

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Helena VOLK

**DOLOČANJE POTVORB KOZJEGA IN OVČJEGA  
MLEKA S KRAVJIM MLEKOM NA RAVNI DNA IN  
PROTEINOV**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Helena VOLK

**DOLOČANJE POTVORB KOZJEGA IN OVČJEGA MLEKA S  
KRAVJIM MLEKOM NA RAVNI DNA IN PROTEINOV**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo

**DETERMINATION OF ADULTERATION OF GOATS' MILK AND  
SHEEP'S MILK WITH COWS' MILK ON DNA AND PROTEIN  
LEVEL**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes: Field Food Science and Technology

Ljubljana, 2013

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa druge stopnje Živilstvo. Opravljeno je bilo na Biotehniški fakulteti, Oddelku za živilstvo, Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala izr. prof. dr. Barbaro Jeršek, za somentorico izr. prof. dr. Polono Jamnik in za recenzentko doc. dr. Andrejo Čanžek Majhenič.

Mentorica: izr. prof. dr. Barbara Jeršek

Somentorica: izr. prof. dr. Polona Jamnik

Recenzentka: doc. dr. Andreja Čanžek Majhenič

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega magistrskega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Helena Volk

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2  
DK UDK 637.1.06:636.3:577.2.088(043)=163.6  
KG mleko / potvorbe mleka / kravje mleko / kozje mleko / ovčje mleko / določanje potvorb / molekularne tehnike / PCR / proteomika  
AV VOLK, Helena, dipl. inž. živ. in preh. (UN)  
SA JERŠEK, Barbara (mentorica)/JAMNIK, Polona (somentorica)/ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (recenzentka)  
KZ SI – 1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo  
LI 2013  
IN DOLOČANJE POTVORB KOZJEGA IN OVČJEGA MLEKA S KRAVJIM MLEKOM NA RAVNI DNA IN PROTEINOV  
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Živilstvo)  
OP XII, 128 str., 28 pregl., 40 sl., 6 pril., 116 vir.  
IJ SI  
JI sl/en  
AI Potvarjanje kozjega in ovčjega mleka je možno z dodajanjem mleka živali druge vrste, naprimer cenejšega kravjega mleka. Namen magistrskega dela je bil določiti in kvantificirati potvorbe kozjega (*Capra hircus*) in ovčjega (*Ovis aries*) mleka s kravjim (*Bos taurus*) mlekom. Izbrali smo dva pristopa: določanje kravjega mleka preko DNA iz somatskih celic in preko proteinske slike. Kravje mleko smo v mešanicah kozjega in ovčjega mleka določali s PCR v realnem času, z nespecifično in s specifično metodo določanja pomnožkov. Izmed 12 preizkušenih izolacij DNA iz mleka smo glede na dobljeno koncentracijo in čistost izolirane DNA, parametre PCR v realnem času (korelacijski koeficient, učinkovitost) in časa izolacije, kot najbolj primerno metodo izbrali komercialni komplet NucleoSpin Food. Optimalne koncentracije začetnih oligonukleotidov in sonde za kravo so bile 300 nM BOS-F, 900 nM BOS-R; 50 nM BOS-P in za sesalce 600 nM MAN-F, 900 nM MAN-R; 50 nM MAN-P. Specifičnost začetnih oligonukleotidov BOS je bila 87,5 % za nespecifično metodo določanja pomnožkov in 100 % za specifično metodo določanja pomnožkov. Teoretična občutljivost sistemov BOS (za določanje kravje DNA) in MAN (za določanje sesalčje DNA) je bila pri nespecifični in specifični metodi določanja pomnožkov 0,605 pg/µL, praktična občutljivost PCR v realnem času za določanje kravjega mleka pa 0,5 %. Zaradi različnih razlogov (učinkovitost PCR, oblikovanje začetnih oligonukleotidov, relativno velik razpon možnega števila somatskih celic) pravilna kvantifikacija kravjega mleka v ovčjem oziroma kozjem mleku s PCR v realnem času ni bila možna. Detekcija kravjega mleka na nivoju proteinov je temeljila na ločevanju proteinov z SDS-PAGE in 2-D elektroforezo. S primerjavo proteinskih slik 2-D elektroforeze čistega kravjega mleka, čistega kozjega in čistega ovčjega mleka ter potvorjenih vzorcev mleka, smo določili mesta, kjer se proteini pojavijo samo pri kravjem mleku. Identifikacija je pokazala, da gre za prekurzorje κ-kazeina. κ-kazein je prisoten tudi pri kozjem in ovčjem mleku, a ima kravji κ-kazein drugačne posttranslacijske spremembe, ki omogočajo, da se na proteinski sliki 2-D elektroforeze pojavi na specifičnem mestu.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2  
DC UDC 637.1.06:636.3:577.2.088(043)=163.6  
CX milk / milk adulteration / cows' milk / goats' milk / sheep's milk / determination of adulteration / molecular techniques / PCR / proteomics  
AU VOLK, Helena,  
AA JERŠEK, Barbara (supervisor)/JAMNIK, Polona (co-advisor)/ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (reviewer)  
PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology  
PY 2013  
TI DETERMINATION OF ADULTERATION OF GOATS' MILK AND SHEEP'S MILK WITH COWS' MILK ON DNA AND PROTEIN LEVEL  
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Food Science and Technology)  
NO XII, 128 p., 28 tab., 40 fig., 6 ann., 116 ref.  
LA Sl  
AL sl/en  
AB Adulteration of goats' and sheep's milk is possible by the addition of milk from other species, e.g. cheaper cows' milk. The aim of this M. Sc. thesis was detection and quantification of adulteration of goats' (*Capra hircus*) and sheep's (*Ovis aries*) milk with cows' (*Bos taurus*) milk. Two approaches were chosen: detection of cows' milk via DNA from somatic cells and detection of cows' milk by its protein picture. Cows' milk in mixtures of goats' and sheep's milk was detected using real-time PCR with nonspecific and specific method of detection. From 12 tested DNA extraction methods, NucleoSpin Food kit was chosen regarding achieved concentration and purity, optimal parameters of PCR (correlation factor, efficiency) and time for extraction. Optimal concentrations of cow specific primers were 300 nM BOS-F, 900 nM BOS-R; 50 nM BOS-P and for mammalian specific primers 600 nM MAN-F, 900 nM MAN-R; 50 nM MAN-P. Specificity of primers BOS was 87.5 % for nonspecific method of detection and 100 % for specific method of detection. Theoretical sensitivity of BOS and MAN systems with nonspecific and specific method of detection was 0.605 pg/µL, practical sensitivity of real-time PCR for detection of cow's milk was 0.5%. Due to several reasons (PCR efficiency, primer design, relatively large range of somatic cell count) accurate quantification of cow's milk in goat's and sheep's milk by real-time PCR was not possible. Detection of cows' milk on protein level was based on separation of proteins with SDS-PAGE and 2-D electrophoresis. With comparison of protein pictures of 2-D electrophoresis of pure cows' milk, pure goats' and sheep's milk and adulterated milks we determined spots where only cows' milk proteins appear. Identification showed the spots consist of a precursor of κ-casein. κ-caseins are present also in goats' and sheep's milk, but due to different posttranslational changes κ-casein from cows' milk was present on a specific spot.

## KAZALO VSEBINE

	str.
<b>Ključna dokumentacijska informacija.....</b>	<b>III</b>
<b>Key woeds documentation.....</b>	<b>IV</b>
<b>Kazalo vsebine .....</b>	<b>V</b>
<b>Kazalo preglednic.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Kazalo slik.....</b>	<b>X</b>
<b>Kazalo prilog.....</b>	<b>XII</b>
<b>Okrajšave in simboli .....</b>	<b>XIII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 CILJI DELA.....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 POTVORBE MLEKA .....	4
2.1.1 Hranilne vrednosti kozjega in ovčjega mleka in vpliv na zdravje.....	5
2.1.2 Alergeni v kravjem mleku .....	7
2.1.3 Razlika v količini prireje mleka.....	8
2.1.4 Cenovna razlika.....	9
2.1.5 Število somatskih celic .....	10
2.2 DOLOČANJE POTVORB MLEKA .....	11
2.2.1 Odkrivanje potvorb mleka s PCR in PCR v realnem času .....	12
2.2.2 Odkrivanje potvorb mleka z analizo proteinov.....	14
2.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO.....	16
2.3.1 Napotki za oblikovanje začetnih oligonukleotidov in sonde .....	21
2.4 PROTEOMSKA ANALIZA.....	22
2.4.1 SDS-PAGE elektroforeza .....	22
2.4.2 2-D elektroforeza .....	22
<b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>24</b>
3.1 POTEK EKSPERIMENTALNEGA DELA .....	24
3.2 MATERIAL .....	24
3.2.1 Vzorci .....	24
3.2.2 Laboratorijska oprema.....	25
3.2.3 Kemikalije za izolacijo DNA iz vzorcev mleka, pinjencev in sirotke ...	26
3.2.3.1 Komercialni kompleti .....	26
3.2.3.2 Klasični načini .....	29
3.2.4 Kemikalije za pripravo standardne DNA krave .....	30
3.2.5 Kemikalije za pripravo reakcijske mešanice za PCR v realnem času ..	31
3.2.5.1 Specifična metoda določanja pomnožkov .....	32
3.2.5.2 Nespecifična metoda določanja pomnožkov .....	33
3.2.5.3 Kemikalije za pripravo standardne DNA.....	33
3.2.6 Kemikalije za izolacijo proteinov iz mleka .....	34
3.2.7 Kemikalije za izvedbo SDS-PAGE in 2-D elektroforeze .....	34
3.3 METODE.....	35
3.3.1 Postopki izolacije DNA iz mleka, pinjenca in sirotke .....	35
3.3.1.1 Komercialni komplet NucleoSpin Food .....	35
3.3.1.2 Komercialni komplet QIAprep Spin Miniprep.....	36

3.3.1.3	Komercialni komplet DNeasy Blood & Tissue .....	36
3.3.1.4	Komercialni komplet DNeasy Food .....	37
3.3.1.5	Komercialni komplet SmartHelix First DNAid.....	37
3.3.1.6	Komercialni komplet SmartHelix Complex Samples.....	38
3.3.1.7	Klasična metoda izolacije DNA s fenol-kloroformom po De in sod. (2011) .....	38
3.3.1.8	Dvakratna klasična metoda izolacije DNA s fenol-kloroformom .....	39
3.3.1.9	Izolacija DNA po Bonaiti in sod. (2006).....	39
3.3.1.10	Izolacija DNA po Murphy in sod. (2002).....	40
<b>3.3.2</b>	<b>Merjenje koncentracije in čistosti izolirane DNA .....</b>	<b>40</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Priprava standardne DNA .....</b>	<b>40</b>
3.3.3.1	Pomnoževanje izbranega odseka DNA.....	41
3.3.3.2	Čiščenje pomnožkov.....	41
3.3.3.3	Ligacija in transformacija pomnožkov .....	41
3.3.3.4	Izolacija plazmida .....	42
<b>3.3.4</b>	<b>Priprava in izvedba PCR v realnem času .....</b>	<b>42</b>
3.3.4.1	Nespecifična metoda določanja pomnožkov .....	42
3.3.4.2	Specifična metoda določanja pomnožkov .....	43
<b>3.3.5</b>	<b>Optimizacija nespecifične metode določanja pomnožkov .....</b>	<b>44</b>
<b>3.3.6</b>	<b>Optimizacija specifične metode določanja pomnožkov .....</b>	<b>45</b>
<b>3.3.7</b>	<b>Določitev občutljivosti PCR v realnem času .....</b>	<b>46</b>
3.3.7.1	Določitev teoretične občutljivosti PCR v realnem času .....	46
3.3.7.2	Določitev praktične občutljivosti PCR v realnem času .....	46
<b>3.3.8</b>	<b>Določitev specifičnosti PCR v realnem času .....</b>	<b>47</b>
<b>3.3.9</b>	<b>qPCR kravjega mleka.....</b>	<b>48</b>
<b>3.3.10</b>	<b>Določitev koncentracije proteinov v vzorcih mleka.....</b>	<b>48</b>
<b>3.3.11</b>	<b>Izolacija proteinov mleka .....</b>	<b>49</b>
<b>3.3.12</b>	<b>Elektroforeza SDS-PAGE .....</b>	<b>49</b>
<b>3.3.13</b>	<b>2-D elektroforeza .....</b>	<b>51</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI Z RAZPRAVO .....</b>	<b>53</b>
4.1	ŠTEVILLO SOMATSKIH CELIC .....	53
4.2	OPTIMIZACIJA IZOLACIJE DNA IZ MLEKA .....	53
4.2.1	<b>Komercialni kompleti .....</b>	<b>54</b>
4.2.1.1	NucleoSpin Food .....	54
4.2.1.2	QIAprep Spin Miniprep .....	54
4.2.1.3	DNeasy Blood & Tissue .....	54
4.2.1.4	DNeasy Food .....	54
4.2.1.5	SmartHelix First DNAid .....	55
4.2.1.6	SmartHelix Complex Samples.....	55
4.2.2	<b>Klasični načini izolacije DNA.....</b>	<b>55</b>
4.2.2.1	Izolacija DNA s fenol-kloroformom po De in sod. (2011).....	55
4.2.2.2	Dvakratna izolacija DNA s fenol-kloroformom .....	55
4.2.3	<b>Kombinirane metode izolacije DNA .....</b>	<b>56</b>
4.2.3.1	Fenol-kloroform in komercialni komplet NucleoSpin Food .....	56
4.2.3.2	Fenol-kloroformom in komercialni komplet DNeasy Food & Tissue .....	56
4.2.3.3	Izolacija DNA po Bonaiti in sod. (2006).....	56
4.2.3.4	Izolacija DNA po Murphy in sod. (2002).....	56
4.2.4	<b>Zbir rezultatov optimizacije izolacije DNA .....</b>	<b>57</b>
4.2.5	<b>Preverjanje kakovosti izolirane DNA s PCR v realnem času .....</b>	<b>60</b>
4.3	KAKOVOST STANDARDNE DNA.....	69
4.4	OPTIMIZACIJA PCR V REALNEM ČASU.....	70

