: po centrifugiranju smo lizat odpipetirali v vijoličasto kolono za izpiranje, jo vstavili v 2 mL zbiralno mikrocentrifugirko in centrifugirali 2 min pri 131000 RCF;
- korak 5: tekočo frakcijo smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in dodali 1,5 x volumen pufra AP3/E in premešali s pipeto. 650 μL te zmesi smo prenesli v brezbarvno kolono za izpiranje, jo vstavili v 2 mL zbiralno mikrocentrifugirko, centrifugirali 1 min pri 4300 RCF in zavrgli tekoči del;
- korak 6: v isto kolono smo odpipetirali 650 μL zmesi iz koraka 5, premešali, centrifugirali 1 min pri 4300 RCF in zavrgli tekoči del;
- korak 7: kolono smo prenesli v novo zbiralno mikrocentrifugirko, dodali 500 μL pufra AW, centrifugirali 1 min pri 4300 RCF in zavrgli tekoči del;
- korak 8: v isto kolono smo ponovno odpipetirali 500 μL pufra AW in centrifugirali 2 min pri 13100 RCF;
- korak 9: kolono za izpiranje smo prenesli v novo zbiralno mikrocentrifugirko, dodali 100 μL pufra AE, inkubirali 5 min pri sobni temperaturi in centrifugirali 1 min pri 4300 RCF;
- korak 10: ponovili smo korak 9 in shranili tekočo fazo.

3.2.1.4 Izolacija z modificiranim postopkom za izolacijo DNK iz telečjega priželjca

Izolacija DNK po modificiranem postopku za skrajšan postopek za izolacijo DNK iz telečjega priželjca (Abram in sod., 2006):

- korak 1: 0,2 g vzorca smo odtehtali v 2 mL mikrocentrifugirko in vzorec zamrzovali pri -80 °C eno uro;
- korak 2: vzorec smo s pomočjo tekočega dušika strli v terilnici;
- korak 3: dodali smo 1mL citratnega pufra, dobro premešali in postavili takoj na led;
- korak 4: centrifugirali smo 5 min pri 2000 RCF in pri 4 °C;
- korak 5: odpipetirali smo supernatant in ga zavrgli;
- korak 6: korake 3-5 smo ponovili trikrat;
- korak 7: dodali smo 1 mL citratnega pufra z NaDS (SSC + NaDS reagent);
- korak 8: vsebino smo homogenizirali s sonifikatorjem (1 min, 50 % amplituda);
- korak 9: zmes smo inkubirali 30 min na ledu in občasno premešali na namiznem mešalniku;
- korak 10: dodali smo 550 µL fenol/kloroforma in previdno premešali z obračanjem mikrocentrifugirke;
- korak 11: centrifugirali smo 5 min pri 2000 RCF;
- korak 12: zgornjo fazo smo odpipetirali v novo mikrocentrifugirko;
- korak 13: dodali smo 120 µL nasičene raztopine NaCl (5,4 M), premešali in inkubirali na ledu 5 -10 minut;
- korak 14: po inkubaciji smo zmes centrifugirali 15 minut pri 2054,32 RCF;
- korak 15: zgornjo, bistro fazo, smo odpipetirali v novo mikrocentrifugirko;
- korak 16: dodali smo dvojni volumen ledeno hladnega 96 % etanola in zmes inkubirali čez noč pri -20 °C;
- korak 17: po inkubaciji smo zmes centrifugirali 10 min pri 18330 RCF;
- korak 18: zavrgli smo supernatant in DNK raztopili v 200 µL TE pufra;
- korak 19: raztopino smo shranili pri -20 °C.

3.2.1.5 Izolacija z modificiranim postopkom za izolacijo bakterijske DNK

Izolacija DNK po spremenjenem protokolu za izolacijo in kvantifikacijo bakterijske DNK (Flamm in sod., 1984):

- korak 1: vzorec smo zamrzovali pri -80°C eno uro in ga v terilnici strli s pomočjo tekočega dušika;
- korak 2: v 2 mL mikrocentrifugirko smo odtehtali 200 mg vzorca, dodali 1 mL SSC, premešali in inkubirali pri sobni temperaturi;
- korak 3: po inkubaciji smo zmes centrifugirali 2 min pri 11300 RCF;
- korak 4: supernatant smo odpipetirali v novo mikrocentrifugirko, sediment zavrgli, dodali 1 mL SSC in centrifugirali 2 min pri 11300 RCF;
- korak 5: zavrgli smo supernatant, sedimentu dodali 200 μL pufra TE s sarkozinom in 100 μL pufra TE s proteinazo K;
- korak 6: zmes smo inkubirali v vodni kopeli eno uro pri 37°C ;
- korak 7: po inkubaciji smo zmes mešali eno minuto na namiznem mešalu, dodali 500 μL fenola nasičenega s Trisom in ponovno premešali na namiznem mešalu;
- korak 8: zmes smo centrifugirali 2 min pri 9700 RCF;
- korak 9: zgornjo fazo smo pazljivo odpipetirali v novo mikrocentrifugirko, dodali 500 μL kloroforma in premešali z obračanjem mikrocentrifugirke;
- korak 10: zmes smo centrifugirali 2 min pri 9700 RCF in pazljivo odpipetirali zgornjo fazo v novo mikrocentrifugirko;
- korak 11: koraka 9 in 10 smo ponovili dvakrat;
- korak 12: dodali smo 50 μL 3M Na-acetata in 1 mL absolutnega etanola ter dobro premešali.
- korak 13: zmes smo inkubirali čez noč pri temperaturi -20°C ;
- korak 14: po inkubaciji smo zmes centrifugirali 10 minut pri 11300 RCF in pazljivo odstranili supernatant;
- korak 15: sedimentu smo dodali 500 μL ledeno hladnega 80 % etanola, premešali in centrifugirali 5 min pri 11300 RCF;
- korak 16: odstranili smo supernatant in pelet posušili na zraku;

- korak 17: pelet smo raztopili v 200 μL destilirane $\text{H}_2\text{O}_{\text{KEM}}$ in raztopine shranili pri -20 °C.

3.2.2 Priprava in izvedba PCR v realnem času

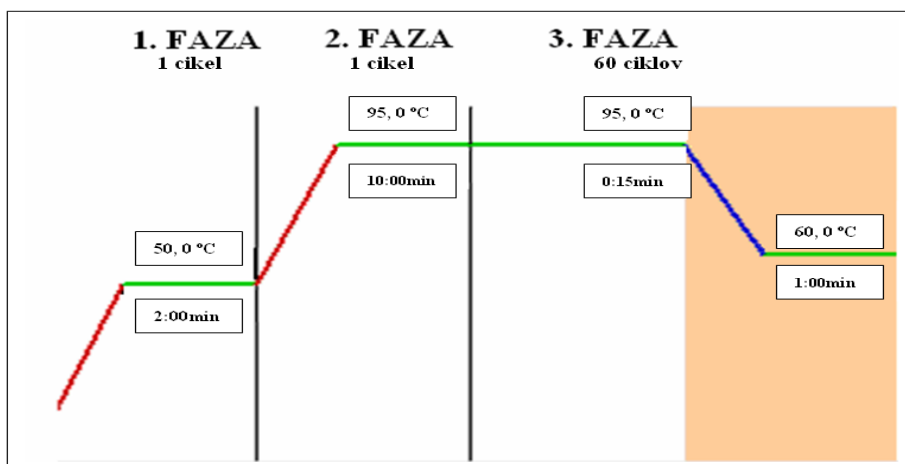
3.2.2.1 Priprava reakcijske mešanice

V reakcijski mešanici skupnega volumna 25 μL za določanje oreha (*Juglans regia*) so bili naslednji reagenti:

- TaqMan Universal MasterMix 2 x: 12,5 μL ,
- par oligonukleotidnih začetnikov za *Juglans regia*:
 - JuglR: 10 pmol/ μL ,
 - JuglF: 10 pmol/ μL ,
- sonda za *Juglans regia*:
 - JuglP: 10 pmol/ μL .

3.2.2.2 PCR v realnem času in vrednotenje rezultatov

Za določanje oreha *Juglans regia* smo uporabili PCR v realnem času s specifičnim parom oligonukleotidnih začetnikov JuglR in JuglF in specifično sondo JuglP (Brežna in sod., 2006). V reakcijsko mešanico (3.1.2) smo dodali 5 μL pripravljene DNK. Imeli smo dve negativni kontroli, za kateri smo uporabili isto reakcijsko mešanico, namesto DNK oreha pa smo dodali DNK mandlja oziroma $\text{H}_2\text{O}_{\text{PCR}}$ za NTC. Nato smo uporabili univerzalni program aparata ABI Prism 7500 (Slika 6), le da smo v tretji fazi spremenili število ciklov iz 40 na 60, da bi lahko določili tudi oreh v sledovih, ki ima običajno visoko vrednost C_t .



Slika 6: Temperaturno-časovne faze pomnoževanja DNK v aparatu ABI Prism 7500

Po zaključeni encimski reakciji smo določili za posamezni vzorec 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 0,02 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.

3.2.3 Optimizacija PCR v realnem času

PCR v realnem času smo optimizirali z določitvijo optimalne koncentracije sonde JugIP za specifično določanje oreha. Koncentracijo sonde smo optimizirali tako, da smo encimsko reakcijo z nerazredčeno in 100 x razredčeno DNK oreha preizkusili z reakcijskimi mešanici, ki so imele različne koncentracije sonde JugIP, in sicer 50, 100, 150 in 200 nmol/L. Kot najboljšo smo določili tisto najnižjo koncentracijo, kjer je bila encimska reakcija še učinkovita. Za vse nadaljnje preizkuse smo nato uporabili izbrano koncentracijo sonde.

3.2.4 Določitev specifičnosti PCR v realnem času

Specifičnost PCR v realnem času smo določali tako, da smo izolirali DNK iz različnih sort oreha *Juglans regia* (/), Ronde de Montignac/04, A-117/04, G-139/04, ELIT/04, CISCO/04, CROSVERT/04) in preverili, ali imajo vse omenjene sorte gen *Jug r2*, torej ali encimska reakcija pri vseh sortah daje pozitiven rezultat.

3.2.5 Določitev občutljivosti in učinkovitosti PCR v realnem času ter relativna kvantifikacija alergena v živilu

3.2.5.1 Občutljivost in učinkovitost PCR v realnem času, določena s čisto DNK oreha

Občutljivost PCR v realnem času smo določili tako, da smo koncentracijo izolirane DNK čistega oreha najprej izmerili spektrofotometrično, nato smo DNK razredčevali s H_2O_{PCR} in ugotavljali, katera je najnižja koncentracija DNK oreha, pri kateri encimska reakcija še daje pozitiven rezultat. Iz koncentracije čiste DNK in pripadajočih vrednosti C_t smo izračunali umeritveno krivuljo 1 po enačbi 1 (2.5.2.1) (Pfaffl in sod., 2002; Pfaffl, 2001). Učinkovitost PCR v realnem času za določanje oreha smo določili po enačbi 3, kjer k pomeni naklon premice, E pa učinkovitost PCR v realnem času (2.5.2.1.) (Pfaffl, 2001).

3.2.5.2 Občutljivost in učinkovitost PCR v realnem času, določena s standardnimi orehovimi piškoti in relativna kvantifikacija alergena

Standardne orehove piškote smo pripravili tako, kot navajajo Piknová in sod. (2008), pri čemer smo namesto lešnikov uporabili orehe in namesto orehov mandlje ter piškote pekli različno dolgo.