<b>4.4.1 Nespecifična metoda določanja pomnožkov .....</b>	<b>70</b>
4.4.1.1 Začetni oligonukleotidi, specifični za kravo.....	70
4.4.1.2 Začetni oligonukleotidi, specifični za sesalce.....	72
4.4.1.3 Značilna temperatura taljenja pomnožkov, specifičnih za kravo .....	74
<b>4.4.2 Specifična metoda določanja pomnožkov .....</b>	<b>75</b>
4.5 SPECIFIČNOST PCR V REALNEM ČASU ZA DOLOČANJE KRAVE.....	76
4.6 OBČUTLJIVOST PCR V REALNEM ČASU.....	79
<b>4.6.1 Teoretična občutljivost PCR v realnem času.....</b>	<b>79</b>
4.6.1.1 Določanje kravje DNA z nespecifično metodo določanja pomnožkov	79
4.6.1.2 Določanje sesalčje DNA z nespecifično metodo določanja pomnožkov	81
4.6.1.3 Določanje kravje DNA s specifično metodo določanja pomnožkov ..	83
4.6.1.4 Določanje sesalčje DNA s specifično metodo določanja pomnožkov	85
<b>4.6.2 Praktična občutljivost PCR v realnem času .....</b>	<b>87</b>
4.6.2.1 Nespecifična metoda določanja pomnožkov .....	87
4.6.2.2 Specifična metoda določanja pomnožkov .....	90
4.7 ZAČETNI OLIGONUKLEOTIDI in sonda .....	92
4.8 qPCR ZA DOLOČANJE KRAVJEGA MLEKA.....	93
<b>4.8.1 Problem kvantifikacije odstotka kravjega mleka .....</b>	<b>97</b>
4.9 KONCENTRACIJA PROTEINOV .....	101
4.10 SDS-PAGE ELEKTROFOREZA.....	101
4.11 2-D ELEKTROFOREZA.....	102
<b>4.11.1 2-D elektroforeza proteinov čistega mleka .....</b>	<b>102</b>
<b>4.11.2 2-D elektroforeza proteinov iz mešanic mleka .....</b>	<b>105</b>
4.12 ANALIZA SPECIFIČNIH PROTEINOV KRAVJEGA MLEKA.....	107
4.13 BIOINFORMATSKA ANALIZA .....	108
<b>5 SKLEPI.....</b>	<b>111</b>
<b>6 POVZETEK .....</b>	<b>113</b>
<b>7 VIRI .....</b>	<b>116</b>
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Hrnilne vrednosti kozjega, ovčjega in kravjega mleka (Jandal, 1996: 178; Park in sod., 2007: 89) .....	6
Preglednica 2: Prireja kravjega, kozjega in ovčjega mleka v Sloveniji v letih 2001 do 2011 (Poročilo ..., 2012: 127-128) .....	8
Preglednica 3: Odkupne cene kravjega, kozjega in ovčjega mleka v letih 2010, 2011 in 2012 (Špajzer Šraj, 2013; Poročilo ..., 2012) .....	9
Preglednica 4: Dobiček pri potvorbah kozjega mleka s kravjim mlekom .....	10
Preglednica 5: Šahovnica kombinacij začetnih oligonukleotidov, specifičnih za kravo (BOS-F, BOS-R), pri optimizaciji PCR v realnem času .....	45
Preglednica 6: Šahovnica kombinacij začetnih oligonukleotidov, specifičnih za sesalce (MAN-F, MAN-R), pri optimizaciji PCR v realnem času .....	45
Preglednica 7: Koncentracije sond (BOS-P, MAN-P) pri optimizaciji PCR v realnem času..	46
Preglednica 8: Število somatskih celic v vzorcih kravjega, kozjega in ovčjega mleka (Matijašec in Podkrajšek, 2013).....	53
Preglednica 9: Koncentracija in čistost DNA, izolirane z različnimi postopki iz mleka.....	57
Preglednica 10: Rezultati PCR v realnem času za preverjanje kakovosti DNA izolirane iz vzorcev mleka z različnimi metodami .....	66
Preglednica 11: Koncentracija in čistost standardne DNA .....	69
Preglednica 12: Rezultati pomnoževanja standardne DNA z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za sesalce (MAN) in za kravo (BOS) .....	69
Preglednica 13: Parametri PCR v realnem času pri optimizaciji koncentracije začetnih oligonukleotidov, specifičnih za kravo .....	71
Preglednica 14: Parametri PCR v realnem času pri optimizaciji koncentracije začetnih oligonukleotidov, specifičnih za sesalce .....	73
Preglednica 15: Podatki za izračun standardne temperature taljenja pomnožkov, specifičnih za kravo.....	75
Preglednica 16: Parametri PCR v realnem času pri optimizaciji sonde BOS-P .....	76
Preglednica 17: Specifičnosti PCR v realnem času določena s pomnoževanjem DNA izolirane iz različnih vrst mleka .....	77
Preglednica 18: Rezultati pomnoževanja standardne DNA s PCR v realnem času z nespecifično metodo določanja pomnožkov in začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za kravo.....	80
Preglednica 19: Rezultati pomnoževanja standardne DNA s PCR v realnem času z nespecifično metodo določanja pomnožkov in začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za sesalce .....	82
Preglednica 20: Rezultati pomnoževanja standardne DNA krave s PCR v realnem času s specifično metodo določanja pomnožkov in začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za kravo.....	84
Preglednica 21: Rezultati pomnoževanja standardne DNA krave s PCR v realnem času s specifično metodo določanja pomnožkov in začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za sesalce .....	86
Preglednica 22: Rezultati pomnoževanja DNA za določanje praktične občutljivosti PCR v realnem času pri nespecifični metodi določanja pomnožkov za mešanice ovčjega in kravjega ter kozjega in kravjega mleka .....	88
Preglednica 23: Rezultati pomnoževanja DNA za določanje praktične občutljivosti PCR v realnem času pri specifični metodi določanja pomnožkov za mešanice ovčjega in kravjega ter kozjega in kravjega mleka.....	90
Preglednica 24: Lastnosti začetnih oligonukleotidov in sond BOS in MAN.....	92

Preglednica 25: Kvantifikacija kravjega mleka v mešanicah s kozjim in ovčjim mlekom .....	95
Preglednica 26: Teoretičen prikaz vpliva variabilnega števila somatskih celic v kravjem in kozjem mleku na odstotek kravjih somatskih celic v mešanicah kravjega in kozjega mleka..	99
Preglednica 27: Koncentracije proteinov v 20 krat redčenih vzorcih mleka in v neredčenih vzorcih surovega mleka.....	101
Preglednica 28: Primerjava lastnosti $\kappa$ -kazeinov kravjega, kozjega in ovčjega mleka (UniProt, 2013) .....	108

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Filogenetsko drevo povprečne oddaljenosti v % homolognosti primarne strukture κ-kazeinov (Roncada in sod., 2012) .....	15
Slika 2: Prikaz pomnoževanja DNA s PCR na primeru kravje DNA (prirejeno po López-Calleja in sod., 2007b) .....	17
Slika 3: Primer krivulje pomnoževanja DNA, ki ga izriše naprava PCR .....	19
Slika 4: Shema eksperimentalnega dela .....	24
Slika 5: Sekvence začetnih oligonukleotidov, sonde in pomnožkov specifičnih za kravo in za sesalce (prirejeno po López-Calleja in sod., 2007b; NCBI, 2013) .....	32
Slika 6: Nastavitev temperature in časa za pomnoževanje ter določanje pomnožkov z nespecifično metodo z aparatom ABI Prism 7500.....	43
Slika 7: Nastavitev temperature in časa za pomnoževanje ter določanje pomnožkov s specifično metodo z aparatom ABI Prism 7500 .....	44
Slika 8: Pomnoževanje DNA izolirane iz mleka s komercialnim kompletom NucleoSpin Food .....	60
Slika 9: Pomnoževanje DNA izolirane s komercialnim kompletom QIAprep Spin Miniprep .....	60
Slika 10: Pomnoževanje DNA izolirane iz mleka s komercialnim kompletom DNeasy Blood & Tissue .....	61
Slika 11: Pomnoževanje DNA izolirane iz mleka s komercialnim kompletom DNeasy Food .....	61
Slika 12: Pomnoževanje DNA izolirane iz mleka s komercialnim kompletom SmartHelix First DNAid .....	62
Slika 13: Pomnoževanje DNA izolirane iz mleka s komercialnim kompletom Smart Helix Complex Samples.....	62
Slika 14: Pomnoževanje DNA izolirane iz mleka s fenol-kloroformom .....	63
Slika 15: Pomnoževanje DNA izolirane iz mleka z dvakratno izolacijo s fenol-kloroformom .....	63
Slika 16: Pomnoževanje DNA izolirane iz mleka s fenol-kloroformom in komercialnim kompletom NucleoSpin Food .....	64
Slika 17: Pomnoževanje DNA izolirane iz mleka s fenol-kloroformom in komercialnim kompletom DNeasy Blood & Tissue .....	64
Slika 18: Pomnoževanje DNA izolirane iz mleka po protokolu Bonaiti in sod. (2006) .....	65
Slika 19: Pomnoževanje DNA izolirane iz mleka po protokolu Murphy in sod. (2002).....	65
Slika 20: Specifičnost PCR v realnem času določena s pomnoževanjem DNA izolirane iz različnih vrst mleka .....	77
Slika 21: Pomnoževanje standardne DNA krave z začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za kravo, s PCR v realnem času z nespecifično metodo določanja pomnožkov.....	80
Slika 22: Standardna krivulja za določanje teoretične občutljivosti PCR v realnem času pri nespecifični metodi določanja pomnožkov za začetne oligonukleotide, specifične za kravo .	81
Slika 23: Pomnoževanja standardne DNA z začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za sesalce, s PCR v realnem času z nespecifično metodo določanja pomnožkov .....	82
Slika 24: Standardna krivulja za določanje teoretične občutljivosti PCR v realnem času pri nespecifični metodi določanja pomnožkov za začetne oligonukleotide, specifične za sesalce	83
Slika 25: Pomnoževanje standardne DNA krave z začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za kravo, s PCR v realnem času s specifično metodo določanja pomnožkov.....	84
Slika 26: Standardna krivulja za določanje teoretične občutljivosti PCR v realnem času pri specifični metodi določanja pomnožkov za začetne oligonukleotide, specifične za kravo .....	85
Slika 27: Pomnoževanje standardne DNA krave z začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za sesalce, s PCR v realnem času s specifično metodo določanja pomnožkov .....	86
Slika 28: Standardna krivulja za določanje teoretične občutljivosti PCR v realnem času pri specifični metodi določanja pomnožkov za začetne oligonukleotide, specifične za sesalce ...	87

Slika 29: Standardna krivulja za vsebnost kravjega mleka pri nespecifični metodi določanja pomnožkov v mešanici kozjega mleka s kravjim mlekom .....	89
Slika 30: Standardna krivulja pri nespecifični metodi določanja pomnožkov v mešanici ovčjega in kravjega mleka.....	89
Slika 31: Standardna krivulja za vsebnost kravjega mleka pri specifični metodi določanja pomnožkov v mešanici kozjega mleka s kravjim mlekom .....	91
Slika 32: Standardna krivulja za vsebnost kravjega mleka pri specifični metodi določanja pomnožkov v mešanici ovčjega mleka s kravjim mlekom .....	91
Slika 33: Umeritvene krivulje za kvantifikacijo kravjega mleka v mešanicah kozjega oz. ovčjega mleka s kravjim mlekom .....	97
Slika 34: Proteinski profil kravjega, kozjega in ovčjega mleka (SDS-PAGE) .....	102
Slika 35: Proteinski profil kravjega mleka z označenim mestom, kjer se pojavijo proteini, specifični za kravje mleko (2-D elektroforeza).....	103
Slika 36: Proteinski profil kozjega mleka z označenim mestom, kjer se pojavijo proteini, specifični za kravje mleko (2-D elektroforeza, slika 35) .....	104
Slika 37: Proteinski profil ovčjega mleka z označenim mestom, kjer se pojavijo proteini, specifični za kravje mleko (2-D elektroforeza, slika 35) .....	105
Slika 38: Proteinski profil mešanice kozjega mleka s kravjim mlekom z označenim mestom, kjer se pojavijo proteini, specifični za kravje mleko (2-D elektroforeza).....	106
Slika 39: Proteinski profil mešanice ovčjega mleka s kravjim mlekom z označenim mestom, kjer se pojavijo proteini, specifični za kravje mleko (2-D elektroforeza).....	107
Slika 40: Primerjava aminokislinske sekvence κ-kazeinov kravjega, kozjega in ovčjega mleka (UniProt) .....	109

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Število somatskih celic (x1000) v kravjem mleku med leti 2001 in 2012 (Jeretina, 2013)

Priloga B: Število somatskih celic (x1000) v kozjem mleku med leti 2001 in 2012 (Baza podatkov »drobnica«, 2013)

Priloga C: Število somatskih celic (x1000) v ovčjem mleku med leti 2001 in 2012 (Baza podatkov »drobnica«, 2013)

Priloga D: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije proteinov po Bradfordu (Jamnik, 2012)

Priloga E: Izvid določanja somatskih celic v vzorcih mleka (Matijašec in Podkrajšek, 2013).