Orehe in mandlje smo mleli ločeno v dveh mlinčkah za mletje oreščkov in pripravili polnila za piškote. Polnilo z 0 % oreha je vsebovalo samo mandlje. Pri 0,01 % polnilu je bilo 0,01 % oreha in 99,9 % mandljev. Enako smo pripravili polnila z 0,05 % 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10 in 100 % (w/w) oreha. 5 g vsakega polnila smo zavili v 10 g listnatega testa, posamezne piškote smo zavili v aluminijasto folijo in jih pekli 0, 15 in 30 min pri 180 °C (Piknová in sod., 2008).

Iz standardnih orehovitih piškotov smo nato izolirali DNK in koncentracije določili spektrofotometrično. Iz spektrofotometrično določenih koncentracij izolirane DNK iz standardnih piškotov, ki so vsebovali DNK orehov, mandljev in pšenice, smo za PCR v realnem času pripravili razredčene DNK z enako koncentracijo DNK, to je 30 ng/ μ L. V reakcijski mešanici smo imeli vedno 30 ng DNK/ μ L oziroma 150 ng/25 μ L.

V standardnih orehovitih piškotih smo po različnih časih pečenja s PCR v realnem času določali oreh in iz vrednosti C_t ugotavljali, ali čas pečenja vpliva na učinkovitost encimske reakcije, oziroma na učinkovitost izolacije DNK iz standardnih orehovitih piškotov. Narisali smo grafe odvisnosti C_t vrednosti od desetiškega logaritma koncentracije oreha v standardnem piškotu [$\log(\%)$] brez pečenja, po 15 in po 30 min pečenja in med seboj primerjali učinkovitosti reakcij.

Po PCR v realnem času smo iz dobljenih vrednostih C_t za standardne orehove piškote preračunali koncentracije DNK oreha v standardnih orehovitih piškotih iz umeritvene krivulje 1. Nato smo narisali umeritveno krivuljo 2 kot odvisnost vrednosti C_t od t.i. relativne koncentracije oreha v piškotu [$\log(\%)$]. Narisali smo še umeritveno krivuljo 3, kot odvisnost C_t od desetiškega logaritma koncentracije oreha v standardnem orehovem piškotu [$\log(\text{ng oreha/mL piškota})$]. Hkrati smo določili tudi relativno praktično občutljivost alergena v izdelku – občutljivost PCR v realnem času v standardnih orehovitih piškotih glede na celotno izolirano DNK piškota.

Ker je bila relativna praktična občutljivost, izračunana iz umeritvene krivulje 3 [ng oreha/ μ L izolirane DNK], za praktično uporabo neuporabna, smo koncentracije dodanega oreha na standardni piškot preračunali v mg oreha/g izdelka in narisali umeritveno krivuljo 4, iz katere smo nato določili občutljivost PCR v realnem času v standardnih orehovitih piškotih.

3.2.5.3 Relativna kvantifikacija alergena v vzorcih živil

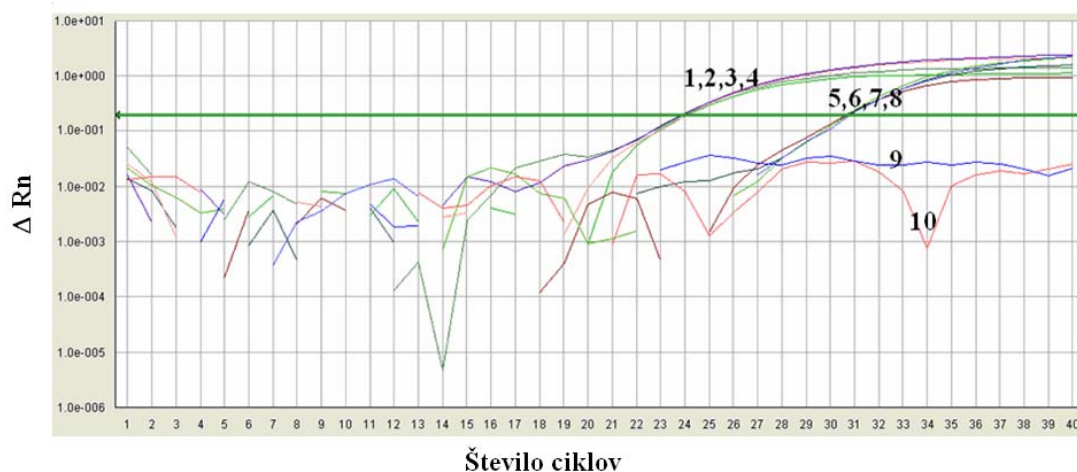
Iz vzorcev orehovega peciva smo izolirali DNK, izmerili celotno koncentracijo DNK vzorcev in koncentracije primerjali z izmerjenimi koncentracijami DNK čistega oreha ter vzorcev za praktično umeritveno krivuljo 2. Koncentracije DNK, izolirane iz posameznih vzorcev orehovega peciva za PCR v realnem času, smo razredčili na 30 ng DNK/ μ L. Nato smo s PCR v realnem času določili vrednosti C_t in iz umeritvene krivulje 2, 3 in 4 ocenili koncentracijo oreha v vzorcih živil.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 OPTIMIZACIJA PCR V REALNEM ČASU ZA DOLOČANJE OREHA

Optimizacija PCR v realnem času za določanje oreha je zajemala optimizacijo koncentracije sonde JuglP. Koncentracijo sonde smo optimizirali tako, da smo pripravili različne reakcijske mešanice, v katerih so bile različne koncentracije sonde (50 nmol/L, 100 nmol/L, 150 nmol/L, 200 nmol/L) in nato izvedli PCR v realnem času. Kot optimalno koncentracijo smo izbrali najnižjo koncentracijo sonde JuglP, kjer je bil rezultat pozitiven in je imel najnižjo vrednost C_t .

Na sliki 7 vidimo, da so bili rezultati PCR v realnem času za določanje oreha pozitivni ne glede na koncentracijo sonde v reakcijski mešanici. Pri vzorcih 1 - 4 so bile vrednosti C_t nižje od vrednosti C_t pri vzorcih 5 - 8, ker je bila koncentracija DNK oreha v prvih štirih vzorcih 100 x višja. Negativen rezultat pri vzorcu 9 je pravilen, saj je bila tarčna DNK DNK mandlja, prav tako pri vzorcu 10, kjer je bila v reakcijsko mešanico namesto DNK dodana voda.



Slika 7: Rezultati PCR v realnem času za določanje oreha z različnimi koncentracijami sonde JuglP

Legenda: ΔRn : normaliziran fluorescentni signal; **1 - 4:** nerazredčena DNK oreha, **5 - 8:** 100 x razredčena DNK oreha, **1, 5:** koncentracija sonde 200 nmol/L, **2, 6:** koncentracija sonde 150 nmol/L, **3, 7:** koncentracija sonde 100 nmol/L, **4, 8:** koncentracija sonde 50 nmol/L, **9:** 100 x razredčena DNK mandlja, **10:** NTC negativna kontrola

Ker so bile vrednosti C_t skoraj enake pri vzorcih 1 - 4 in pri vzorcih 5 - 8, ki so imele enake koncentracije oreha, smo pri vseh nadaljnjih eksperimentih v reakcijskih mešanicah za PCR v realnem času za določanje oreha uporabili 50 nmol/L sonde JuglP (preglednica 3). Koncentracija oligonukleotidnih začetnikov je bila povsod 900 nmol/L.

V naših eksperimentih je bila določena koncentracija sonde JuglP (50 nmol/L) nižja, kot pri že objavljenih metodah. Brežna in sod. (2006) in Wang in sod. (2009) so PCR v realnem času za določanje oreha uporabili višjo koncentracijo sonde 200 nmol/L.

Preglednica 3: Vrednosti C_t analize PCR v realnem času za določanje oreha z različnimi koncentracijami sonde JugIP

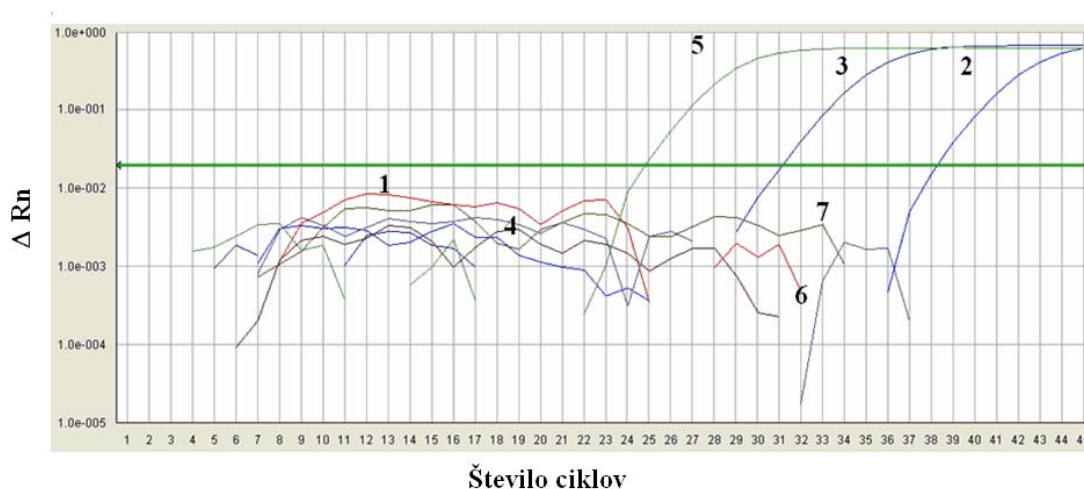
Št. vzorca	Koncentracija DNK oreha	Koncentracija sonde (nmol/L)	Vrednost C_t
1	nerazredčena	200	24,17
2	nerazredčena	150	24,15
3	nerazredčena	100	24,14
4	nerazredčena	50	24,05
5	100 x razredčena	200	30,69
6	100 x razredčena	150	30,83
7	100 x razredčena	100	30,64
8	100 x razredčena	50	31,04
9	100 x razredčena DNK mandlja	200	-
10	NTC - negativna kontrola	200	-

4.2 UČINKOVITOST IZOLACIJE DNK OREHA

DNK oreha smo izolirali z različnimi metodami in z izolirano DNK izvedli PCR v realnem času tako, da smo v reakciji vedno uporabili z 2 μ L 100 x razredčene DNK posameznega vzorca. Preizkusili smo naslednje postopke izolacije DNK:

- izolacija s kompletom Nucleospin,
- izolacija s kompletom Fermentas,
- izolacija s kompletom Qiagen,
- izolacija po modificiranem postopku za izolacijo DNK iz telečjega priželjca,
- izolacija po modificiranem postopku za izolacijo bakterijske DNK.

Vzorci 2, 3 in 5 na sliki 8 imajo pozitiven rezultat, kar pomeni, da je bila izolacija s temi metodami uspešna. Pri vzorcu 5, kjer je bila DNK oreha izolirana s kompletom za izolacijo DNK Nucleospin, je bila vrednost C_t najnižja. Rezultat pri vzorcih 1 in 4 je negativen, kar pomeni, da izolacija ni bila uspešna. Negativen rezultat pri vzorcih 6 in 7 je pravilen, saj sta oba služila kot negativni kontroli. Prvemu smo dodali DNK mandlja, drugemu smo namesto DNK dodali vodo.



Slika 8: Rezultati PCR v realnem času za določanje oreha, izvedenega s suspenzijami DNK oreha, izoliranimi po različnih postopkih

Legenda: ΔRn : normaliziran fluorescentni signal: 1: komplet za izolacijo DNK Fermentas; 2: modificiran postopek za izolacijo bakterijske DNK; 3: komplet za izolacijo DNK Qiagen; 4: modificiran postopek za izolacijo DNK iz telečjega priželjca; 5: komplet za izolacijo DNK Nucleospin; 6: DNK mandlja 7: NTC - negativna kontrola

Na sliki 8 vidimo, da sta bili izolaciji DNK oreha s kompletom Fermentas in po modificiranem postopku za izolacijo DNK iz telečjega priželjca neuspešni, saj je bil rezultat PCR v realnem času negativen. Rezultati so bili pozitivni pri izolacijah DNK po modificiranem postopku za izolacijo bakterijske DNK, s kompletom Qiagen in kompletom Nucleospin.