Priloga F: Rezultati MALDI-TOF-TOF sprekrometrije lis 2-D elektroforeze

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

$\Delta Rn$	normaliziran fluorescenčni signal
A	adenozin
BOS	začetni oligonukleotid specifičen za kravo
bp	bazni par
C	citozin
$C_t$	cikel meje določanja
dNTP	deoksiribonukleotid
E	učinkovitost PCR (%)
ELISA	encimskoimunski test
FC	fenol-kloroform
G	gvanin
MAN	začetni oligonukleotid specifičen za sesalce
m.m.	mlečna maščoba
PCR	verižna reakcija s polimerazo
$R^2$	korelacijski koeficient
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov
SC	somatske celice
SSC	število somatskih celic
T	timin
$T_m$	temperatura taljenja pomnožkov
qPCR	kvantitativni PCR
RPM	obrati na minuto

## 1 UVOD

Potvorba živila je nadomestitev dela surovine ali sestavine s cenejšo, s čimer lahko proizvajalci pridejo do večjega finančnega dobička. Potrošniki, ki kupijo tako živilo, so oškodovani finančno, spremenjeni sta lahko varnost in kakovost izdelka, njihovo zaupanje do proizvajalca je izkoriščeno. Potvorbe so večinoma za zdravje potrošnika neškodljive, a vseeno nesprejemljive (Kaj so ... , 2010).

Koza (*Capra hircus*) in ovca (*Ovis aries*) v dobi laktacije izločita manj mleka kot krava (*Bos taurus*), zato se nekateri proizvajalci zatekajo k potvorbam. H kozjemu ali ovčjemu mleku v različnih razmerjih lahko primešajo kravje mleko. V kolikor tako mešanico mleka deklarirajo kot kozje oziroma kot ovče mleko, zavajajo potrošnika.

Kozje in ovče mleko sta na tržišču zelo cenjena, slovita po svojih značilnih organoleptičnih lastnostih, prehranski vrednosti in zdravilnih lastnostih. Kravje mleko vsebuje več kot 20 alergenih proteinov, ki lahko pri nekaterih osebah sprožijo preobčutljivostno reakcijo. Veliko se jih odloči, da kravje mleko nadomestijo tudi s kozjim in ovčjim mlekom, ki določenih alergenov ne vsebujeta, vsebujeta manj nevarne alergene ali jih vsebujeta v nižjih koncentracijah (El-Agamy, 2007).

Po četrtem odstavku dela II, priloge XII Uredbe sveta (ES) št. 1234/2007 z dne 22. oktobra 2007 o vzpostavitvi skupne ureditve kmetijskih trgov in o posebnih določbah za nekatere kmetijske proizvode („Uredba o enotni SUT“) (Uredba sveta (ES) 1234/2007) je potrebno, v primeru, da mleko ni kravje, na deklaraciji navesti vrsto mleka iz katerega je proizvod. Potvarjanje kozjega in ovčjega mleka s kravjim mlekom za potrošnike s preobčutljivostno reakcijo na proteine kravjega mleka predstavlja zdravstveno tveganje. Ostalim potrošnikom pa je taka potvorba nesprejemljiva, tako z ekonomskega kot z etičnega vidika.

Na nivoju EU je kot referenčna metoda za odkrivanje potvorb s kravjim mlekom v sirih iz ovčjega, kozjega ali bivoličjega mleka in v mešanicah ovčjega, kozjega in bivoličjega mleka določeno izoelektrično fokusiranje (Commission ... 273/2008/EC).

Spodbuja se razvoj in postavljanje novih metod, ki bi omogočile hitro, natančno, občutljivo in cenovno ugodno odkrivanje potvorb mleka in mlečnih izdelkov. Želja je razviti tako metodo, ki bi poleg kvalitativnega določanja omogočila tudi kvantifikacijo dodanega mleka v mleku ali mlečnem izdelku iz drugega vira (kozjem, ovčjem, ...). V strokovnih objavah zasledimo več konceptov in metod, med drugim tudi take, ki odstotek kravjega mleka določajo na nivoju DNA in proteinov (Mayer in sod., 2012).

Velja dogovor, da kravje mleko imenujemo mleko. Za mleko ostalih vrst molznih živali pa se uporablja daljše ime, ki označuje izvor mleka (npr. kozje mleko). Zaradi lažje sledljivosti in jasnosti bomo v magistrskem delu v vseh primerih uporabljali daljše ime, torej kravje mleko, kozje mleko, ovče mleko, bivoličje mleko itd. Beseda mleko bo uporabljena le, ko bomo želeli zajeti katerokoli ali vse vrste mleka.

### 1.1 CILJI DELA

Cilj magistrskega dela je bil pregledati obstoječe metode za določanje potvorb kozjega in ovčjega mleka s kravjim mlekom ter postaviti in optimizirati metodo za določanje teh potvorb na nivoju DNA in proteinov. Določanje potvorb mleka na nivoju DNA je temeljilo na pomnoževanju DNA kravjih somatskih celic v mešanicah mleka s PCR v realnem času. Določanje potvorb mleka na nivoju proteinov smo izvedli s SDS-PAGE elektroforezo in z 2-D elektroforezo. Z njima smo določali specifične proteine za kravje mleko in jih uporabili za določanje potvorb kozjega in ovčjega mleka.

### 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

V mleku so prisotne somatske celice, ki vsebujejo DNA, s pomočjo katere lahko določimo izvor mleka. Iz mešanic mleka bomo izolirali skupno DNA, ki bo vključevala mikrobnou DNA in DNA somatskih celic prisotnih v mleku. S PCR v realnem času bomo pomnožili in določali kravjo DNA iz kravjih somatskih celic in sesalčeve DNA iz skupne količine somatskih celic. S primerjavo ciklov meje določanja ( $C_t$ ) kravje in sesalske DNA bomo lahko detektirali potvorbo kozjega oziroma ovčjega mleka s kravjim in izračunali količino kravjega mleka v mešanicah.

Detekcija na nivoju proteinov bo temeljila na izolaciji mlečnih proteinov iz čistega mleka in različnih mešanic. S SDS-PAGE elektroforezo bomo ločili izolirane proteine na podlagi mase in predvidevamo, da bomo lahko odkrili specifične proteine, ki se pojavljajo samo pri kravjem mleku. V kolikor ločba s SDS-PAGE elektroforezo ne bo zadostovala, bomo poskus ponovili z 2-D elektroforezo, ki proteine loči na podlagi izoelektrične točke in mase. Odkrite proteine, ki se pojavljajo samo pri kravjem mleku, bomo iz gela izolirali in določili njihovo zaporedje ter strukturo.

## 2 PREGLED OBJAV

Ljudje smo ovce in koze udomačili pred približno 8 000 do 10 000 leti. Nekoliko kasneje smo udomačili tudi krave, ki so postale pomembnejše mlečne živali in prevladujejo v državah z močno mlekarsko industrijo. Koze in ovce so se kot mlečne živali ohranile na sušnih območjih, predvsem v Mediteranu in okolici (Fox in McSweeney, 1998).

V Sloveniji imamo dolgo tradicijo reje drobnice, ki se odraža tudi v številu avtohtonih in tradicionalnih pasem koz in ovc. Slovenska avtohtona pasma koz je Drežniška koza. K slovenskim tradicionalnim pasmam prištevamo Slovensko sansko kozo in Slovensko srnasto kozo. Slovenske avtohtone pasme ovc so Bovška ovca, Itrska pramenka - Istrijanka, Belokranjska pramenka in Jezersko-solčavska ovca. Oplemenjena jezersko-solčavska ovca spada med slovenske tradicionalne pasme (Šalehar in sod., 2003). V Sloveniji redimo še Bursko pasmo koz in ovce pasme Texel (Gorjanc in Kompan, 2007a; Gorjanc in Kompan, 2007b).

Za potrebe prireje mleka redijo različne avtohtone in tradicionalne pasme koz in ovc (Šalehar in sod., 2003):

- Bovško ovco večinoma redijo v majhnih tropih v višje ležečih krajih Zgornjesoške doline na pobočjih Krna, Kanina in Mangarta. Mlečnost Bovške ovce v zadnjih letih znaša 226 kg mleka na ovco letno. Mleko predelujejo v Bovški sir.
- Itrsko pramenko redijo v Istri in na Krasu. V primerjavi z Bovško ovco je slabše mlečna, letna količina mleka znaša 152 kg na ovco.
- Drežniške koze rejene na Bovškem so namenjene prireji mleka, od tega se ga lahko do 20 % doda mleku Bovške ovce, ki ga predelajo v Bovški sir.
- Slovenska sanska koza je izrazito mlečna koza, njena povprečna mlečnost je 550 kg mleka na kozo letno.
- Slovenska srnasta koza je izrazito mlečna koza, s povprečjem 533 kg mleka na kozo letno.

Do vstopa Slovenije v Evropsko Unijo je področje mleka in mlečnih izdelkov v Sloveniji urejal Pravilnik o kakovosti mleka, mlečnih izdelkov, siril in čistih cepiv s popravki ter spremembami (Pravilnik ..., 1993). V 10. členu pravilnika je bilo navedeno, da je mleko čist nespremenjen, svež proizvod mlečne žleze v času laktacije, dobljen s popolno in redno molžo zdravih in pravilno krmljenih krav, ovac ali koz, ki mu ni nič dodano oziroma odvzeto. Po tretjem odstavku istega člena mora imeti mešanica mleka krav, ovac ali koz označbo izvora mleka in kot primer navaja mešanico kravjega in ovčjega mleka. V pravilniku so definirani tudi pogoji, ki jih morajo izpolnjevati kravje mleko, kozje mleko in ovčje mleko. Iz Pravilnika o kakovosti mleka, mlečnih izdelkov, siril in čistih cepiv je bilo

jasno razvidno, da kozje in ovčje mleko ne smeta vsebovati mleka drugih vrst, če to ni navedeno na embalaži.

Pravilnik o kakovosti mleka, mlečnih izdelkov, sirih in čistih cepiv (1993) nadomešča Uredba sveta (ES) št. 1234/2007 z dne 22. oktobra 2007 o vzpostavitvi skupne ureditve kmetijskih trgov in o posebnih določbah za nekatere kmetijske proizvode („Uredba o enotni SUT“). V 6. členu v točki 2.b je mleko definirano kot kravje mleko, proizvedeno v Skupnosti. Naknadno je v četrtem odstavku dela II, priloge XII te uredbe navedeno, da se izraz mleko lahko uporabi tudi v povezavi z besedo ali besedami, ki pomenijo vrsto, razred, izvor in/ali predvideno uporabo takega mleka, ali za opis fizične obdelave ali spremenjanja sestave mleka, pod pogojem, da je sprememba omejena na dodajanje in/ali odvzem naravnih sestavin mleka. Iz navedenega je razvidno, da na deklaracijo ni potrebno navesti vrste mleka, če gre za kravje mleko oziroma proizvod iz kravjega mleka. V kolikor gre za mleko ali proizvod iz ovčjega ali kozjega mleka, je potrebno na deklaracijo navesti poreklo oziroma vrsto mleka, iz katerega je proizvod.

Avtentičnost mleka drobnice ni direktno zakonsko predpisana. V primeru, da gre za potvorbe ali ponarejanje živil (npr. mleka, mlečnih izdelkov) oziroma za zavajanje potrošnika, je kršen 58. člen Zakona o kmetijstvu (2008) v povezavi z 8. in 16. členom Uredbe (ES) št. 178/2002, ki prepovedujejo ponarejanje živil in zavajanje potrošnikov.

Od preklica veljavnosti Pravilnika o kakovosti mleka, mlečnih izdelkov, sirih in čistih cepiv (1993) ne obstaja več predpis, ki bi tako natančno opredeljeval parametre glede mleka drobnice in njegove avtentičnosti.

## 2.1 POTVORBE MLEKA

Pod potvorbe mleka navadno razumemo potvarjanje z dodajanjem vode. To dejanje so obsojali in prvič kaznovali že v 15. stoletju v Franciji (Lásztity in sod., 2004). Danes potvorbe mleka z vodo odkrivamo in sankcioniramo v sklopu rednih analiz ob sprejemu mleka v mlekarno. Za ugotavljanje potvorbe uporabljajo zmrziščno točko mleka, njena mejna vrednost je v Sloveniji dogovorjena na  $-0,515^{\circ}\text{C}$ . Velja, da je mleko potvorjeno, če zmrziščna točka preseže mejno vrednost (Babnik in sod., 2010).

Potvorbe kozjega in ovčjega mleka in predvsem mlečnih izdelkov iz ovčjega in kozjega mleka s kravjim mlekom so finančno zanimive (Bramanti in sod., 2003; Roncada in sod., 2012). Tržna cena kravjega mleka je občutno nižja (Špajzer Šraj 2013; Poročilo ... , 2012) in že manjši dodatek kravjega mleka kozjemu ali ovčjemu mleku lahko doprinese (kratkoročne) finančne koristi. Zaradi zaščite potrošnikov in varovanja zdravja potrošnikov

z alergijami na proteine kravjega mleka je pomembno, da se avtentičnost kozjega in ovčjega mleka ter mlečnih izdelkov redno preverja.

Portal RASSF (angl. Rapid Alert System for Food and Feed) je namenjen hitremu obveščanju držav članic o tveganjih na področju živil in krme. Iz baze RASSF hitrih obvestil je razvidno, da so v zadnjih letih odkrili tri primere potvorbe kozjega ali ovčjega mleka s kravjim mlekom in en primer prisotnosti kravjih alergenov v mleku namenjenem alergikom (RASFF, 2000a; RASFF 2000b; RASFF 2005; RASFF 2009).

Colak in sod. (2006) so določili kravje mleko v 48 % vzorcev ovčjih sirov iz Turčije. Podobne odstotke potvorjenega kozjega mleka so določili tudi v Braziliji (Rodrigues in sod., 2012). Poljski raziskovalci so določali potvorbe kozjega mleka v razponu štirih zaporednih let. Ugotovili so, da sta bila leta 2005 stopnja potverb in volumenski dodatek kravjega mleka višja, kot leta 2009 (Dąbrowska in sod., 2010). Kravje mleko je bilo prisotno tudi v nekaterih vzorcih kozjih in ovčjih sirov iz Švice (Jürg in sod., 2013). Pri analiziranih ovčjih in kozjih sirih iz Italije je bilo kravje mleko prisotno pri skoraj 50 % vzorcev (Mininni in sod., 2009). V raziskavi potverb kozjih in ovčjih sirov iz Romunije so ugotovili, da je kravje mleko prisotno pri 79 % vzorcev kozjih sirov in pri 67 % vzorcev ovčjih sirov (Stănciu și Râpeanu, 2012).

Jürg in sod. (2013) so potvorbo kozjih in ovčjih sirov definirali kot več kot 5 % dodatek kravjega mleka. Pod 1 % kravjega mleka pa so definirali kot količine v sledovih.

Potvorbe kozjega in ovčjega mleka ter mlečnih izdelkov so v svetu resen problem. Za zaščito potrošnikov je potrebno vzpostaviti hitro in preprosto metodo, ki bi inšpekcijskim službam omogočila rutinsko kontrolo.

### **2.1.1 Hranilne vrednosti kozjega in ovčjega mleka in vpliv na zdravje**

Kravje, kozje in ovče mleko se ne razlikujejo le po organoleptičnih lastnostih. V preglednici 1 so zapisane hranilne vrednosti za posamezno vrsto mleka. Pri kravjem in kozjem mleku ni večjih razlik. Po vsebnosti beljakovin in maščobe ter energijski vrednosti pa izstopa ovče mleko (Jandal, 1996; Park in sod., 2007).

Preglednica 1: Hranilne vrednosti kozjega, ovčjega in kravjega mleka (Jandal, 1996: 178; Park in sod., 2007: 89)

SESTAVINA	MLEKO		
	Kozje	Ovčje	Kravje
<b>Maščoba (%)</b>	3,80	7,62	3,67
<b>Suha snov brez maščobe (%)</b>	8,68	10,33	9,02
<b>Laktoza (%)</b>	4,08	3,7	4,78
<b>Proteini (%)</b>	2,90	6,21	3,23
<b>Kazein (%)</b>	2,47	5,16	2,63
<b>Proteini sirotke (%)</b>	0,43	0,81	0,60
<b>Skupen pepel (%)</b>	0,79	0,90	0,73
<b>Kalcij (%)</b>	0,194	0,160	0,184
<b>Fosfor (%)</b>	0,270	0,145	0,235
<b>Klor (%)</b>	0,154	0,270	0,105
<b>Vitamin A (IU/g maščobe)</b>	39,00	25,00	21,00
<b>Vitamin B<sub>1</sub> (mg/100 mL)</b>	68,00	7,00	45,00
<b>Vitamin B12 (mg/100 mL)</b>	210,00	36,00	159,00
<b>Vitamin C (mg/100 mL)</b>	20,00	43,00	2,00
<b>Vitamin D (UI/g maščobe)</b>	0,70	0,18 µg/100g	2,00
<b>Energijska vrednost (kcal/100 mL)</b>	70,00	105	69,00

Čeprav slovenski potrošniki vedno bolj cenijo in uživajo kozje mleko, je v Sloveniji njegova poraba občutno nižja od porabe kravjega mleka. Uživanje kozjega mleka je bolj pogosto pri gurmanih in pri osebah, ki, tudi z izbiro hrane, skrbijo za svoje zdravstveno stanje. Kozje mleko je hitreje prebavljivo, ima s kravjim mlekom primerljivo hranilno vrednost, hkrati pa povzroča manj alergijskih reakcij. Za kozje mleko velja, da pozitivno vpliva na zdravje, saj vsebuje veliko vitaminov, izboljšuje koncentracijo, pomaga odpravljati črevesna obolenja, obolenja dihal in kožne bolezni (Gorjanc in Kompan, 2008a).

Ovče mleko je hitreje prebavljivo od kravjega mleka. Ker je bogato s kazeini, je izplen pri predelavi ovčjega mleka v sir skoraj dvakrat večji kot pri predelavi kravjega ali kozjega mleka. Med porabniki je znano po svojih zdravilnih učinkih, vsebuje veliko vitaminov, zaradi visoke vsebnosti kalcija ga priporočajo osebam z osteoporozo, preprečuje alergijske kožne reakcije in preprečuje alkoholno intoksikacijo (Gorjanc in Kompan, 2008b).

Posebne organoleptične lastnosti kozjega in ovčjega mleka so posledica visoke vsebnosti kaprilne in kaprinske maščobne kisline. V triacilgliceride vezane maščobne kisline ne vplivajo na vonj in okus mleka. Zaznamo le proste maščobne kisline, ki pa se pri kozjem mleku ob različnih mehanskih vplivih in posledični poškodbi membrane maščobnih kroglic hitro sprostijo. K še izrazitejši aromi »po kozah« lahko prispevata slaba higiena in hranjenje namolzenega mleka v bližini živali (Rogelj, 1996).

### **2.1.2 Alergeni v kravjem mleku**

Kravje mleko vsebuje preko 20 alergenih proteinov, ki lahko, pri nekaterih osebah, sprožijo preobčutljivostno reakcijo. Alergija na kravje mleko je nenormalen imunski odziv na proteine kravjega mleka in je posledica interakcije med enim ali več proteini kravjega mleka in imunoglobulini E (IgE). Najpogosteje alergijsko reakcijo sprožita kazein in  $\beta$ -laktoglobulin. Alergije na kravje mleko se pojavljajo pri 0,3 % do 7,5 % populacije in so pogostejše pri otrocih do četrtega leta starosti (El-Agamy, 2007). V kolikor se je alergija pojavila pri dojenih otrocih, se mora diete držati tudi mati. Alergija na kravje mleko pri 75 % izzveni v otroštvu, le v redkih primerih je dieta potrebna skozi celo življenje (Groetch, 2008). Wood in sod. (2012) so ugotovili, da se pri nekaterih otrocih ni sprožil imunski odziv na mleko, ki je bilo toplotno obdelano. Pri takih otrocih je bila višja verjetnost, da so alergije z odraseljanjem izzvenele. Znane so tudi intolerance na proteine kravjega mleka. To so reakcije na proteine kravjega mleka pri katerih ne posreduje imunski sistem (El-Agamy, 2007).

Odziv imunskega sistema na proteine kravjega mleka se kaže kot (El-Agamy, 2007):

- a. respiratorne težave (rinitis, piskajoči zvok pri dihanju, kronični kašelj, vnetje srednjega ušesa, zasluzenost pljuč), ki se pojavijo pri 10 % do 30 % obolenih;
- b. težave s kožo (atopični dermatitis, atopični ekzem, urtikarija, angioedem), ki se pojavijo pri 50 % obolenih;
- c. gastrointestinalne težave (bruhanje, pogosta diareja, močne bolečine v prebavilih in trebušni votlini, zaprtost, neprebavljenmaščoba v blatu, refluksna bolezen požiralnika), ki se pojavijo pri 50 % do 75 % obolenih;
- d. drugo (anafilaktični šok), ki se pojavi pri 12 % obolenih.

Dolgoletna praksa je, da osebam z alergijo na kravje mleko kot alternativo ponujajo kozje in ovče mleko ter mlečne izdelke (Roncada in sod., 2002; Haenlein, 2004; Bidat, 2010; Ribeiro A. C. in Ribeiro S. D. A., 2010). Po referenčni metodi Evropske unije za določanje kravjega mleka in kazeina v sirih iz ovčjega, kozjega ali bivoličjega mleka oz. v mešanicah ovčjega, kozjega in bivoličjega mleka (Commission ... 273/2008/EC) je spodnja meja detekcije 0,5 % kravjega mleka. Moneret-Vautrin in sod. (2012) so pripravili mešanice

kozjih proteinov z 0,5 % kravjih proteinov, v količini, ki ustreza 1 porciji sira. Pri otrocih z znano alergijo na proteine kravjega mleka so spremljali imunski odziv po zaužitju take mešanice. Takojšen imunski odziv se je pojavil pri 13,5 % pacientov. Iz njihovih rezultatov je jasno, da trenutna meja detekcije kravjega mleka ni dovolj za zaščito potrošnikov z alergijami na kravje mleko. Po drugi strani pa Sicherer (2001) navaja, da je pri osebah z alergijo na kravje mleko 92 % možnost, da imajo tudi alergijo na kozje mleko, česar Moneret-Vautrin in sod. (2012) v raziskavi niso upoštevali. Pri 24 od 26 otrok alergičnih na proteine kravjega mleka se je pojavil imunski odziv na proteine kravjega mleka in kozjega mleka. Vendar je bila za enak odziv potrebna večja količina kozjega mleka (povprečno 38 mL) od kravjega mleka (povprečno 8 mL), kar kaže na to, da so proteini kravjega mleka močnejši alergen od proteinov kozjega mleka (Bellioni-Businco in sod., 1999). Razlika v količini mleka, ki je potrebna za sprožitev alergijske reakcije, je lahko razlog, da nekateri kozje mleko priporočajo kot nadomestek kravjemu, drugi pa tej praksi odločno nasprotujejo.

### 2.1.3 Razlika v količini prieje mleka

Prijeja kozjega in ovčjega mleka je v primerjavi s kravjim mlekom v Sloveniji nižja (preglednica 2) (Poročilo ... , 2012). Podatki za količino mleka so preračunani na podlagi podatkov o mlečnosti (Stele, 2013). Iz preglednice 2 lahko vidimo, da je mlečnost koz in ovc, v primerjavi z mlečnostjo krav, zelo nizka.

Preglednica 2: Prijeja kravjega, kozjega in ovčjega mleka v Sloveniji v letih 2001 do 2011 (Poročilo ... , 2012: 127-128)

Vrsta mleka	Značilnost	Povprečje (2001-2011)
Kravje mleko	Št. molznic (konec leta)	121 338
	Povprečna mlečnost (kg/kravo)	5 377
	Namolzeno mleko (ton)	649 356
Kozje mleko	Št. mlečnih koz (konec leta)	5 170
	Povprečna mlečnost (kg/kozo)	282
	Namolzeno mleko (ton)	1 504
Ovčje mleko	Št. mlečnih ovc (konec leta)	4 387
	Povprečna mlečnost (kg/kozo)	103
	Namolzeno mleko (ton)	442

## 2.1.4 Cenovna razlika

Statistični urad Republike Slovenije podatke o cenah mleka zbira z mesečnimi statističnimi raziskavami o odkupu kmetijskih pridelkov in lesa in o prodaji kmetijskih pridelkov iz lastne pridelave. Odkupa ovčjega mleka niso zabeležili, odkup kozjega mleka pa je zabeležen v letih 2004, 2005 in 2010 do 2012 (Špajzer Šraj, 2013). Odkupna cena kozjega mleka je skoraj 7 krat višja od odkupne cene kravjega mleka (preglednica 3).

Preglednica 3: Odkupne cene kravjega, kozjega in ovčjega mleka v letih 2010, 2011 in 2012 (Špajzer Šraj, 2013; Poročilo ... , 2012).