Najvišjo koncentracijo DNK smo spektrofotometrično določili v primeru, ko smo za izolacijo DNK uporabili komplet Nucleospin (preglednica 4). Zato je bila pri tem vzorcu tudi najnižja vrednost C_t pri PCR v realnem času za določanje oreha. Zaradi tega smo se odločili, da za vse nadaljnje preiskave uporabimo vzorce DNK, ki so bili izolirani s kompletom Nucleospin.

Mafra in sod. (2008) so v primerjavi štirih različnih metod izolacije DNK iz živil s PCR ugotovili, da je bila metoda za izolacijo DNK s kompletom Nucleospin ena od najučinkovitejših. Prednost tega kompleta je bila tudi hitra izvedba izolacije. Metoda je pokazala dobre rezultate za kvantifikacijo PCR v realnem času, saj je bila učinkovitost reakcije okoli 100 %.

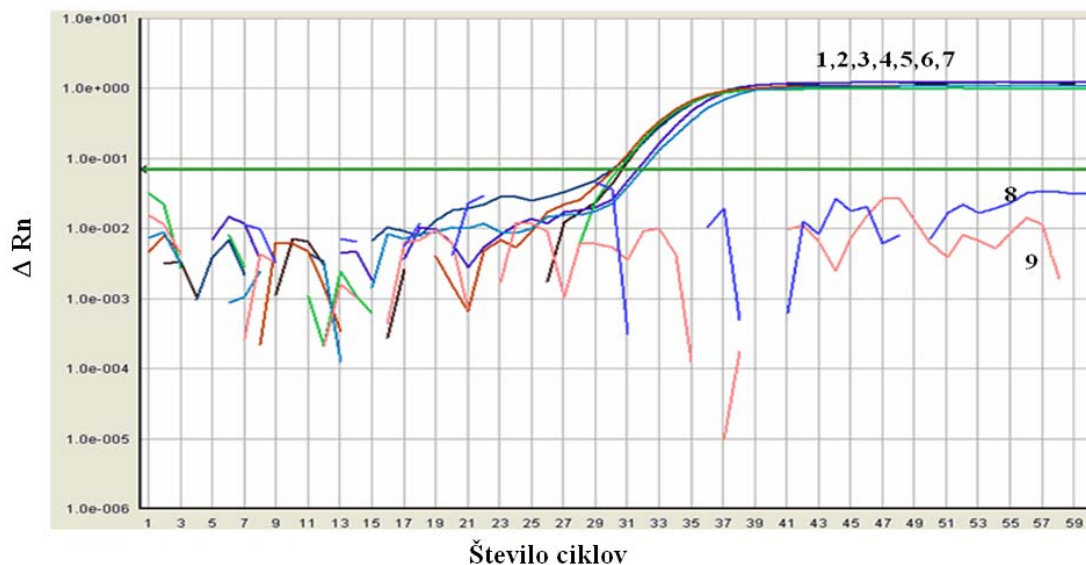
Preglednica 4: Koncentracije DNK oreha, izolirane po različnih postopkih in vrednosti C_t pri PCR v realnem času, dobljene pri 100 x razredčenih vzorcih. DNK mandlja in NTC sta služila kot negativni kontroli.

Vzorec	Metoda	Koncentracija DNK (ng/ μ L)	Vrednost C_t
oreh	izolacija s kompletom Fermentas	< 1	-
	izolacija po modificiranem postopku za izolacijo bakterijske DNK	67	38,21
	izolacija s kompletom Qiagen	27	31,12
	izolacija po modificiranem postopku za izolacijo DNK iz telečjega priželjca	< 1	-
	izolacija s kompletom Nucleospin	426,5	24,77
mandelj	izolacija s kompletom Nucleospin	/	-
NTC	/	/	-

Legenda: /: ni izmerjeno

4.3 SPECIFIČNOST PCR V REALNEM ČASU ZA DOLOČANJE OREHA

Na sliki 9 vidimo, da je bil rezultat encimske reakcije pri sortah oreha / (1), Ronde de Montignac/04 (2), A-117/04 (3), G-139/04 (4), ELIT/04 (5), CISCO/04 (6) in CROSVERT/04 (7) pozitiven, negativen pa pri vzorcih 8 (DNK mandlja) in 9 (NTC), ki služita kot negativni kontroli encimske reakcije, zato je rezultat pravičen. Alergeni gen *jug r2* smo določili s PCR v realnem času pri vseh navedenih sortah oreha.



Slika 9: Določanje različnih sort oreha s PCR v realnem času

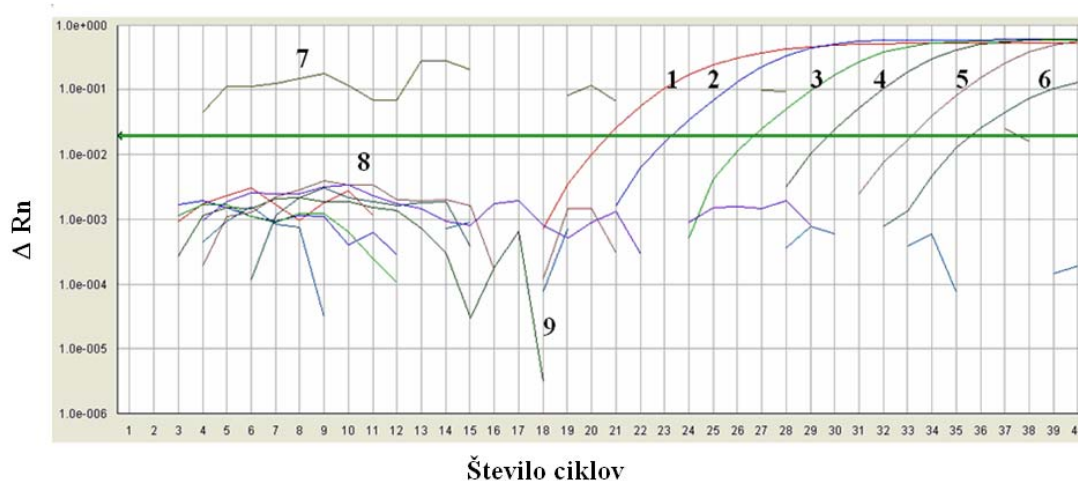
Legenda: ΔRn ; normaliziran fluorescentni signal; 1: sorta /; 2: Ronde de Montignac/04; 3: A-117/04; 4: G-139/04; 5: ELIT /04; 6: CISCO/04; 7: CROSVERT/04; 8: DNK mandlja; 9: NTC – negativna kontrola

Naši rezultati so primerljivi z objavljenimi rezultati o specifičnosti PCR v realnem času za določanje oreha. Brežná in sod. (2006) so z metodo PCR v realnem času s specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki in sondo za alergeni gen *Jug r2* dobili pozitivne rezultate pri 9 sortah oreha (*Juglans regia*) in štirih sorodnih vrstah (*Juglans cinerea*, *J. cordiformis*, *J. mandshurica*, *J. negra*), medtem ko so Wang in sod. (2009) pozitiven rezultat dobili samo pri orehu (*Juglans regia*) in zaznali vrsto ameriškega oreha (*Carya illinoises*) pri visokih vrednostih C_t (> 35).

4.4 DOLOČITEV OČUTLJIVOSTI PCR V REALNEM ČASU S ČISTO DNK OREHA

Spektrofotometrično določena koncentracija izolirane DNK oreha je bila 388 ng/ μ L. Za določitev teoretične občutljivosti PCR v realnem času smo pripravili 10 x-ne razredčitve DNK oreha od 10^{-1} do 10^{-6} . V encimskih reakcijah smo vedno uporabili 5 μ L vzorca.

Vzorci 1 - 6 na sliki 10 so bile 10 x-ne razredčitve DNK oreha v območju od 10^{-1} do 10^{-5} . Rezultat encimske reakcije je bil povsod pozitiven. Pri vzorcu 7, ki je imel koncentracijo DNK 0,000388 ng/ μ L (0,388 pg/ μ L), je rezultat negativen. Vzorec 7 je DNK mandlja, 8 pa NTC, kjer je namesto DNK dodana voda. Oba služita kot negativni kontroli, zato je negativen rezultat pravilen.



Slika 10: Določanje niza 10 kratnih razredčitev koncentracije čiste DNK oreha s PCR v realnem času

Legenda ΔRn : normaliziran fluorescentni signal; 10 kratne razredčitve DNK oreha; **1:** nerazredčena; **2:** 10^{-1} razredčena; **3:** 10^{-2} razredčena; **4:** 10^{-3} razredčena; **5:** 10^{-4} razredčena; **6:** 10^{-5} razredčena; **7:** 10^{-6} razredčena; **8:** nerazredčena DNK mandlja; **9:** NTC

Koncentracija DNK nerazredčenega vzorca je bila 388 ng/ μ L, s PCR v realnem času smo še določili 10^{-5} razredčitev DNK oreha, kar teoretično pomeni 0,00388 ng/ μ L (3,88 pg/ μ L).

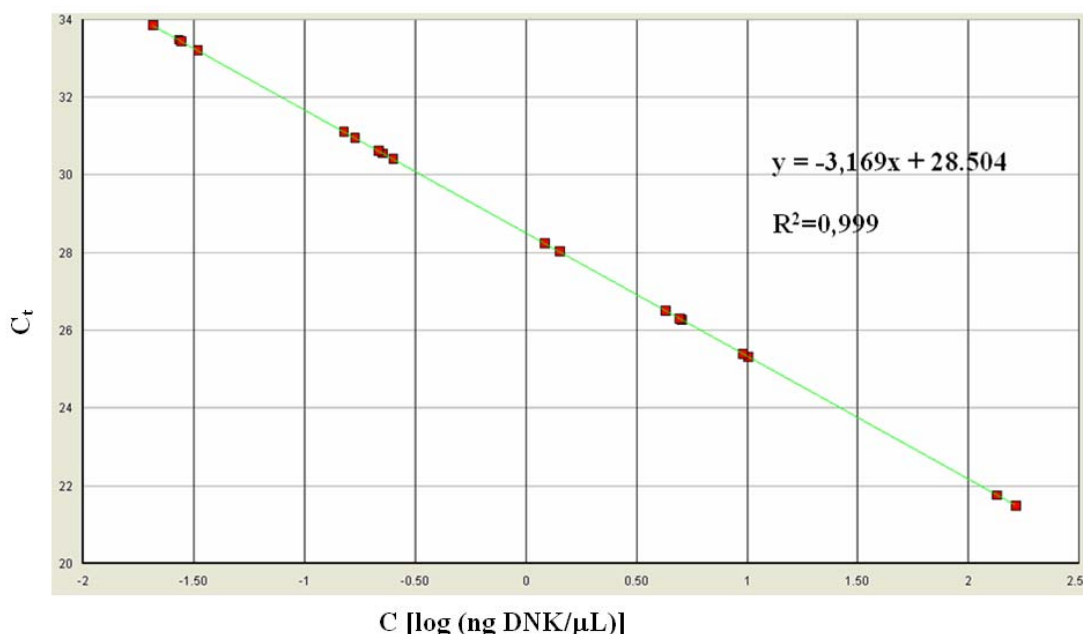
Z našimi eksperimenti smo določili nižjo občutljivost kot Brežná in sod. (2006), ki so z metodo PCR v realnem času za oreh določili najnižjo teoretično mejo določitve 0,24 ng DNK oreha. Wang in sod. (2009) so določili 25 pg DNK oreha.