Vrsta mleka	Odkupna cena (EUR)		
	2010	2011	2012
Kravje mleko	0,27	0,30	še ni podatkov
Kozje mleko	1,85	1,94	1,91
Ovčje mleko	ni odkupa	ni odkupa	ni odkupa

Pri eni izmed večjih slovenskih trgovskih verig imajo v ponudbi več vrst kozjega mleka. Kozje mleko prvega ponudnika je pakirano v 1 L embalaži, vsebuje 1,6 % m.m. in stane 1,78 € Drugi ponudnik ponuja kozje mleko v 2/3 L, ima 2,8 % m.m., 3,3 % beljakovin in stane 1,89 € Na spletni strani iste trgovske verige prodajajo kozje mleko še dveh dobaviteljev. Manjše je v 0,5 L embalaži in stane 1,15 € kozje mleko v 1 L embalaži pa 2,39 €/L. Povprečna cena kozjega mleka pri tem ponudniku je 2,35 €/L. Ovčjega mleka ne ponujajo.

S pomočjo povprečnih odkupnih cen zadnjih treh let za kozje in kravje mleko (preglednica 3 (Špajzer Šraj, 2013; Poročilo ... , 2012) smo preračunali potencialen dobiček rejca, ki se odloči za potvarjanje kozjega mleka s kravjim mlekom (preglednica 4). Zaradi nizkega dobička pri potvarjanju kozjega mleka z manjšimi koncentracijami kravjega mleka, pričakujemo, da bi bila v primeru potvorb vsebnost kravjega mleka v mešanici višja. Najverjetnejše bi se kmet odločil za najvišji odstotek kravjega mleka, ki ga potrošniki še niso sposobni senzorično zaznati in posledično zavrniti kot potvorjenega.

Preglednica 4: Dobiček pri potvorbah kozjega mleka s kravjim mlekom

Kozje mleko (%)	Kravje mleko (%)	Realna cena za liter mešanice (€)	Dodaten dobiček na liter mešanice (€)
100	0	1,90	0
95	5	1,82	0,08
90	10	1,74	0,16
80	20	1,58	0,32
70	30	1,42	0,48
60	40	1,25	0,65
50	50	1,09	0,81
0	100	0,29	1,62

### 2.1.5 Število somatskih celic

Somatske celice (SC) so sestavni del mleka zdravih živali, pri bolnih živalih pa je njihovo število povišano. Mednje prištevamo levkocite in odmrle celice notranjosti mlečne žleze. Normalno število somatskih celic v kravjem mleku se giblje med 100 000 do 150 000 SC/mL (Jeretina, 2012). Povišano število somatskih celic, predvsem levkocitov, v mleku bolnih živali je odgovor imunskega sistema na vdor bakterijskih povzročiteljev mastitisa v vime in so tako pomemben pokazatelj zdravstvenega stanja živali. Mejna vrednost somatskih celic (SC) v kravjem mleku je postavljena na 400 000 SC/mL (Pravilnik o veterinarskih ..., 2004). Kravje mleko, ki vsebuje več kot 400 000 SC/mL ni primerno za uživanje in ga je potrebno uničiti (Veselko Vinko, 2012). Pri kozjem mleku se vsebnost SC giblje od 750 000 do 5,4 milijona SC/mL, ovče mleko pa se po številu SC od kravjega mleka ne razlikuje toliko in znaša med 500 000 in 1 000 000 SC/mL (Park in Haenlein, 2006).

Do leta 2007 analiza števila somatskih celic (ŠSC) pri kravjem mleku za rejce ni bila obvezna. Po tem letu je bilo v okviru skupnega temeljnega rejskega programa na področju govedoreje sprejeto, da se poleg osnovne analize kravjega mleka analizira tudi ŠSC (Jeretina, 2013). Analiza ŠSC pa pri drobnici še vedno ni obvezna in jo rejci naročijo, običajno ob prvi kontroli (Kompan, 2013). Vrednosti v prilogah A, B in C so torej samo približki realnega stanja ŠSC pri kravjem, kozjem in ovčjem mleku v Sloveniji. A kljub temu lahko jasno vidimo, da je število somatskih celic zelo različno. Tako pri kravah, kot pri kozah in ovcah, je razpon števila somatskih celic zelo velik. Povprečne vrednosti (aritmetična sredina) ter najpogostejše vrednosti (modus) so pri živalih različne in pri kravjem mleku občutno nižje. Porazdelitev števila somatskih celic ni normalna, podatke smo pred analizo logaritmirali in tako zagotovili Gausovo porazdelitev (Jeretina, 2013).

Izračunane vrednosti smo preračunali nazaj, tako da smo jih antilogaritmirali glede na objave Parkin in sod. (1990) in Yang (2012).

Na število somatskih celic v mleku vpliva vrsta dejavnikov, kot so pasma, genotip, način vzreje živali, starost živali, stadij laktacije, količina mleka, način in postopek molže, prehrana, presušitev, stres, vnetni procesi in poškodbe vimena ter zgodovina bolezni in mikrobiološka slika hleva (Jeretina, 2011).

## 2.2 DOLOČANJE POTVORB MLEKA

Referenčna metoda EU za odkrivanje kravjega mleka in kazeina v sirih iz ovčjega, kozjega ali bivoličjega mleka ter v mešanicah ovčjega, kozjega in bivoličjega mleka je podana z regulativo 273/2008/EC (Commission ... 273/2008/EC). Je kvalitativna metoda pri kateri odkrivanje potvorb temelji na izoelektričnem fokusiranju  $\gamma$ -kazeinov. Za izvedbo metode potrebujemo standardne vzorce, ki jih po navodilih pripravimo sami ali jih naročimo pri Inštitutu za referenčne materiale in meritve (Geel, Belgija). Standardni vzorci kozjega in ovčjega mleka z dodatkom 0 % ali 1 % kravjega mleka so koagulirani s sirilom. Prisotnost kravjega mleka se potrdi ali ovrže z vizualno ali denzimetrično primerjavo proteinskih slik neznanega vzorca in standardnih referenčnih vzorcev. Spodnja meja zaznave je 0,5 % kravjega mleka, a se v praksi metoda uporablja za ugotavljanje potvorb nad in vključno z 1 % dodanega kravjega mleka. Regulativa dovoljuje uporabo drugih metod za detekcijo kazeina kravjega mleka, ki pa morajo ustrezati naslednjim pogojem (Commission ... 273/2008/EC):

- Meja detekcije mora biti 0,5 % kravjega mleka ali nižja.
- Ne smejo se pojaviti lažno pozitivni vzorci (v primeru, da tega ni mogoče izključiti, je potrebno pri pozitivnih vzorcih izvesti še referenčno metodo).
- Detekcija kravjega mleka mora biti možna tudi pri vzorcih sirov, ki so zoreli dlje časa.

V strokovnih objavah zasledimo različne metode za kvalitativno in kvantitativno določanje potvorb mleka.

Potvorbe kozjega mleka s kravjim mlekom so uspešno določili s pomočjo elektronskega jezika (Dias in sod., 2009). Nekateri avtorji so encimsko imunski test ELISA potrdili kot uspešno metodo za odkrivanje potvorb ovčjega in kozjega mleka s kravjim mlekom (Antalašić, 2006; Hurley in sod., 2006; López-Calleja in sod., 2007a).

Mayer in sodelavci (2012) so potvorbe mleka določali s SDS-PAGE elektroforezo, a so ugotovili, da v določenih primerih lahko pride do lažno pozitivnih rezultatov. Vendar je alternativna detekcija na nivoju proteinov kljub temu mogoča, saj se je nativna-PAGE

elektroforeza izkazala za uspešno pri določanju odstotka kravjega mleka v mešanicah (Pesic in sod., 2011).

Potvorbe bivoličjega mleka in mocarele s kravjim mlekom so odkrivali z detekcijo prisotnosti  $\beta$ -laktoglobulinov. Določali so jih s tekočinsko kromatografijo spojeno z masno spektroskopijo (LC-MS) (Czerwenka in sod., 2010). Potvorbe kozjih in ovčjih sirov s kravjim mlekom je mogoče določiti z metodo HPLC (Mayer in sod., 1997) in hidrofobno interakcijsko kromatografijo (HIC) (Bramanti in sod., 2003). Ugotavljanje potvorb je možno tudi s plinsko-tekočinsko kromatografijo maščobnih kislin (Iverson in Sheppard, 1989).

Objave López-Calleja in sodelavcev (2004; 2005; 2007a; 2007b; 2007c) so spodbudile razvoj metod za kvantifikacijo kravjega mleka s PCR in PCR v realnem času.

### **2.2.1 Odkrivanje potvorb mleka s PCR in PCR v realnem času**

Po nam dosegljivih podatkih je prva objava, ki opisuje odkrivanje potvorb mleka s PCR, iz leta 1997. Plath in sodelavci (1997) so izolirali DNA iz mešanic mleka in jo pomnožili z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za kravo in kozo, ter pomnožke ločili in določili z metodo RFLP. Meja detekcije kravjega mleka je bila 0,5 %. Podoben pristop so leta 2000 uporabili tudi Branciari in sod. (2000) za določanje potvorb sirov mocarela in feta s kravjim mlekom.

Bania in sod. (2001) so v reakciji PCR z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za kravo, uspešno pomnožili DNA, izolirano iz mešanic kozjega mleka s kravjim mlekom. Pomnožek, velik 274 bp, specifičen za kravo, so določili z elektroforezo. Z izbiro pomnožka, specifičnega za kravo, so se izognili obdelavi PCR pomnožka z restriktionskimi encimi in skrajšali ter poenostavili metodo detekcije kravjega mleka. Določili so do 1 mL kravjega mleka v litru kozjega mleka, meja detekcije je bila 0,1 % kravjega mleka.

López-Calleja in sod. (2004) so iz mešanic kravjega mleka s kozjim ter ovčjim mlekom izolirali DNA in jo pomnožili s PCR z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za kravo. Tudi v njihovi raziskavi se je izkazalo, da so pomnožke lahko uspešno detektirali z elektroforezo. Meja detekcije je bila 0,1 % dodatka kravjega mleka. Svoje delo so nadaljevali in izdelali tudi začetne oligonukleotide, specifične za koze ter za ovce. Uporabili so jih za izvedbo paralelnega PCR, ki je služil kot kontrolna reakcija (López-Calleja in sod., 2005).

Kvantitativno določitev kravjega mleka v ovčjem mleku so López-Calleja in sod. (2007b) izvedli s praktično umeritveno krivuljo, narejeno s standardno DNA krave. Kvantifikacija je bila uspešna do 0,4 % kravjega mleka v mešanici. DNA so izolirali iz mešanic mleka (0,5 %, 2 %; 5 % in 10 % kravjega mleka) s komercialnim kompletom Wizard DNA Clean-up System (Promega).

Začetne oligonukleotide in sondi so izdelali na podlagi sekvenc 12S rRNA genov krave, bivola, koze in ovce. Izdelali so dva kompleta začetnih oligonukleotidov in sond, z enim so določali vsebnost kravje DNA, z drugim pa skupno vsebnost sesalske DNA. Pomnožek, specifičen za kravo, je bil velik 252 bp. Pri specifičnem določanju krave so uporabili začetna oligonukleotida in sondi (López-Calleja in sod., 2007b):

- a. 12STAQMANFWM: 5-AAA GGA CTT GGC GGT GCT T-3 (300 nM),
- b. 12STAQMANBT: 5-TGG TTT CAT AAT AAC TTT CGC GCT-3 (900 nM),
- c. 12SPROBE: 5-FAM-TAG AGG AGC CTG TTC TAT AAT CGA TAA ACC CCG-TAMRA-3 (200 nM).

Pomnožek, dobljen pri specifičnem določanju sesalcev, je bil velik 428 bp. López-Calleja in sod. (2007b) so uporabili enak začetni oligonukleotid forward (12STAQMANFWM) in enako sondi (12SPROBE) z enako koncentracijo, kot pri specifičnem določanju krave, ter drugačen začetni oligonukleotid reverse (12STAQMANREVM):

- a. 12STAQMANFWM: 5-AAA GGA CTT GGC GGT GCT T-3 (300 nM),
- b. 12STAQMANREVM: 5-TCC AGT ATG CTT ACC TTG TTA CGA CTT-3 (900 nM)
- c. 12SPROBE: 5-FAM-TAG AGG AGC CTG TTC TAT AAT CGA TAA ACC CCG-TAMRA-3 (200 nM).

Reakcijska mešanica volumna 25 µL je vsebovala opisane začetne oligonukleotide in sondi, TaqMan PCR mešanico (ang. Master Mix) ter 10 ng izolirane DNA. DNA so pomnoževali z ABI PRISM 7700 s časovno-temperaturnim programom: 2 min 50 °C, 10 min 95 °C, sledilo je 40 ciklov s 15 s denaturacije DNA pri 95 °C, 1 minuto prileganja začetnih oligonukleotidov in podaljševanja verige pri 60 °C (López-Calleja in sod., 2007b).

Standardno DNA krave so López-Calleja in sod. (2007b) pripravili s pomnožkom, specifičnim za sesalce, ki so ga pridobili s pomnoževanjem kravje DNA z začetnima oligonukleotidoma 12STAQMANFWM in 12STAQMANBT. Pomnožek so očistili in vstavili v plazmid s komercialnim kompleтом pGEM-T Easy Vector System II (Promega). S standardno DNA krave so pripravili umeritveni krivulji, na podlagi katerih so določali

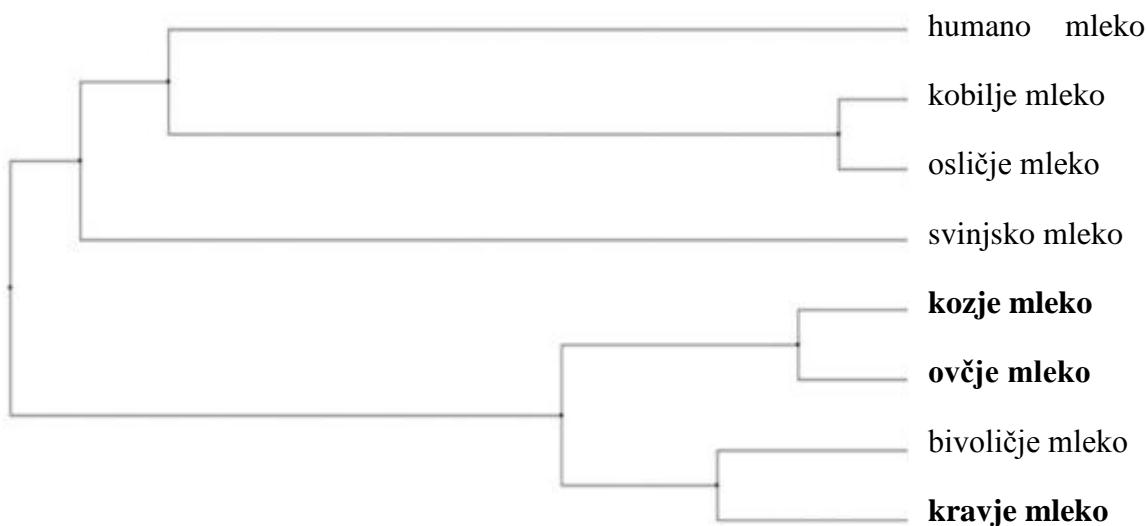
vsebnost kravjega mleka v mešanicah kozjega mleka s kravjim mlekom ter ovčjega mleka s kravjim mlekom.

Vsebnost kravjega mleka so določali na podlagi enačbe (1):

Podrobne raziskave na proteinih mleka potekajo že preko 60 let. Vključujejo njihovo detekcijo, identifikacijo in karakterizacijo (O'Donnell in sod., 2004). Velik razvoj pa je proteomika mleka doživela v zadnjih 10 letih (Roncada in sod., 2012). Karakterizacija proteinov mleka različnih vrst živali bi lahko spodbudila hitrejši razvoj metod za določanje potvorb mleka na ravni proteinov (Manso in sod., 2005). S filogenetskega drevesa (slika 1), ki prikazuje povprečne razdalje glede na homolognost primarne strukture  $\kappa$ -kazeina, lahko vidimo, da so si kozji in ovčji  $\kappa$ -kazeini zelo sorodni, kravji pa ne toliko. S pomočjo analize proteinov lahko določimo izvor mleka in potrdimo ali ovržemo potvorbo z mlekom druge vrste (Roncada in sod., 2012).

Z ločevanjem proteinov v samo eni dimenziji (npr. s SDS-PAGE elektroforezo) je težko primerjati in ločiti proteinske slike mleka različnih živali.

Proteinske slike različnih živali, pripravljene z elektroforezo v eni dimenziji (npr. SDS-PAGE elektroforeza), so podobne. Do razlik prihaja predvsem v razmerjih v vsebnosti določenih proteinov. Za jasnejšo primerjavo proteinskih slik je potrebno izvesti elektroforezo v dveh dimenzijah ali uporabiti druge, modernejše metode (Kim in Jimenez-Flores, 1994).



Slika 1: Filogenetsko drevo povprečne oddaljenosti v % homolognosti primarne strukture  $\kappa$ -kazeinov (Roncada in sod., 2012)

Proteinske slike 2-D elektroforeze različnih vrst mleka sta primerjala in raziskovala Kim in Jimenez-Flores (1994). Ugotovila sta, da so proteinske slike kravjega in kozjega mleka podobne, razen v primeru  $\alpha_{s1}$ -kazeina, katerega prisotnost sta potrdila le pri vzorcih kravjega mleka. Med vzorci mleka drugih raziskovanih živali so bile razlike večje.

Chianese in sod. (1990) so z 2-D elektroforezo določali potvorbe bivoličje mocarele s kravjim mlekom. Zaradi razgradnje proteinov v zrelih sirih so proteinske slike takih vzorcev zelo kompleksne, pogosto pride do prekrivanja točk in določitev potvorbe je otežena. Da bi izboljšali odziv metode in povečali občutljivost, so potvorbe odkrivali z 2-D elektroforezo. Kot prvo dimenzijo so uporabili poliakrilamidno agarozno gelsko elektroforezo (PAAGE), kot drugo dimenzijo pa poliakrilamidno gelsko izoelektrično fokusiranje (PAGIF). Meja detekcije je bila 10 % kravjega mleka v bivoličjem mleku, ki je bilo uporabljen za izdelavo sira. V primeru, da so na gel nanesli 1,5 krat ali 2 krat večjo koncentracijo proteinov od običajne, se je meja detekcije znižala na 2,5 %. Za izvedbo 2-D elektroforeze je potrebno veliko dela in časa, zato avtorji navajajo, da je metoda primerna kot kontrolna metoda in ne za rutinsko uporabo.

Na sestavo proteinov in peptidov v mleku ter s tem na proteinsko sliko vplivajo številni faktorji. Pomembnejši so vrsta živali, pasma živali, zdravje živali, obdobje laktacije, tip krme, sezonske spremembe in pogostost molže (Lindmark-Måansson in sod., 2005). Povišano število somatskih celic je povezano s povišano proteolitično aktivnostjo in z razgradnjo kazeinov v mleku (Verdi in sod., 1987). Do podobnih spoznanj so prišli tudi Lindmark-Måansson in sod. (2005), ki so ugotovili, da število kratkih peptidov narašča s številom somatskih celic v mleku. Poleg tega so siri med zorenjem podvrženi delovanju mikrobnih encimov, ki razgrajujejo proteine in peptide (Park in Jin, 1998).

### 2.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

Letos mineva 30 let od prvega uspešnega pomnoževanja DNA z verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Ta dosežek je leta 1983 uspel Mullis in sodelavcem, ko so v prakso prenesli idejno zasnovo Planet in Khorana iz leta 1974 (Fairchild in sod., 2006). Velik potencial in hiter razvoj PCR je omogočil, da se je metoda uveljavila in postala nepogrešljiva, tako v raziskovalnih vodah, kot tudi v rutinskih analizah.

Matrična DNA, začetek PCR																			
aaa	gga	ctt	ggc	ggt	gct	tta	tat	c...a	tca	agc	acg	aaa	gtt	att	atg	aaa	cca		
ttt	cct	gaa	cca	cca	cga	aat	ata	g...t	agt	tgc	tgc	ttt	caa	taa	tac	ttt	ggt		
1 dvojna vijačnica																			

CIKEL 1																			
<b>Razpiranje DNA</b>																			
aaa gga ctt ggc ggt gct tta tat c...a tca agc acg aaa gtt att atg aaa cca																			
ttt cct gaa cca cca cga aat ata g...t agt tgc tgc ttt caa taa tac ttt ggt																			
<b>Prileganje začetnih oligonukleotidov</b>																			
aaa gga ctt ggc ggt gct tta tat c...a tca agc acg aaa gtt att atg aaa cca																			
 tgc tgc ttt caa taa tac ttt ggt																			
aaa gga ctt ggc ggt gct t ttt cct gaa cca cca cga aat ata g...t agt tgc tgc ttt caa taa tac ttt ggt																			
<b>Podaljševanje</b>																			
aaa gga ctt ggc ggt gct tta tat c...a tca agc acg aaa gtt att atg aaa cca																			
 gt tgc tgc ttt caa taa tac ttt ggt																			
aaa gga ctt ggc ggt gct tt ttt cct gaa cca cca cga aat ata g...t agt tgc tgc ttt caa taa tac ttt ggt																			
<b>Podaljšana DNA</b>																			
aaa gga ctt ggc ggt gct tta tat c...a tca agc acg aaa gtt att atg aaa cca																			
 tgc tgc ttt caa taa tac ttt ggt																			
aaa gga ctt ggc ggt gct tta tat c...a tca agc acg aaa gtt att atg aaa cca																			
 tgc tgc ttt caa taa tac ttt ggt																			
2 dvojni vijačnici																			

CIKEL 2																			
4 dvojne vijačnice																			

CIKEL 3																			
8 dvojnih vijačnic																			

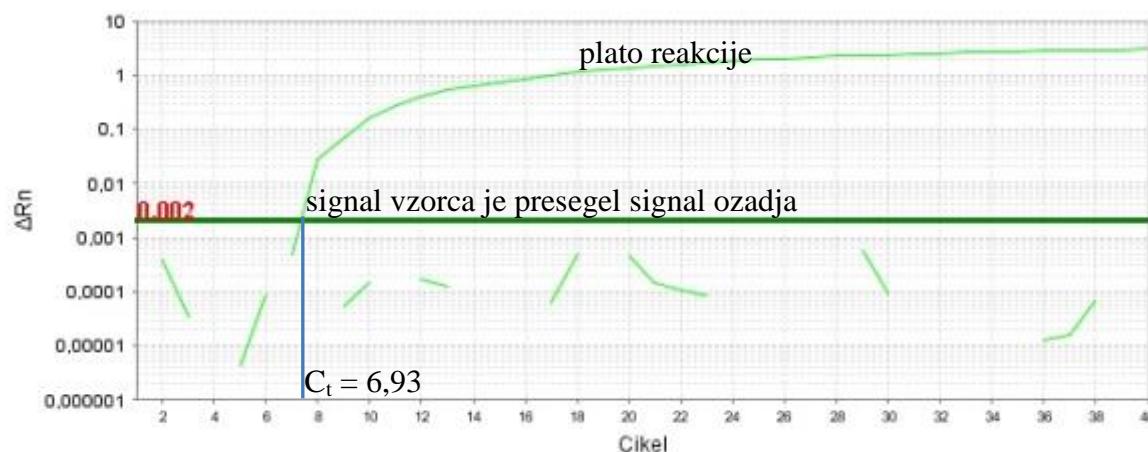
In tako dalje ...

Slika 2: Prikaz pomnoževanja DNA s PCR na primeru kravje DNA (prirejeno po López-Calleja in sod., 2007b)

**Legenda:** a: adenin; c: citozin; g: gvanin; t: timin; |: vodikova vez med nukleotidi; : DNA-polimeraza; modra in rdeča: začetni oligonukleotid

S PCR lahko *in vitro* pomnožujemo izbrani odsek DNA (slika 2). Za izvedbo PCR potrebujemo v pufru raztopljeno matrično DNA, začetne oligonukleotide, nukleotide (dNTP) A (adenin), C (citozin), G (gvanin) in T (timin), DNA-polimerazo ter Mg<sup>+</sup> ali Mn<sup>+</sup> ione, ki delujejo kot katalizator za polimerazo. DNA pomnožujemo skozi več časovno/temperaturnih ciklov. Prvi korak je taljenje dvojne vijačnice DNA (10 s do 30 s

pri 92 °C do 96 °C) (Klančnik in sod., 2012). Sledi prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje DNA (30 s do 60 s pri 60 °C). Po zaključenem podaljševanju DNA iz ene dvojne vijačnice DNA dobimo dve identični dvojni vijačnici DNA. Z dvigom temperature ju ponovno razpremo in ponovimo prileganje začetnih oligonukleotidov ter podaljševanje. Da zagotovimo zadostno količino DNA za detekcijo, temperaturno/časovne cikle ponovimo 30 do 45 krat. V primeru 100 % učinkovitosti PCR ( $E = 100\%$ ;  $E = 1$ ) količina DNA raste eksponentno (enačba 2) (Applied Biosystems, 2012).



Slika 3: Primer krivulje pomnoževanja DNA, ki ga izriše naprava PCR

**Legenda:**  $\Delta Rn$ : normaliziran fluorescenčni signal;  $C_t$ : cikel meje določanja

Vzorec, ki prej doseže vrednost  $C_t$  oz. ima nižjo vrednost  $C_t$ , je imel višjo začetno koncentracijo tarčne DNA. Pomnoževanje DNA poteka eksponentno, vse dokler ne začne primanjkovati reagentov. Posledično se hitrost pomnoževanja približuje minimumu in krivulja fluorescence preneha naraščati, pravimo, da je reakcija dosegala plato (slika 3). Na določitev vrednosti  $C_t$  vpliva tudi meja minimalne spremembe fluorescence (angl. threshold) (slika 3: 0,002). Programi za vodenje naprave PCR in analizo rezultatov mejo določijo sami, omogočajo pa tudi ročno nastavitev, ki jo uporabljamo, če želimo med seboj primerjati različne PCR, ki niso potekale sočasno.