Preglednica 5: Občutljivost PCR v realnem času za določanje DNK čistega oreha

Vzorec	Koncentracija DNK (ng/ μ L)	Vrednost C_t
nerazredčena DNK oreha	388	20,63
10^{-1} razredčena DNK oreha	38,8	23,25
10^{-2} razredčena DNK oreha	3,88	26,66
10^{-3} razredčena DNK oreha	0,388	29,67
10^{-4} razredčena DNK oreha	0,0388	33,13
10^{-5} razredčena DNK oreha	0,00388	35,57
10^{-6} razredčena DNK oreha	0,000388	36,82
nerazredčena DNK mandlja	/	manj kot 1
9: NTC	/	manj kot 1

Iz rezultatov v preglednici 5 smo izračunali umeritveno krivuljo 1, kjer y pomeni vrednost C_t posamezne razredčitve DNK, x pa desetiški logaritem koncentracije DNK (v ng/ μ L) (slika 11).

$$y = -3,169x + 28,504 \text{ oz. } C_t = -3,169 \log[C(\text{ng}/\mu\text{L})] + 28,504 \quad \dots 4$$



Slika 11: Umeritvena krivulja 1: Vrednosti C_t v odvisnosti od desetiškega logaritma koncentracije DNK čistega oreha [log (ng DNK/ μ L)]

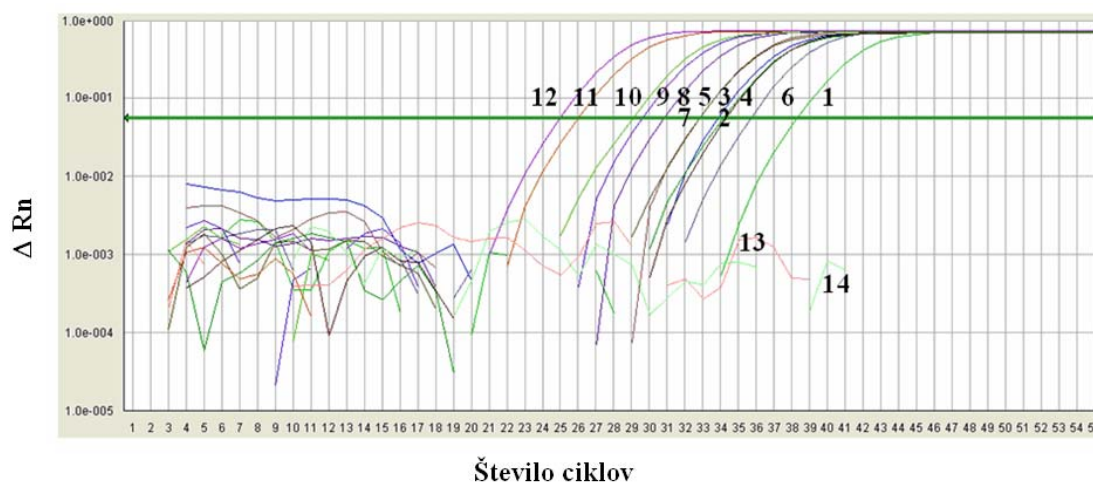
Učinkovitost reakcije (E) smo izračunali po enačbi 1 in je znašala 106,8 %, kar pomeni dobro učinkovitost, saj je le-ta v območju od 90 - 110% (Pfaffl, 2004). Korelacijski faktor R^2 te premice je bil 0,999 za območje kvantifikacije od 3,88 pg do 388 ng.

4.5 DOLOČITEV PRAKTIČNE OBČUTLJIVOSTI PCR V REALNEM ČASU

4.5.1 Vpliv časa pečenja standardnih orehovitih piškotov na določitev oreha s PCR v realnem času

DNK smo izolirali iz standardnih orehovitih piškotov. Za PCR v realnem času smo vedno uporabili 5 μ L vzorca izolirane DNK, tako, da je bila koncentracija 30 ng DNK/ μ L reakcijske mešanice. PCR v realnem času smo izvedli z DNK, izolirano iz standardnih orehovitih piškotov pred pečenjem, po 15 in 30 minutah pečenja.

Slika 12 prikazuje PCR v realnem času za določanje oreha standardnih orehovitih piškotov pred pečenjem.

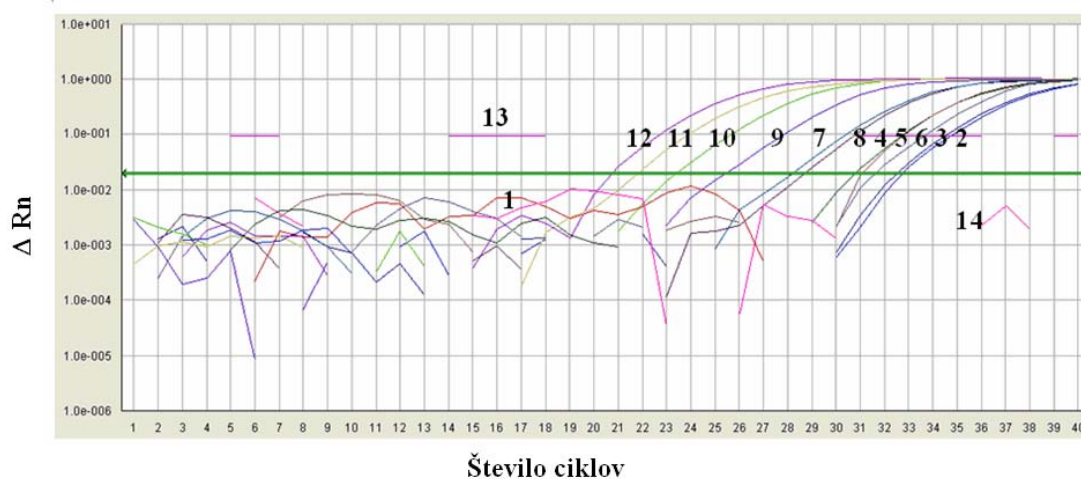


Slika 12: Določanje oreha v standardnih orehovitih piškotih s PCR v realnem času pred pečenjem

Legenda: ΔRn : normaliziran fluorescentni signal; 1: 0 % oreha; 2: 0,01 % oreha; 3: 0,05 % oreha; 4: 0,1 % oreha; 5: 0,2 % oreha; 6: 0,5 % oreha; 7: 1 % oreha; 8: 2 % oreha; 9: 5 % oreha; 10: 10 % oreha; 11: 100 % oreha; 12: čista DNK oreha; 13: 100 x razredčena DNK mandlja; 14: NTC

Pozitiven rezultat vzorca 1 je nepravilen in pomeni, da je tekom priprave standardnih orehovitih piškotov ali izolacije DNK prišlo do kontaminacije vzorca z DNK oreha. Vrednosti C_t vzorcev 2 - 11 bi morale z naraščanjem odstotka dodanega oreha padati po vrsti. Pri nižjih odstotkih dodanega oreha (vzorci 2 - 6) vrednosti C_t verjetno ne rastejo, ker je bilo nemogoče zagotoviti dovolj dobro homogenizacijo orehovega polnila z nizko koncentracijo orehov za standardni piškot. Vrednosti C_t vzorcev 7 - 11 padajo, kar je pravilen rezultat, saj odstotek orehov narašča. Najnižja vrednost C_t pri vzorcu 12 je pravilna, saj je vzorec 12 služil kot pozitivna kontrola in mu je bila dodana čista, nerazredčena DNK oreha. Razumljivo je tudi, da je C_t vrednost vzorca 12 nižja od vrednosti C_t vzorca 11, saj je ta poleg 100 % deleža oreha v polnilu vseboval tudi DNK pšenice in drugih primesi listnatega testa.

Slika 13 prikazuje PCR v realnem času za določanje standardnih orehovitih piškotov po 15 min pečenja.

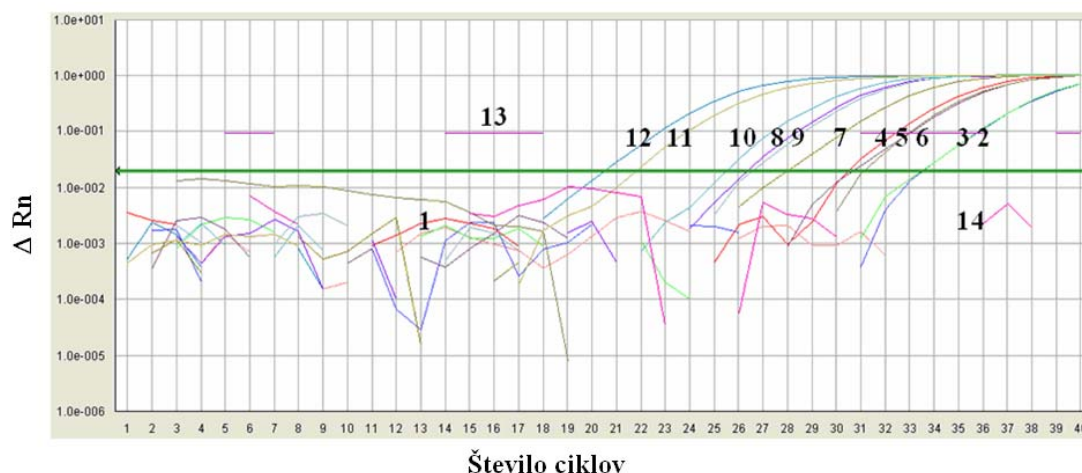


Slika 13: Določanje oreha v standardnih orehovitih piškotih s PCR v realnem času po 15 minutnem pečenju

Legenda: ΔRn : normaliziran fluorescentni signal: **1:** 0 % oreha; **2:** 0,01 % oreha; **3:** 0,05 % oreha; **4:** 0,1 % oreha; **5:** 0,2 % oreha; **6:** 0,5 % oreha; **7:** 1% oreha; **8:** 2 % oreha; **9:** 5 % oreha; **10:** 10 % oreha; **11:** 100 % oreha; **12:** čista DNK oreha; **13:** DNK mandlja, 100 x razredčena; **14:** NTC

Negativen rezultat vzorca 1 je pravilen, saj ta standardni piškot ni vseboval oreha. Vrednosti C_t vzorcev 1 - 11 bi morale z naraščanjem odstotka dodanega oreha padati po vrsti. Pri nižjih odstotkih dodanega oreha (vzorci 2 - 8) vrednosti C_t verjetno ne rastejo po vrsti, ker je bilo nemogoče zagotoviti dovolj dobro homogenizacijo orehovega polnila z nizko koncentracijo orehov za standardne piškote. Vrednosti C_t vzorcev 9 - 11 padajo, kar je pravilen rezultat, saj odstotek orehov narašča. Najnižja vrednost C_t pri vzorcu 12 je pravilna, saj je vzorec 12 služil kot pozitivna kontrola in mu je bila dodana čista, nerazredčena DNK oreha. Razumljivo je tudi, da je vrednost C_t vzorca 12 nižja od vrednosti C_t vzorca 11, saj je ta poleg 100 % deleža oreha v polnilu vseboval tudi DNK pšenice in drugih primesi listnatega testa.

Slika 14 prikazuje PCR v realnem času za določanje oreha standardnih orehovitih piškotov po 30 min pečenja.



Slika 14: Določanje oreha v standardnih orehovitih piškotih s PCR v realnem času po 30 minutnem pečenju

Legenda: ΔRn : normaliziran fluorescentni signal; standardni orehovi piškoti; **1:** 0 % oreha; **2:** 0,01 % oreha; **3:** 0,05 % oreha; **4:** 0,1 % oreha; **5:** 0,2 % oreha; **6:** 0,5 % oreha; **7:** 1 % oreha; **8:** 2 % oreha; **9:** 5 % oreha; **10:** 10 % oreha; **11:** 100 % oreha; **12:** čista DNK oreha; **13:** DNK mandlja, 100 x razredčena, **14:** NTC – negativna kontola

Negativen rezultat vzorca 1 je pravilen, saj je bila dodana DNK izolirana iz standardnega piškota brez dodanega oreha. Vrednosti C_t vzorcev 2 - 11 bi morale z naraščanjem odstotka dodanega oreha padati po vrsti. Pri nižjih odstotkih dodanega oreha (vzorci 2 - 9) vrednosti C_t verjetno ne rastejo po vrsti, ker je bilo nemogoče zagotoviti dovolj dobro homogenizacijo orehovega polnila z nizko koncentracijo orehov za standardne piškote. Vrednost C_t vzorca 10 je višja od vrednosti vzorca 11, kar je pravilen rezultat, saj je odstotek oreha pri vzorcu 11 večji od odstotka pri vzorcu 10. Najnižja vrednost C_t pri vzorcu 12 je pravilna, saj je vzorec 12 služil kot pozitivna kontrola in mu je bila dodana čista, nerazredčena DNK oreha. Razumljivo je tudi, da je C_t vrednost vzorca 12 nižja od vrednosti C_t vzorca 11, saj je ta poleg 100 % deleža oreha v polnilu vseboval tudi DNK pšenice in drugih primesi listnatega testa.

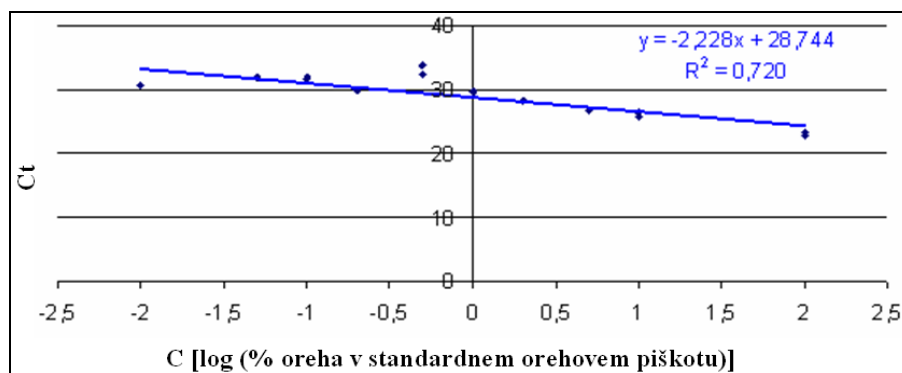
Vrednosti C_t vzorcev z istim deležem oreha po 15 in 30 minutah pečenja (preglednica 6) so primerljive, medtem ko se vrednosti C_t za vzorce standardnih piškotov pred pečenjem v manjši meri razlikujejo. Glede na to, da smo v literaturi zasledili, da za večino alergena lupinastega sadja vpliv toplotne obdelave na alergenost ni dokazan, da so alergeni iz lupinastega sadja odporni proti toplotni obdelavi (Koppelman in sod., 2006) in glede na relativno primerljivost vrednosti C_t lahko zaključimo, da čas pečenja bistveno ne vpliva na določitev oreha s PCR v realnem času. Pozitiven rezultat in visoka vrednost C_t , ki nakazuje na majhno količino DNK oreha v standardnem orehovem piškotu brez oreha v polnilu, kažeta na verjetnost kontaminacije polnila med pripravo standardnega orehovega piškota ali med izolacijo DNK.

Preglednica 6: Vrednosti C_t za standardne orehove piškote po različnih časih pečenja

Odstotek oreha (%)	C_t		
	0 min pečenja	15 min pečenja	30 min pečenja
0	32,59 ± 0,37	0	0
0,01	30,54 ± 0,01	32,61 ± 0,06	33,34 ± 0,19
0,05	31,84 ± 0,16	31,99 ± 0,62	33,64 ± 0,28
0,1	31,76 ± 0,21	30,47 ± 0,35	30,48 ± 0,11
0,2	29,81 ± 0,11	30,42 ± 0,52	30,78 ± 0,24
0,5	32,97 ± 0,95	31,31 ± 0,32	30,76 ± 0,50
1,0	29,67 ± 0,09	28,31 ± 0,44	28,13 ± 0,15
2,0	28,16 ± 0,04	28,24 ± 0,09	26,29 ± 0,02
5,0	26,69 ± 0,10	24,96 ± 0,57	26,40 ± 0,14
10,0	25,96 ± 0,34	23,46 ± 0,14	25,36 ± 0,05
100,0	22,96 ± 0,32	21,63 ± 0,19	21,63 ± 0,19

Iz dobljenih rezultatov smo izračunali učinkovitost posamezne encimske reakcije po formuli 1.

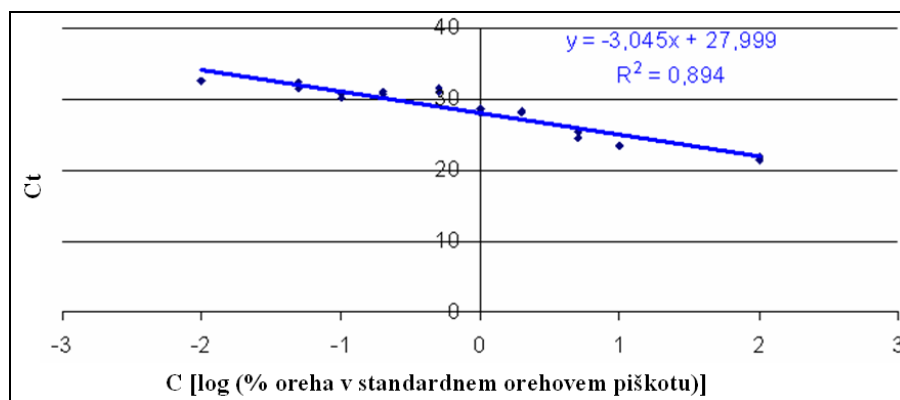
Slika 15 prikazuje odvisnost vrednosti C_t od desetiškega logaritma odstotka dodanega oreha v standardnem piškotu pred pečenjem. Naklon premice (k) je bil -2,23, korelacijski koeficient (R^2) 0,72 in učinkovitost reakcije (E) 181 %. Vsi dobljeni parametri encimske reakcije se razlikujejo od parametrov, ki jih navaja Pfaffl (2004) (naklon premice od -3,1 do -3,6, R^2 blizu 1 in E med 90 in 110 %). Zato lahko sklepamo, da je bila učinkovitost tega PCR v realnem času slaba.



Slika 15: Odvisnost vrednosti C_t od desetiškega logaritma odstotka oreha v standardnem piškotu pred pečenjem

Slika 16 prikazuje odvisnost vrednosti C_t od desetiškega logaritma odstotka dodanega oreha na standardni piškot po 15 minutah pečenja. Naklon premice (k) je bil -3,045, korelacijski koeficient (R^2) 0,894 in učinkovitost reakcije (E) 113 %.

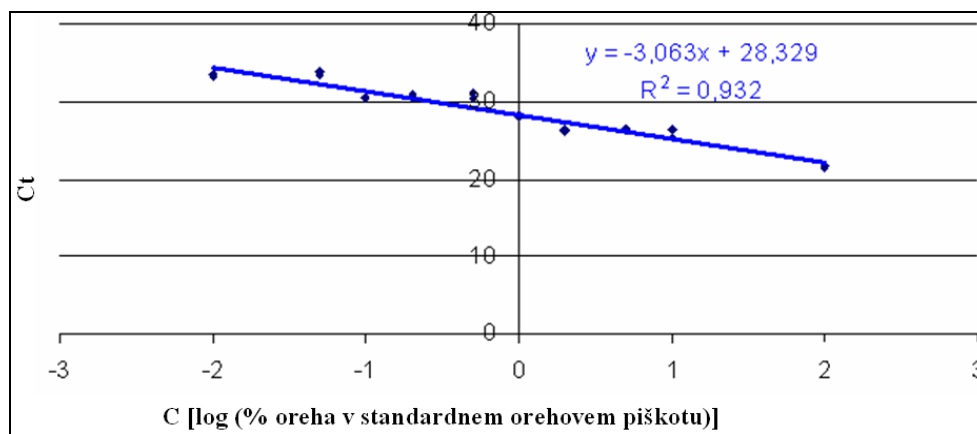
Vsi dobljeni parametri encimske reakcije se deloma razlikujejo od idealnih vrednosti, ki jih navaja Pfaffl (2004) (naklon premice od -3,1 do -3,6, R^2 blizu 1 in E med 90 in 110 %). Zato lahko povzamemo, da je bila učinkovitost tega PCR v realnem času blizu dobre učinkovitosti.



Slika 16: Odvisnost vrednosti C_t od desetiškega logaritma odstotka oreha v standardnem piškotu po 15 min pečenja

Slika 17 prikazuje odvisnost vrednosti C_t od desetiškega logaritma odstotka dodanega oreha na standardni piškot po 30 min pečenja. Naklon premice je bil -3,06, korelacijski koeficient (R^2) 0,93 in učinkovitost reakcije (E) 112 %.

Tudi za PCR v realnem času, izveden z DNK, izoliranih iz orehovitih piškotov po 30 minutnem pečenju lahko povzamemo, da je bila učinkovitost te reakcije blizu dobre učinkovitosti (Pfaffl, 2004).



Slika 17: Odvisnost vrednosti C_t od desetiškega logaritma odstotka oreha v standardnem piškotu po 30 min pečenja

Primerjava vrednosti C_t , dobljenih pri PCR v realnem času z DNK, izolirano iz standardnih piškotov z različnimi odstotki oreha po različnih časih pečenja standardnih orehovitih piškotov, nakazuje razlike, ki so najverjetneje posledica ne-optimalne homogenizacije posameznih vzorcev standardnih orehovitih piškotov, še posebej pri piškotih, kjer je bila koncentracija oreha izredno nizka (pod 1 %). Vse tri prikazane encimske reakcije (slika 14 – 16) imajo slabšo učinkovitost od idealnega PCR v realnem času (Pfaffl, 2004). Odstopanja od učinkovite reakcije so bila najmanjša pri standardnih orehovitih piškotih po 30 minutnem pečenju. Variabilnost rezultatov PCR v realnem času za določanje oreha med

različnimi časi pečenja lahko pripišemo tudi neustrezni metodi spektrofotometričnega določanja koncentracije DNK standardnih orehovitih piškotov. Merjenje koncentracije bi bilo verjetno primernejše z reagentom PicoGreen (Ahn in sod., 1996). Učinkovitost PCR, višja od 110 % lahko pomeni veliko odstopanje nekaterih točk od premice (nižje vrednosti korelacijskega koeficienta na primer slika 14). Temu bi se lahko izognili tako, da bi za analizo s PCR v realnem času uporabili več paralelk in da točk, ki so preveč odstopale od premice, ne bi upoštevali. Do previsoke učinkovitosti reakcije lahko pride tudi, če pri nekaterih vzorcih koncentracija DNK ni dovolj visoka za pomnoževanje ali obratno, da je koncentracija previsoka in tako na reakcijo deluje inhibitorno. Učinkovitost bi verjetno bila primernejša, če paralelk, ki kažejo na inhibicijo in tistih z zelo nizko koncentracijo ne bi upoštevali. S tem bi dobili pravilnejši naklon premice in ustrezno učinkovitost reakcije med 90 in 110 % (Pfaffl, 2004; Applied Biosystems, 2008).

Ahn in sod. (1996) navajajo določanje koncentracije DNK živil za PCR v realnem času z barvilom PicoGreen, kot uporabno metodo za kvantifikacijo širokega spektra vzorcev DNK. Brežná in sod. (2006) in Wang in sod. (2009) so kvantifikacijo DNK oreha za PCR v realnem času izvedli z UV-spektrometrijo.