Problem barvil, ki se vežejo med dvovijačno DNA, je njihova nespecifičnost. Med PCR lahko nastajajo nespecifični pomnožki, ki tudi prispevajo k dvigu signala fosforecence. Da bi se izognili lažno pozitivnim rezultatom ali napačni kvantifikaciji začetne koncentracije tarčne DNA, so uvedli določanje temperature taljenja pomnožkov ( $T_m$ ). Po končanem pomnoževanju DNA naprava PCR zvišuje temperaturo z navadno 60 °C na navadno 95 °C in meri signal fluorescence. V primeru, da pri vzorcu zaznamo več padcev fluorescence, pomeni, da imamo prisotne nespecifične pomnožke. Tudi nespecifični pomnožki so prispevali k fluorescenci vzorca in določena vrednost  $C_t$  je bila napačno nižja. Nespecifičnim pomnožkom se izognemo s pravilno izbiro začetnih oligonukleotidov (Klančnik in sod., 2012).

Še elegantnejše pa se signalu nespecifičnih pomnožkov izognemo z uporabo sonde. Te so komplementarne specifičnemu kratkemu odseku DNA med obema začetnima oligonukleotidoma in se na matrično DNA vežejo v času prileganja začetnih oligonukleotidov. Na sondi sta vezani signalni (najpogosteje FAM (fluorescin)) in

zaviralna molekula (najpogosteje TAMRA (tetrametilrodamin)) (Tuomi in sod., 2010). Zaradi delovanja DNA-polimeraze se sonda razgradi, signalna in zaviralna molekula se razcepita in signalna molekula prične fluorescirati. Vrednost  $C_t$ , ki jo določimo pri istih vzorcih z barvilom kot je SYBR Green I, je navadno nižja od vrednosti  $C_t$ , ki jo določimo z uporabo sond. Razlika je vidna tudi z grafa fluorescence v odvisnosti od  $C_t$ , razdalja med bazno linijo in platojem krivulje je pri uporabi sonde manjša (Tuomi in sod., 2010).

Učinkovitost PCR (E) (enačba 3) uporabljam za vrednotenje rezultatov pri kvantitativnem PCR. Izračunamo jo iz standardne krivulje. Učinkovitost PCR je 100 %, če se število pomnožkov iz cikla v cikel eksponentno povečuje (Applied Biosystems, 2012).

prisoten termolabilen plazmin, ki v določenih koncentracijah inhibira PCR (Powell in sod., 1994).

Prisotnost inhibitorjev in s tem potencial izolirane DNA za uspešno pomnoževanje s PCR in PCR v realnem času lahko ocenimo spektrofotometrično. Nukleinske kisline absorbirajo svetlobo pri valovni dolžini 260 nm. Proteini, ki lahko ovirajo PCR, absorbirajo pri 280 nm. Razmerje absorbanc pri 260 in pri 280 je pokazatelj čistosti vzorca, za uspešno pomnoževanje DNA je pomembno, da je to razmerje višje od 1,8 (Understanding and measuring ... , 2011). Nekateri inhibitorji PCR absorbirajo svetlobo pri 230 nm. Vzorci, pri katerih je razmerje absorbiranih valovnih dolžin 260/230 višje od 1,8, so primerni za pomnoževanje s PCR (Luebbehusen, 2006; Understanding and measuring ... , 2011).

### **2.3.1 Napotki za oblikovanje začetnih oligonukleotidov in sonde**

Pri oblikovanju in izbiri začetnih oligonukleotidov in sonde moramo biti, poleg njihove specifičnosti, pozorni na vrsto drugih parametrov.

Začetni oligonukleotidi (Applied Biosystems, 2005; Ann Van Hee, 2013):

- a. Razmerje nukleotidov G/C naj bo med 80 in 30 %.
- b. Ne smejo vsebovati 4 zaporednih nukleotidov G, problematični so lahko tudi ostali nukleotidi.
- c. Temperatura taljenja začetnih oligonukleotidov naj bo med 58 °C in 60 °C.
- d. Zadnjih 5 nukleotidov na koncu 3' naj vsebuje največ 2 G in/ali C nukleotida.
- e. Dolžina (bp) naj bo kratka.
- f. Začetna oligonukleotida naj bi bila enake dolžine.

Sonda (Applied Biosystems, 2005):

- a. Razmerje nukleotidov G/C naj bo med 80 in 30 %.
- b. Ne sme vsebovati 4 zaporednih nukleotidov G, problematični so lahko tudi ostali nukleotidi.
- c. Temperatura taljenja sonde naj bo med 68 °C in 70 °C.
- d. Na koncu 5' ne sme biti nukleotida G.
- e. Sodna mora biti čim bolj kratka, a ne krajša od 13 bp.

Pomnožek (Applied Biosystems, 2005):

- a. Pomnožek mora biti velik med 50 in 150 bp.
- b. Mora biti dovolj velik, da se začetni oligonukleotidi in sonda ne prekrivajo.

## 2.4 PROTEOMSKA ANALIZA

Proteomika je veda, ki se ukvarja z določanjem in spremeljanjem izražanja proteinov. Prvi korak je ločevanje proteinskega vzorca na posamezne komponente, ki jih nato lahko identificiramo. Proteomika se uporablja v raziskavah vzorcev, ki imajo bogato in kompleksno vsebnost proteinov; npr. za karakterizacijo proteinov mleka (Manso in sod., 2005).

Znanih je več tehnik ločevanja proteinskih vzorcev. V grobem se delijo na tekočinsko kromatografijo (LC) in poliakrilamidno gelsko elektroforezo (PAGE), ki vključuje več pristopov (Križaj, 2008).

Poliakrilamidna gelska elektroforeza (PAGE) omogoča ločevanje proteinov v poliakrilamidnih gelih:

- a. nativna PAGE elektroforeza, ki temelji na ločevanju proteinov zaradi njihovega naboja;
- b. izoelektrično fokusiranje, ki proteine razporedi glede na vrednost njihove izoelektrične točke;
- c. SDS-PAGE elektroforeza, pri kateri z natrijevim dodecil sulfatom (SDS) izenačimo naboj in obliko proteinov ter vzorec ločimo izključno po masi;
- d. dvo-dimenzionalna PAGE elektroforeza, ki združuje izoelektrično fokusiranje v prvem koraku ločevanja in SDS-PAGE elektroforezo v drugem koraku. (Križaj, 2008)

### 2.4.1 SDS-PAGE elektroforeza

Pred izvedbo SDS-PAGE elektroforeze proteine vzorca obdelamo z SDS. Ta povzroči, da se proteini razprejo in zravnajo ter enakomerno obdajo z molekulami SDS. S tem izničimo vpliv oblike in naboja proteina na ločevanje v gelu. SDS-PAGE elektroforeza nam omogoča, da proteine ločimo po masi (Križaj, 2008; Shi in Jackowski, 1998).

### 2.4.2 2-D elektroforeza

Dvodimenzionalno gelsko elektroforezo (2-D elektroforeza) je razvil O'Farrel leta 1975, tehniko pa so leta 1992 Görg in sod. nadgradili na tak nivo, kot ga poznamo in uporabljamo danes. 2-D elektroforeza je prva tehnika v proteomiki, ki je za večje število vzorcev omogočila ločevanje in kvantifikacijo proteinov (Barle in sod., 2008; Fonovič, 2008). Vzorec proteinov ločimo v dveh dimenzijah, najprej z izoelektričnim fokusiranjem proteine ločimo po izoelektrični točki glede na izbrani pH gradient. Za izoelektrično fokusiranje pogosto uporabljamo komercialne trakove z imobiliziranim pH gradientom (IPG trakove) (Komel in sod., 2008). Nato, pravokotno na prvo ločevanje, sledi izvedba

SDS-PAGE elektroforeze, ki proteine loči še po masi od 8 kDa do 150 kDa (O'Donnell in sod., 2004). Na gelu ločene proteine detektiramo tako, da jih obarvamo. Najpogosteje je v uporabi barvanje z barvilkom Coomassie modro. Nižje koncentracije proteinov lahko zaznamo z občutljivejšimi tehnikami barvanja s koloidnim srebrom, fluorescenčnimi barvili ali z detekcijo radioaktivno označenih proteinov (Križaj, 2008).

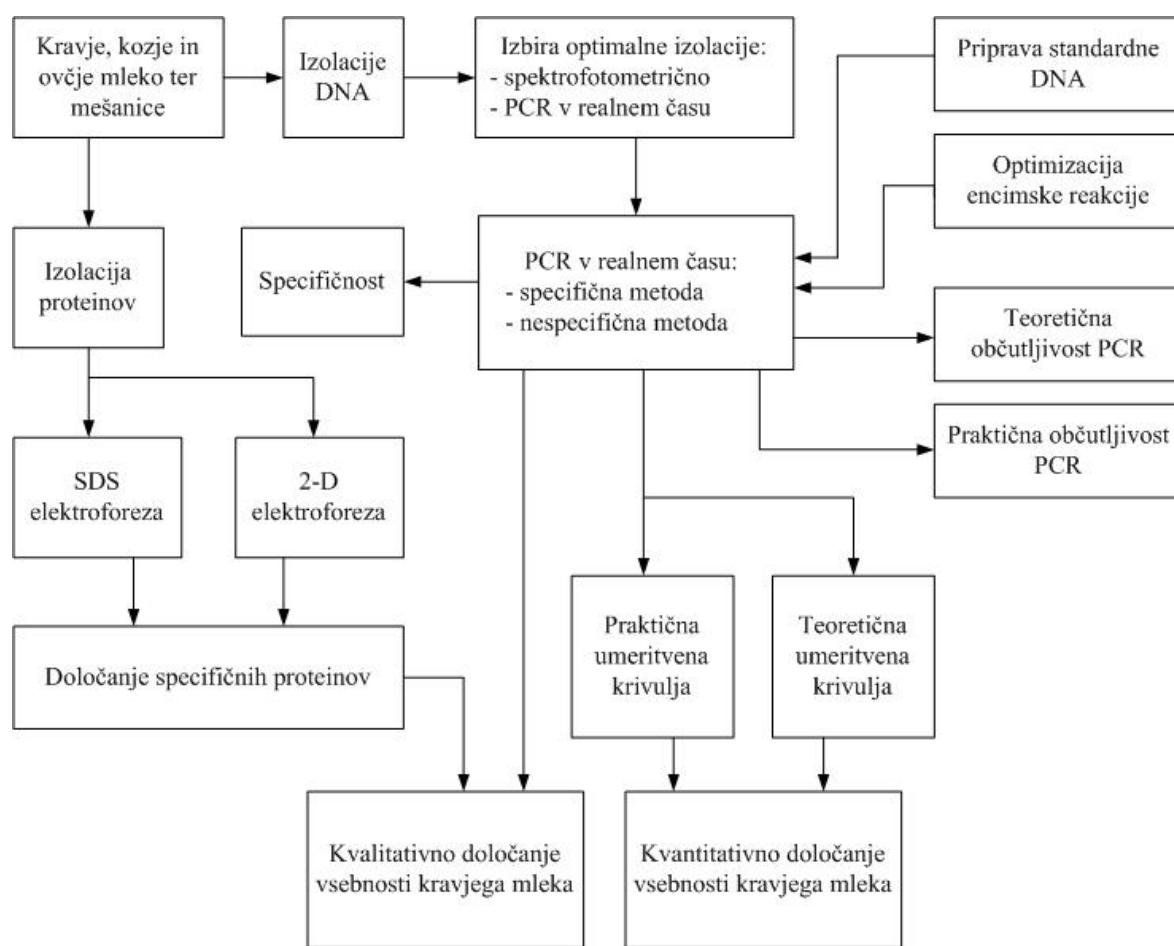
Za identifikacijo tako ločenih proteinov se pogosto uporablja masna spektrometrija (MALDI-TOF), ki temelji na določanju prstnega odtisa mase peptidov. Z 2-D elektroforezo ločen protein, izoliran iz gela s specifično proteazo, razgradijo na peptide in določijo njihovo maso. Vsak protein ima značilno peptidno sliko na podlagi katere lahko iz baze podatkov določijo kateri protein smo analizirali. Novejša metoda identifikacije proteinov je tandemkska masna spektrometrija (MS/MS) (Fonovič, 2008). 2-D elektroforeza in identifikacija ločenih proteinov z masno spektrometrijo je pogosto orodje pri raziskavah v prehrani (Jamnik in Raspor, 2008).

Za izvedbo 2-D elektroforeze je potrebno dosti časa, dela in previdnosti zaradi nevarnosti kontaminacije gela s keratinom (Fonovič, 2008).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 POTEK EKSPERIMENTALNEGA DELA

Shema eksperimentalnega dela je prikazana na sliki 4. Vidimo lahko, da smo se že v začetku eksperimentalnega dela odločili, da poskušamo določati potvorbe kozjega ozziroma ovčjega mleka s kravjim mlekom z dvema pristopoma, na ravni DNA in na ravni proteinov.