Wang in sod. (2009) so vzorce živil za praktično mejo določljivosti pripravili z mešanjem zdrobljenih orehov in pšenice z deležem oreha 10, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01 in 0,001% (w/w). Mešanica z 10 % in 5 % orehov je bila narejena z mešanjem 1 in 0,5 g orehov z 9 in 9,5 g pšenice. Mešanice z 1 in 0,5 % orehov so naredili z mešanjem 1 g mešanice z 10 in 5 % orehov z 9 g pšenice. Podobno so pripravili še mešanice z 0,1, 0,05 in 0,001 % orehov. Taka priprava mešanic za standardne orehove piškote verjetno omogoča boljše homogenizacijo in posledično večjo učinkovitost reakcije PCR v realnem času.

Brežná in sod. (2006) so za standardne orehove piškote najprej pripravili testo brez orehov in mandljev iz pšenične moke, masla, sladkorja v prahu, kakava, pecilnega praška in jajc. Posebej so pripravili mešanice orehov in mandljev brez in z 0,1, 0,5, 2 in 100 % deležem oreha. 20 g tako pripravljenih mešanic so zmešali s 180 g testa in jih 30 min pekli pri 180 °C. Tak način priprave lahko vodi do nepravilnih rezultatov, ker je testo bolj kompleksno in lahko vsebuje inhibitorje reakcije PCR v realnem času. Poleg tega so imeli Brežná in sod. (2006) manj piškotov z različnim deležem oreha (0,1 %, 0,5 %, 2 %, 5 %, 100 %) (w/w), kar lahko vodi do manj natančne umeritvene krivulje. Praktična meja določljivosti (0,1 %) pri Brežni in sod. (2006) je bila zato postavljena relativno visoko v primerjavi z občutljivostjo naše metode (0,01%) in občutljivostjo metode Wang in sod. (2009) (0,001 %).

4.5.2 Določitev praktične občutljivosti PCR v realnem času

Glede na primerljivost vrednosti C_t pri različnih časih pečenja in najboljše učinkovitosti reakcije smo nadaljevali z rezultati 30 minutnega pečenja in jih uporabili za določitev praktične občutljivosti oziroma za umeritveno krivuljo 2, 3 in 4.

Iz rezultatov (vrednosti C_t) (preglednica 7) smo razbrali, da je bila metoda učinkovita že pri nizkih koncentracijah (0,01 % oreha), zato bi lahko bila primerna za iskanje sledov oreha v živilu.

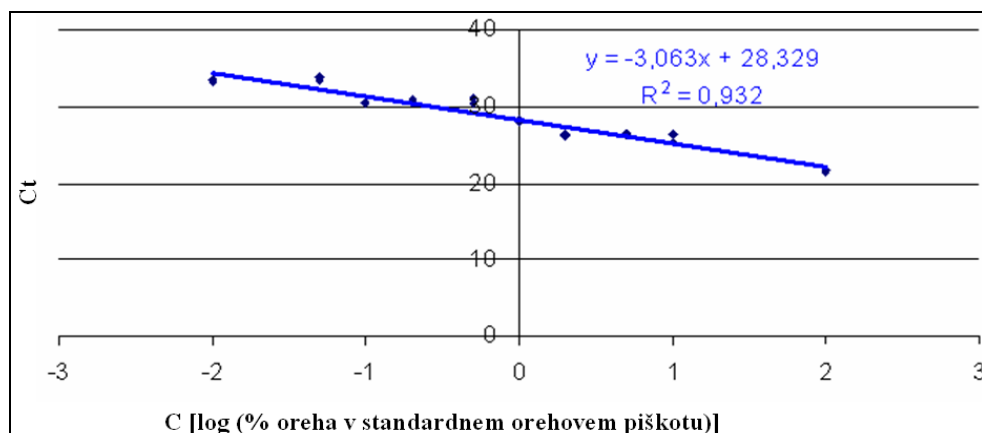
Preglednica 7: Vrednosti C_t in odstotki oreha za standardne orehove piškote po 30 minutah pečenja

Odstotek oreha v standardnem piškotu (%)	Vrednost C_t
0,01	33,2
	33,47
0,05	33,84
	33,44
0,1	30,55
	30,4
0,2	30,95
	30,61
0,5	31,11
	30,4
1,0	28,23
	28,02
2,0	26,3
	26,27
5,0	26,5
	26,3
10,0	25,32
	25,39
100,0	21,49
	21,76

Naši rezultati so primerljivi z rezultati drugih raziskovalcev, ki so določali oreh s PCR v realnem času.

Brežná in sod. (2006) so z metodo PCR v realnem času določili praktično mejo določljivosti oreha v živilih 0,1 % (Brežná in sod., 2006).

Wang in sod. (2009) do določili nižjo praktično mejo določljivosti oreha s PCR v realnem času, in sicer 0,001 % (Wang in sod., 2009).



Slika 18: Umeritvena krivulja 2: Odvisnost vrednosti C_t od desetiškega logaritma odstotka oreha v standardnem piškotu po 30 min pečenju

Slika 18 kaže umeritveno krivuljo 2, kjer y pomeni vrednost C_t posameznega standardnega orehovega piškota, x pa desetiški logaritem koncentracije DNK (%). R^2 je bil 0,93, učinkovitost reakcije (E) je bila 112 %.

$$y = -3,06x + 28,32 \text{ oz. } C_t = -3,06 \log C + 28,32 \quad \dots 5$$

4.5.2.1 Dodatne umeritvene krivulje

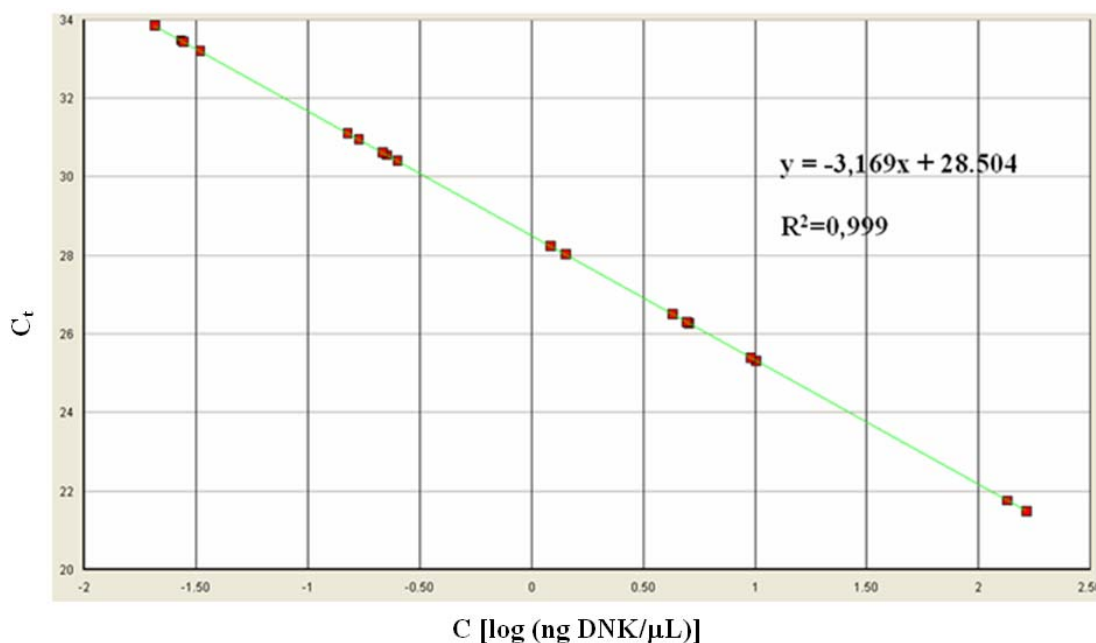
V enačbo premice umeritvene krivulje 1 smo vstavili vrednosti C_t standardnih orehovitih piškotov in izračunali koncentracije oreha v piškotih (preglednica 9) za umeritveno krivuljo 3 (slika 19) z enačbo premice:

$$y = -3,17x + 28,50, \text{ oz. } C_t = -3,17 \log C + 28,50 \quad \dots 6$$

kjer y pomeni vrednost C_t standardnih piškotov, x pa desetiški logaritem koncentracije oreha v standardnih piškotih (ng DNK oreha/ μ L DNK standardnega piškota). R^2 je bil 0,99, učinkovitost reakcije (E) je bila 107 %.

Preglednica 8: Koncentracija oreha v mg oreha / g vzorca in v ng DNK oreha / μL DNK vzorca v standardnih orehovitih piškotih po 30 min pečenju

% oreha v standardnem piškotu	Vrednost C_t	Koncentracija DNK oreha v vzorcu (ng DNK oreha/ μL DNK vzorca)	Koncentracija oreha v vzorcu (mg oreha/g vzorca)
0,01	33,2	0,033	0,0333
	33,47	0,027	0,0333
0,05	33,84	0,021	0,1667
	33,44	0,028	0,1667
0,1	30,55	0,226	0,3333
	30,4	0,252	0,3333
0,2	30,95	0,169	0,6667
	30,61	0,216	0,6667
0,5	31,11	0,151	1,6667
	30,4	0,252	1,6667
1,0	28,23	1,220	3,3333
	28,02	1,421	3,3333
2,0	26,3	4,960	6,6667
	26,27	5,069	6,6667
5,0	26,5	4,289	16,6667
	26,3	4,960	16,6667
10,0	25,32	10,110	33,3333
	25,39	9,608	33,3333
100,0	21,49	163,424	333,3333
	21,76	134,312	333,3333

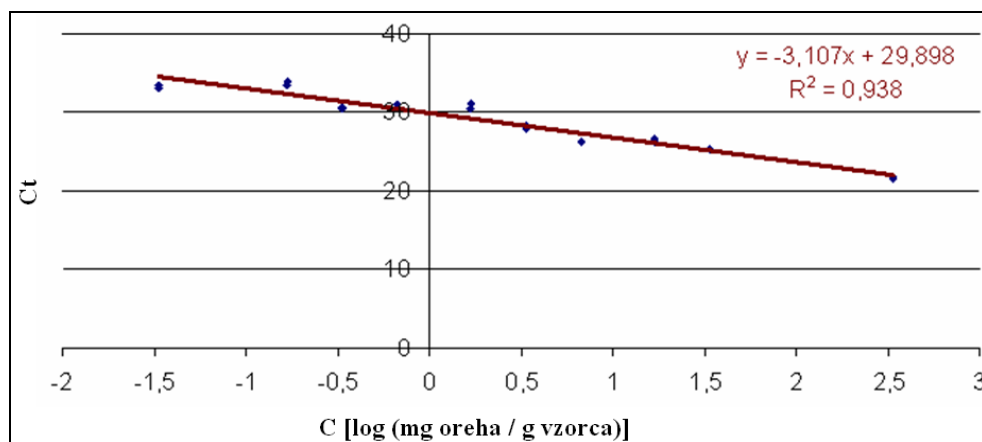


Slika 19: Umeritvena krivulja 3: odvisnost vrednosti C_t standardnih piškotov od desetiškega logaritma koncentracije DNK oreha v standardnem piškotu [$\log(\text{ng DNK oreha}/\mu\text{L DNK standardnega piškota})$], čas pečenja: 30 min

Zaradi ustrežnejše enote za določitev oreha v vzorcu smo iz odstotka dodanega oreha v standardnem piškotu izračunali maso oreha v piškotu (mg oreha/g standardnega piškota) in narisali umeritveno krivuljo 4 (slika 20) z enačbo premice

$$y = -3,13x + 29,95, \text{ oz. } C_t = -3,13 \log C + 29,95 \quad \dots 7$$

kjer y pomeni vrednost C_t posameznega standardnega piškota, x pa desetiški logaritem koncentracije oreha v standardnih piškotih (mg oreha/g standardnega piškota) (Slika 19). R^2 je bil 0,93, učinkovitost reakcije (E) je bila 109 %.



Slika 20: Umeritvena krivulja 4: odvisnost vrednosti C_t od koncentracije oreha v standardnem piškotu (mg oreha/g standardnega piškota) po 30 min pečenju

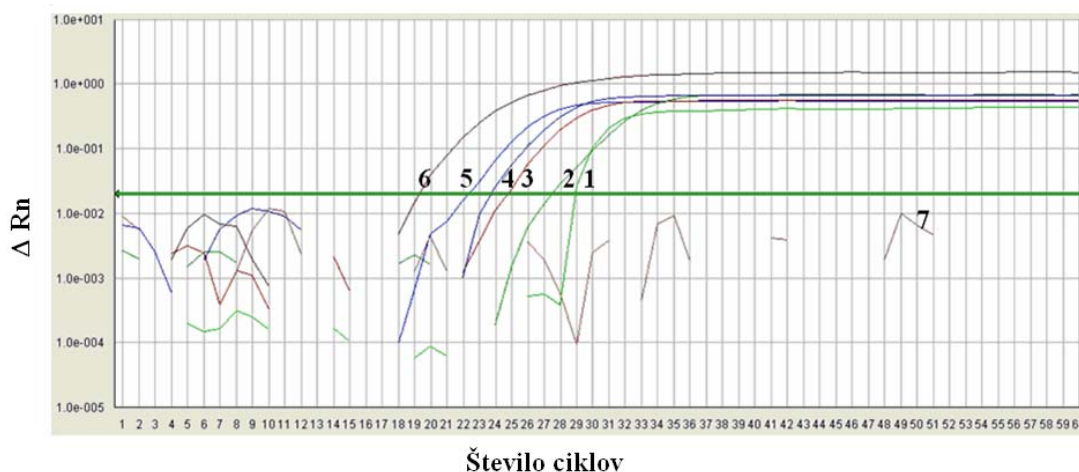
Slika 19 prikazuje odvisnost vrednosti C_t od koncentracije oreha v standardnem piškotu (mg oreha/g standardnega piškota). Naklon premice je bil (k) -3,11, R^2 0,94 in učinkovitost reakcije (E) 109 %. Naklon je bil v rangu od -3,1 do -3,6, R^2 je bil blizu vrednosti 1 in učinkovitost med 90 in 100 %. Reakcija je bila učinkovita.

Umeritvena krivulja 4 je torej potencialno uporabna za približno določitev orehov v živilih s PCR v realnem času.

4.6 DOLOČITEV OREHOV V ŽIVILIH S PCR V REALNEM ČASU

4.6.1 Kvalitativna določitev

Iz različnih vzorcev orehovega peciva, čistega oreha in čistega mandlja smo izolirali DNK s kompletom za izolacijo DNK Nucleospin. Vzorce smo analizirali s PCR v realnem času (preglednica 10) (slika 21).



Slika 21: Določanje orehov v vzorcih orehovega peciva s PCR v realnem času

Legenda: ΔRn : normaliziran fluorescentni signal; 1: Orehovi rogljiči; 2: Orehova potica; 3: Orehovo pecivo; 4: Orehov jurček; 5: Orehovo čokoladno pecivo; 6: Oreh, čista DNK, pozitivna kontrola; 7: NTC

Vzorci 1 - 5 so vzorci orehovega peciva in imajo višjo vrednost C_t , kot vzorec 6 – čista DNK oreha. Negativen rezultat vzorca 7 je pravilen, ker smo mu namesto DNK dodali vodo in služi kot negativna kontrola.

Preglednica 9: Analizirani vzorci živil s PCR v realnem času s specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki (JuglF, JuglR) in sondo (JuglP) za oreh (*Juglens regia*)

Vzorec živila	Rezultat s PCR v realnem času
Orehovi rogljiči	+
Orehovo čajno pecivo	+
Orehovo pecivo	+
Orehova potica	+
Orehov jurček	+
Čisti oreh	+
Čisti mandelj	-

V preglednici 9 so prikazani rezultati analiziranih vzorcev s PCR v realnem času. Pri vseh vzorcih živil, kjer je bil oreh deklariran, in pri čistem orehu je bil rezultat pozitiven. Negativen rezultat je bil samo pri čistem mandlju.

Brežná in sod. (2006) so analizo PCR v realnem času s specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki in sondo za oreh (*Juglans regia*) izvedli na 37 različnih vzorcev živil. Rezultat je bil pozitiven pri 9 sortah oreha (*Juglans regia*) in pri 4 drugih vzorcih lupinastega sadja, sorodnih orehu. Negativni rezultat je bil pri 24 drugih sortah živil.

Wang in sod. (2009) so s PCR v realnem času za določanje oreha analizirali 14 vzorcev živil. Rezultat je bil pozitiven pri orehu (*Juglans regia*) in ameriškem orehu, slednji pri vrednostih C_t več kot 35. Pri vseh ostalih vzorcih je bil rezultat negativen.

1.6.1 Relativna kvantifikacija

Iz vzorcev orehovega peciva smo izolirali DNK, spektrofotometrično izmerili njihove koncentracije, pripravili ustrezne razredčitve DNK in analizirali s PCR v realnem času. Iz dobljenih vrednosti C_t smo s pomočjo umeritvene krivulje 2 (slika 17) izračunali koncentracije oreha v vzorcih. Izračunane koncentracije smo primerjali z deklariranimi.

Izračunane koncentracije so v primerjavi z deklariranimi nesmiselne. Deklarirana in izmerjena koncentracija sta relativno primerljivi samo pri vzorcu Orehov jurček.

Preglednica 10: C_t vrednosti in koncentracija oreha v orehovem pecivu (deklarirana in določena na osnovi PCR v realnem času)

Izdelki	C_t izdelkov	koncentracija oreha (%)	
		Izmerjena	Deklarirana
Orehovi rogljiči	28,76	0,72	12,00
Orehovo čajno pecivo	22,30	93,00	/
Orehovo pecivo	24,71	15,19	20,60
Orehova potica	27,43	1,97	46,00
Orehov jurček	23,67	33,19	30,00

Nepravilnost naših kvantitativnih rezultatov lahko pripišemo številnim primesem v vzorcih, kot so polisaharidi, olja in maščobe (Holzhauser in sod., 2006; Mafra in sod., 2008, Pinto in sod., 2007), ki bi lahko motili spektrofotometrično merjenje koncentracije DNK in samo analizo PCR v realnem času. Do takšnih rezultatov bi lahko vodila tudi neidealna učinkovitosti izbrane reakcije (Pffafl, 2004).

Izmerili smo koncentracijo celotne izolirane DNK vzorcev orehovega peciva. Ugotovili smo, da koncentracije niso bile realne (preglednica 11). Predvidevamo, da spektrofotometrične meritve koncentracije DNK niso bile uspešne zaradi premajhne čistosti DNK vzorcev, kar je posledica številnih primesi, ki lahko vplivajo na izolacijo DNK. Zato smo privzeli, da so koncentracije DNK vzorcev 10 x višje in pripravili razredčitve za PCR v realnem času tako, da smo imeli za vsak vzorec 150 ng DNK/PCR. S tako pripravljenimi DNK smo izvedli PCR v realnem času za določanje oreha (slika 10).

Preglednica 11: Izmerjene in predvidene koncentracije DNK, izoliranih iz vzorcev orehovega peciva

Vzorec	Izmerjena koncentracija izoliranih DNK vzorcev orehovega peciva (ng DNK/ μ L)	Predvidena koncentracija izoliranih DNK vzorcev orehovega peciva (ng DNK/ μ L)
Orehovi rogljiči	57,5	575
Orehovo čokoladno pecivo	45	450
Orehovo pecivo	68,5	685
Orehova potica	65,5	655
Orehov jurček	54,5	545

Iz umeritvene krivulje 4 smo izračunali koncentracijo oreha v vzorcih orehovega peciva v mg oreha / g vzorca (preglednica 12).

Dobljene vrednosti C_t smo primerjali z umeritveno krivuljo 4 in ocenili približno vsebnost oreha v posameznem vzorcu (Preglednica 12).

Preglednica 12: Koncentracije oreha v vzorcih orehovega peciva izračunane glede na deklariran odstotek in določene s PCR v realnem času

Vzorec	Vrednost C_t	Koncentracija oreha	
		Izračunana glede na deklariran odstotek (mg oreha/g vzorca)	Določena s PCR v realnem času (mg oreha/g vzorca)
Orehovi rogljiči	28,76	120	2,3
Orehovo čokoladno pecivo	22,30	% ni deklariran	278,9
Orehovo pecivo	24,71	206	46,75
Orehova potica	27,43	460	6,2
Orehov jurček	23,67	300	101

Glede na deklarirano vsebnost oreha v posameznem izdelku, rezultati dobljeni s PCR v realnem času niso pravilni. Najnižjo vrednost C_t in najvišjo izmerjeno koncentracijo DNK oreha bi moral, glede na deklaracijo, imeti vzorec 2 (Orehova potica - 46 % orehov), slediti bi mu moral vzorec 4 (Orehov jurček – 30 %), nato vzorec 3 (Orehovo pecivo – 20,6 %) in nazadnje vzorec 1 (Orehovi rogljiči – 12 %) ali vzorec 5 (Orehovo čokoladno pecivo), za katerega odstotek oreha ni bil deklariran.

Iz dobljenih rezultatov je razvidno, da s PCR v realnem času določene koncentracije oreha v vzorcih niso pravilne. To smo pripisali primesem v vzorcih, ki lahko motijo izolacijo DNK in posledično PCR v realnem času ali pa vplivajo na bistrost raztopine izolirane DNK, zaradi česar je bilo merjenje koncentracije DNK s spektrofotometrom nepravilno, kar pa je ključnega pomena za relativno kvantifikacijo. Uporabiti bi morali ustrežnejši način merjenja DNK, npr. z reagentom PicoGreen, ki je bolj primeren za meritve izolirane DNK iz kompleksnih vzorcev živil (Ahn in sod., 1996), kot pa spektrofotometrično določanje.

Pravilnejše rezultate bi dobili tudi, če bi za izdelavo umeritvenih krivulj uporabili referenčne standarde za določanje oreha s PCR v realnem času, ki pa nam niso bili na voljo (Holzhauser in sod., 2006).

5 SKLEPI

S PCR v realnem času smo določali oreh (*Juglans regia*) kot alergen v živilih. Glede na rezultate eksperimentalnega dela lahko povzamemo, da:

- so optimalne razmere pomnoževanja specifičnega dela proteina *Jug r2* s PCR v realnem času pri koncentraciji oligonukleotidnih začetnikov JuglF in JuglR 900 nmol/μL in koncentraciji sonde 50 nmol/μL;
- so oligonukleotidna začetnika JuglF in JuglR ter sonda JuglP specifični za določanje oreha;
- je občutljivost PCR v realnem času za določanje čistega oreha 3,88 pg;
- je izmed preizkušenih postopkov izolacije DNK iz oreha najbolj učinkovit postopek izolacije s kompletom Nucleospin;
- s PCR v realnem času lahko v standardnih orehovitih piškotih določimo do 0,01 % oreha;
- je čas toplotne obdelave standardnih orehovitih piškotov vplival na učinkovitost PCR v realnem času in
- da PCR v realnem času omogoča kvalitativno določitev oreha v živilih, medtem ko kvantifikacija ni mogoča

6 POVZETEK

Namen diplomske naloge je bil določiti oreh (*Juglans regia*) kot alergen v živilu s PCR v realnem času.

Zaradi vsebnosti alergenih genov lahko zaužitje oreha predstavlja veliko nevarnost za marsikaterega potrošnika (Brežná in sod, 2006). Oreh je v prilogi 4 Pravilnika o splošnem označevanju predpakiranih živil (2004) označen kot sestavina, ki lahko povzroča alergijo. Alergeni proteini v orehu so *Jug r1*, *Jug r2*, *Jug r3*, *Jug r4* in *Jug r5* (Allergome, 2010; Jędrychowsky in sod., 2010). Alergeni gen *Jug r2* je najpomembnejši alergen v orehu (Breitender, 2006; Brežná in sod., 2006).

Za določanje oreha kot alergena smo zato izbrali oligonukleotidne začetnike in sondo, ki so specifični za gen *Jug r2*. S pripravo mešanic za PCR v realnem času s koncentracijami sonde *JugIP* 50 nmol/L, 100 nmol/L, 150 nmol/L in 200 nmol/L in koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov *JugIF* ter *JugIR* 900 nmol/L smo določili optimalne razmere pomnoževanja specifičnega dela proteina *Jug r2*. Kot optimalno koncentracijo sonde smo izbrali koncentracijo 50 nmol/L.

DNK oreha smo najprej izolirali s petimi različnimi postopki izolacije DNK (kompleti: Nucleospin, Fermentas in Qiagen; in modificirana postopka: modificirani postopek za izolacijo DNK iz telečjega priželjca in modificirani postopek za izolacijo bakterijske DNK). Koncentracije DNK smo nato izmerili spektrofotometrično in glede na najvišjo koncentracijo izolirane DNK in najnižje vrednosti C_t dobljene s PCR v realnem času, izbrali komplet Nucleospin kot najustreznejši postopek. Za vse nadaljnje vzorce živil smo za izolacijo DNK uporabili komplet Nucleospin.

Izolirali smo DNK 7 različnih sort oreha in 1 sorte mandlja. Encimska reakcija je bila pozitivna za vse sorte oreha in negativna za mandelj. Ugotovili smo, da je PCR v realnem času z oligonukleotidnima začetnikoma *JugIF* in *JugIR* ter sondo *JugIP* specifičen za oreh.

Z razredčevanjem čiste DNK smo določili občutljivost PCR v realnem času za določanje čistega oreha. Občutljivost encimske reakcije za določanje čistega oreha je bila 3,88 pg.

Da bi same analize lahko opravljali na živilih, smo pripravili standardne piškote z različnim deležem oreha (0, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 in 100 % oreha (w/w)). Prvo paralelko smo analizirali nepečeno, drugi dve pa smo pekli 15 in 30 min. S PCR v realnem času smo tako tudi ugotavljali vpliv časa pečenja na učinkovitost reakcije in določili občutljivost PCR v realnem času za določanje oreha v standardnih orehovitih piškotih. Določili smo 0,01 % oreha in ugotovili, da je čas toplotne obdelave vplival na učinkovitost encimske reakcije.

V zaključnem delu smo izolirali DNK iz vzorcev orehovega peciva in naredili kvalitativno in kvantitativno analizo določanja vsebnosti oreha v živilih s PCR v realnem času. Pozitivne rezultate smo dobili pri vseh vzorcih oreha, v katerih je bil oreh deklariran. Za kvantifikacijo rezultatov PCR v realnem času smo spektrofotometrično izmerili koncentracije DNK živil in ugotovili, da so bile koncentracije prenizke. Privzeli smo 10 x

višje koncentracije in pripravili ustrezne razredčitve DNK vzorcev tako, da je bila koncentracija celotne DNK vzorca 30 ng DNK/ μ L. S tako pripravljenimi DNK smo določili koncentracijo DNK oreha v vzorcih in jih primerjali z deklariranimi. Koncentracije DNK oreha v vzorcih, določene s PCR v realnem času, so bile nepravilne. Ugotovili smo, da PCR v realnem času omogoča kvalitativno določitev oreha v živilih, medtem ko kvantifikacija s pomočjo omenjene metode ni mogoča.

7 VIRI

Abram V., Cigić B., Poklar Ulrih N., Skrt M. 2006. Eksperimentalna biokemija: za študente biotehnologije in živilske tehnologije. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 65 - 67

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

Applied Biosystems. 2008. Guide to performing relative quantitation of gene expression using real-time quantitative PCR. Carlsbad, Life Technologies
<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/support/tutorials/realtime-pcr-trouble-shooting-guide.html> (maj, 2010): 4 - 13

Arlorio M., Cereti E., Coisson J.D. Travaglia F., Martelli A. 2007. Detection of hazelnut (*Corylus spp.*) in processed foods using real-time PCR. Food Control, 18: 140 - 148

Allergome. 2010. Allergene databases. Latina, Allergy Data Laboratories
http://www.allergome.org/script/dettaglio.php?id_molecule=1607 (marec, 2010): 5 str.

Ahn S. J., Costa J., Emanuel J. R. 1996. PicoGreen quantitation of DNA: Effective evaluation of samples pre- or post-PCR. Nucleic Acid Research, 24: 2623 - 2625

Brežná B., Hudecová L., Kuchta T. 2006. A novel real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) method for the detection of walnuts in food. European Food Research Technologies, 223, 3: 373 - 377

Breitender H. 2006. Classifying food allergens. V: Detecting allergens in food. Koppelman S. J., Hefle S. L. (eds.). Cambridge. Woodhead Publishing Limited: 21 - 61

Crowter J. R. 1995. ELISA: Theory and practice. Totowa, Human Press Inc: 35 - 61

Directive 2003/89/EC of the European Parliament and the Council of 10 November 2003 in 2000/13/EC as regards of the ingredients present in foodstuffs. Official Journal of the European Union, 46, L 308: 15 - 18

Dorak M. T. 2006: Real-Time PCR. Oxford, Taylor & Francis: 333 str.

Fermentas. 2008. Genomic DNA purification Kit #K0512: Experimental protocol. Burlington, Fermentas: 8 str.

Flamm R. K., Hinrichs D. J., Thomashow M. F. 1984. Introduction of pAM β 1 into *Listeria monocytogenes* by conjugation and homology between native *L. monocytogenes* plasmids. Infection and Immunity, 44, 1: 157-161

Greiner R., Konieczny U. 2008. 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> (april, 2010)

Holzhauser T., Stephan O., Vieths S. 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 - 142

IVZ RS. 2010. Realizacija terciarne dejavnosti v letu 2009. Poročilo o delu subspecialnih laboratorijev Inštituta za varovanje zdravja Republike Slovenije. Nacionalni registri in nacionalne evidence. Ljubljana, IVZ RS - Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije
http://www.ivz.si/javne_datoteke/datoteke/2165-letnocporoc09cterciackratko.pdf
(april, 2010): 15 - 22

Jędrychowsky L., Egger M. Hauser G., Schmidt G., Wopfner N., Ferreira F., Wallner M., Lopata A. 2010. Brief characteristics of other important food allergens. V: *Chemical and biological properties of food allergens*. Jędrychowsky L., Wichers H. J. (eds.). Boca Raton, Taylor & Francis: 319 - 386

Jones S. M., Burks W. 2008. The spectrum of allergic reactions to foods. V: *Food allergy: Reactions to foods and additives*. 4th ed. Metcalfe D. D., Sampson H. A., Simon R. A. (eds.). Massachusetts, Blackwell Publishing Inc.: 99 - 109

Koppelman S. 2006. Detecting tree nuts and seeds in food. V: *Detecting allergens in food*. Koppelman S. J., Hefle S. L. (eds.). Cambridge, Woodhead Publishing Limited: 201 - 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 - 25

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., Arden E. K., Nitsche A. 2002. Real-Time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 30, 6: 1292 - 1305

Mackay J., Landt O. 2007. Real-time PCR fluorescent chemistries. *Methods in Molecular Biology*, 353: 237 - 261

Mafra I., Silva A., Moreira E., Ferreira da Silva C., Beatriz M., Oliveira P. 2008. Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products. *Food Control*, 19, 12: 1183-1190

Niemann L., Hefle S. 2003. Validated ELISA for detection of undeclared walnut residues in food. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111, 1: 248 - 248

Ocepek R. 1995. Oreh: pridelovanje in uporaba. Ljubljana, ČZD Kmečki Glas: 99 str.

Odločba sveta z dne 19. decembra 2006 o posebnem programu, ki ga bo s pomočjo neposrednih ukrepov izvajalo Skupno raziskovalno središče v okviru Sedmega okvirnega programa Evropske skupnosti za raziskave, tehnološki razvoj in predstavitvene dejavnosti (2007 – 2013). 2006. Uradni list Evropske unije, 49, L 400: 368 - 403

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

Pfaffl M. W., Horgan G. W., Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30, 9: 1 - 10

Pfaffl M. W. 2004. Determination of real-time PCR efficiency: An overview. V: 1st International qPCR Symposium & Application Workshop, 3. - 6. march 2004. Freising – Weihenstephan. Pfaffl M. W. (ed.). Munich, Technical university of Munich.
<http://www.gene-quantification.de/qpcr2004-pfaffl.pdf> (april, 2010): 24 str.

Piknová L., Pangallo D., Kuchta T. 2008. 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 - 6756

Priloga k akreditacijski listini LP-029: za Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije. 2009. Reg. Št. 811-55/08-64. Ljubljana, Slovenska akreditacija: 23 str.

Qiagen. 2006. DNeasy[®] plant handbook. Hilden, Qiagen: 55 str.

Sauders N. A. 2004a. 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

Sauders N. A. 2004b. Quantitative real-time PCR. V: Real-time PCR: an essential guide. Edwards K., Logan J., Sauders N. A. (eds.). Wymondham, Horizon Bioscience: 103 - 124

Taylor S. 2006. The nature of food allergy. V: Detecting allergens in food. Koppelman S. J., Hefle S.L. (eds.). Cambridge, Woodhead Publishing Limited: 3 - 20

Ulm University. 2001. Epitop. Ulm, Ulm University
<http://www.uni-ulm.de/elektronenmikroskopie/ImmunHerbst2001.html> (april, 2010): 1 str.

Uredba (ES) št. 178/2002 Evropskega parlamenta in sveta z dne 28. januarja 2002 o določitvi splošnih načel in zahtevah živilske zakonodaje, ustanovitvi Evropske agencije za varnost hrane in postopkih, ki zadevajo varnost hrane. 2002. Uradni list Evropske Unije, 45, L 31: 1 - 24

Yeung J. 2006. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for detecting allergens in foods. V: Detecting allergens in food. Koppelman S. J., Hefle S. L. (eds.). Cambridge, Woodhead Publishing Limited: 109 - 123

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

Whitney E., Catalado C. B., Rofles S. R. 2002. Understanding normal and clinical nutrition. 6th ed. Belmont, Wadsworth: 498 - 539

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

ZAHVALA

Posebno zahvalo namenjam svoji mentorici, doc. dr. Barbari Jeršek za izjemno podporo, ki je nemalokrat presegala zgolj mentorsko vlogo.

Prof. dr. Marjanu Simčiču se zahvaljujem za delo recenzenta.

Za strokovno pomoč pri eksperimentalnem delu in strokovnem izrazoslovju se zahvaljujem asist. dr. Mihaeli Skrt.

Saši Piskernik in Tanji Kohek se zahvaljujem za pomoč pri uvajanju in izvedbi eksperimentalnega dela naloge.

Za pregled diplomskega dela, nasvete in pomoč pri iskanju literature se zahvaljujem Lini Burkan in ge. Ivici Hočevnar.

Za vso pomoč, prijaznost in razumevanje se zahvaljujem tudi ostalim delavcem fakultete.

Katji Černe iz fotokopirnice Reflect d.o.o hvala za vsestransko pomoč tekom študija in pri izdelavi diplomske naloge.

Za podporo in izjemno potrpežljivost skozi ves čas študija se zahvaljujem mojim staršem ter Sergeji, Borisu in Vasiliju.

Hvala tudi Klavdiji, Maji, Petri, Mihi, Nedi, Andreju, Heleni, Vedranu, Mariji, Ajdi in Daši.