Slika 4: Shema eksperimentalnega dela

#### 3.2 MATERIAL

##### 3.2.1 Vzorci

Uporabili smo naslednje vzorce:

- surovo kravje mleko (tržnica Koseze),
- surovo kravje mleko (Volarje),
- surovo kravje mleko (kmetija Potokar),
- surovo kozje mleko (tržnica Koseze),

- surovo kozje mleko (planina Mangart), lastno vzorčenje,
- surovo ovčje mleko (tržnica Koseze),
- surovo ovčje mleko (planina Mangart), lastno vzorčenje,
- pasterizirano kravje mleko (tržnica Koseze),
- sterilizirano kravje mleko (tržnica Koseze),
- UHT kravje mleko, polnomastno (Milfina),
- UHT kravje mleko, polnomastno (Alpsko mleko),
- UHT kravje mleko, polnomastno (Pomursko mleko),
- UHT kravje mleko, polnomastno z dodatkom vitaminov (Pomursko mleko),
- UHT kravje mleko, polposneto (Milfina),
- sirotka 1 iz kravjega mleka (tržnica Koseze),
- sirotka 2 kravjega mleka (tržnica Koseze),
- pinjenec 1 iz kravjega mleka (tržnica Koseze),
- pinjenec 2 iz kravjega mleka (tržnica Koseze).

### 3.2.2 Laboratorijska oprema

Za izvedbo magistrskega dela smo uporabili različno laboratorijsko opremo:

- standarden laboratorijski material (steklovino, steklene pipete z nastavki za pipetiranje, spatule, žlice ...),
- pipete (0,5 – 10 µL; 10 – 100 µL; 100 – 1000 µL) in ustrezne nastavke za pipetiranje (Eppendorf, Francija),
- mikrocentrifugirke (1,5 mL; 2 mL) in mikrotitrski ploščice (Eppendorf, Francija),
- vrtinčno mešalo TTS2 (Yellowline, Nemčija),
- razbijalec celic BBX24 Bullet Blender (Next Advance, ZDA)
- centrifugo Mini Spin PLUS (Eppendorf, Francija)
- tehnično Monobloc PB1052-S (Mettler Toledo, Švica),
- analitsko tehnično AB204-S (Mettler Toledo, Švica),
- vodno kopel WB-30 (Kambič, Slovenija),
- hladilnik (Gorenje, Slovenija),
- zamrzovalni skrinji (-20 °C: Gorenje, Slovenija in -80 °C: Hetra Ultra Freeze, ZDA),
- PCR v realnem času ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, ZDA),
- spektrofotometer LAMBDA Bio (Perkin Elmer, ZDA),
- merilno celico Hellma TrayCell (Perkin Elmer, Nemčija),
- čitalec mikrotitrskih plošč Safire 2 (Tecan, Avstrija),
- mikrovalovno pečico (Candy, Velika Britanija),
- ultrazvočno kopel SONIS (Iskra PIO, Slovenija),

- podstavek z režami za rehidracijo trakov z imobiliziranim pH gradientom (GE Healthcare, Švedska),
- steklene plošče za vlivanje gelov (GE Healthcare, Švedska),
- sistem za elektroforezo Multiphor II (GE Healthcare, Švedska),
- vertikalni diskontinuirni elektroforetski sistem SE 600 (Hoeffer Scientific Instruments),
- napajalnik EPS 3501 XL (GE Healthcare, Švedska),
- termostatski cirkulator Multi Temp III (GE Healthcare, Švedska),
- naprava za slikanje gelov CAM-GX-CHEMI HR (Syngene, Velika Britanija),
- program za obdelavo gelov GeneSnap (Syngene, Velika Britanija).

### 3.2.3 Kemikalije za izolacijo DNA iz vzorcev mleka, pinjencev in sirotke

#### 3.2.3.1 Komercialni kompleti

**Komplet NucleoSpin Food** (50 preps, REF 740945.50, Macherey-Nagel GmbH & Co, Nemčija):

- pufer CF (100 mL) – za lizo celic,
- proteinaza K (6 mg) v pufru PB (0,8 mL),
- pufer C2 (24 mL) in pufer C3 (6 mL), ki ju zmešamo skupaj v pufer C4 (30 mL),
- pufer CQW (30 mL) – za spiranje kolone,
- pufer C5 (20 mL), ki smo mu dodali 80 mL absolutnega etanola - za spiranje kolone,
- pufer CE (15 mL) – za elucijo DNA,
- kolone NucleoSpin Food,
- zbirna epruveta (2 mL).

Dodaten material:

- absolutni etanol (Ethanol, Merck, Index-No: 603-002-00-5, Nemčija),
- pufer PBS (Phosphate buffered saline, Oxoid, BR0014G, Hampshire, Velika Britanija),
- 2 mL-epruvete (Eppendorf),
- steklene kroglice za razbijanje celic.

**DNeasy Blood & Tissue Kit** (50 preps, QIAGEN GmbH, Cat. No. 69504, Nemčija):

- proteinaza K (1,25 mL (aktivnost 600 mAU/ml),
- pufer AL (12 mL) – za lizo celic,
- pufer AW1 (19 mL), ki smo mu dodali 25 mL absolutnega etanola,

- pufer AW2 (13 mL), ki smo mu dodali 30 mL absolutnega etanola,
- pufer AE (22 mL) – za elucijo DNA,
- kolone DNeasy Mini Spin ,
- zbirna epruveta (2 mL).

Dodaten material:

- absolutni etanol (Ethanol, Merck, Index-No: 603-002-00-5, Nemčija),
- pufer PBS (Phosphate bufferd saline, Oxoid, BR0014G, Hampshire, Velika Britanija),
- 2 mL-epruvete (Eppendorf).

**QIAprep Spin Miniprep Kit** (50 preps, QIAGEN GmbH, Cat. No. 27104, Nemčija):

- pufer P1 (20 mL), ki smo mu dodali LyseBlue reagent,
- pufer P2 (20 mL) – za lizo celic,
- pufer N3 (30 mL) – za nevtralizacijo,
- pufer PB (30 mL) – za vezavo DNA,
- pufer PE (6 mL), ki smo mu dodali 24 mL absolutnega etanola,
- pufer EB (15 mL) – za elucijo DNA,
- kolone QIAprep Spin,
- zbirne epruvete (2 mL).

Dodaten material:

- absolutni etanol (Ethanol, Merck, Index-No: 603-002-00-5, Nemčija),
- 2 mL-epruvete (Eppendorf).

**DNeasy mericon Food Kit** (50 preps, QIAGEN GmbH, Cat. No. 69514, Nemčija):

- pufer Food Lysis Buffer (4 x 200 mL) – za lizo celic,
- proteinaza K (1,4 mL),
- pufer PB (2 x 30 mL),
- pufer AW2 (13 mL), ki smo mu dodali 30 mL absolutnega etanola,
- pufer EB (15 mL) – za elucijo DNA,
- kolone QIAquick Spin.

Dodaten material:

- absolutni etanol (Ethanol, Merck, Index-No: 603-002-00-5, Nemčija),
- kloroform (Chloroform, Merck, Index-No: 602-006-00-4, Nemčija),
- 2 mL-epruvete (Eppendorf),
- 50 mL centrifugirke.

**SmartHelix Complex Samples** (ExVivon Ltd, Ljubljana, Slovenija):

- Sol II,
- Sol III,
- Sol IV,
- Sol V,
- Sol VI,
- steklene kroglice.

Dodaten material:

- dH<sub>2</sub>O,
- 2 mL-epruvete (Eppendorf).

**SmartHelix First DNAid** (ExVivon Ltd, Ljubljana, Slovenija):

- pufer D-stroyer,
- B-pufer,
- W-pufer,
- E-pufer,
- steklene kroglice.

Dodaten material:

- proteinaza K (Proteinase K, recombinant, 03 115 801 001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemčija),
- 2 mL-epruvete (Eppendorf),
- parafilm.

**GenElute Plasmid Miniprep Kit** (70 preps, Sigma-Aldrich, PLM 70, St. Louis, ZDA):

- Resuspension Solution (15,5 mL), ki smo ji dodali 100 mL absolutnega etanola,
- RNase A Solution (0,25 mL),
- Lysis Solution (15,5 mL),
- Neutralisation Solution (65 mL),
- Column Preparation Solution (7 mL),
- Wash Solution (25 mL),
- Elution Solution (8 mL),
- GenElute Miniprep Binding Columns filter-kolone z zbirnimi epruvetami.

Dodaten material:

- absolutni etanol (Ethanol, Merck, Index-No: 603-002-00-5, Nemčija).

### 3.2.3.2 Klasični načini

#### Izolacija DNA s fenol-kloroformom po De in sod. (2011)

- 0,9 % NaCl (NaCl, Merck, 1.06404.1000, Darmstadt, Nemčija),
- TENS:
- 10 mM Tris, pH 8.0 (Tris Base, Promega, H5131 185680, Madison, ZDA),
- 1 mM EDTA (EDTA, Sigma, 6381-92-6, St. Louis, ZDA),
- 100 mM NaCl (NaCl, Merck, 1.06404.1000, Darmstadt, Nemčija),
- 0,5 % SDS (SDS solution, 10 %, Promega, 608-274-4330, Madison, ZDA),
- proteinaza K (Proteinase K, recombinant, 03 115 801 001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemčija),
- fenol (Ultra Pure Phenol, Invitrogen, 15509-037, Carlsbad, ZDA), nasičen z destilirano vodo,
- kloroform (Chloroform, Merck, Index-No: 602-006-00-4, Nemčija),
- Na-acetat (Sodium acetate, Sigma, 204-823-8, St. Louis, ZDA),
- izopropanol (2-propanol, Kemika, 1622601, Zagreb, Hrvatska),
- destilirana voda.

#### Izolacija DNA po Bonaiti in sod. (2006)

- 4 M guanidin tiocianat – 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5):
- guanidin tiocianat (Guanidine Thiocyanate, Promega, 2014-10-27, Madison, ZDA),
- Tris-HCl (Tris-HCl, Promega, 608-274-4330, Madison, ZDA),
  - N-lauroilsarkozin (N-lauroylsarcosine, Sigma, 205-281-5, St. Louis, ZDA),
  - 20 % SDS (Sodium Dodecyl Sulfate, Promega, 608-274-4330, Madison, ZDA),
  - 0,1 M fosfatni pufer (pH 8.0):
- kalijev-hidrogenfosfat (kalijev-hidrogenfosfat, Kemika, 7758-11-4, Zagreb, Hrvatska),
- kalijev-dihidrogenfosfat (potassium dihydrogen phosphate, Merck, 1.04873.0250, Darmstadt, Nemčija),
- 50 mM Na-acetat – 10 mM EDTA:
  - Na-acetat (Sodium acetate, Sigma, 204-823-8, St. Louis, ZDA),
  - EDTA (EDTA, Sigma, 6381-92-6, St. Louis, ZDA),

- fenol-kloroform-izoamilni akohol (25:24:1):
- fenol (Ultra Pure Phenol, Invitrogen, 15509-037, Carlsbad, ZDA), nasičen z destilirano vodo,
- kloroform (Chloroform, Merck, Index-No: 602-006-00-4, Nemčija),
- izoamilni alcohol (izo-amil-alkohol, Kemika, 01543, Zagreb, Hrvaška),
- kloroform-izoamilni akohol (24:1):
- kloroform (Chloroform, Merck, Index-No: 602-006-00-4, Nemčija),
- izoamilni alkohol (izo-amil-alkohol, Kemika, 01543, Zagreb, Hrvaška),
- absolutni etanol (Ethanol, Merck, Index-No: 603-002-00-5, Nemčija),
- Tris-EDTA 1x:
- Tris (Tris Base, Promega, 608-274-4330, Madison, ZDA),
- EDTA (EDTA, Sigma, 6381-92-6, St. Louis, ZDA).

#### Izolacija DNA po Murphy in sod. (2002)

- EDTA (EDTA, Sigma, 6381-92-6, St. Louis, ZDA),
- Pufer TE:
- 10 mM Tris-HCl (Tris-HCl, Promega, 608-274-4330, Madison, ZDA),
- 1 mM EDTA (EDTA, Sigma, 6381-92-6, St. Louis, ZDA),
- mešanica A:
- 40 mM Tris-HCl (Tris-HCl, Promega, 608-274-4330, Madison, ZDA),
- 50 mM KCl (Potassium Chloride, Sigma, 7447-40-7, St. Louis, ZDA),
- 3 mM MgCl<sub>2</sub> (Magnesium Chloride, Sigma, 7791-18-6, St. Louis, ZDA),
- tween 20 (Tween \*20, Merck, 01-60428575, Darmstadt, Nemčija),
- proteinaza K (Proteinase K, recombinant, 03 115 801 001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemčija).

#### 3.2.4 Kemikalije za pripravo standardne DNA krave

**High pure PCR product purification kit** (50 preps, Roche, 11732668001, Mannheim, Nemčija):

- pufer za vezavo na membrano – Binding Buffer (30 mL),
- pufer za spiranje membrane – Wash Buffer (10 mL), ki smo mu dodali 40 mL absolutnega etanola,
- pufer za elucijo PCR pomnožkov – Elution Buffer (40 mL),
- filter-kolone – High Pure filter tube,
- zbirne kolone.

Dodaten material:

- absolutni etanol (Ethanol, Merck, Index-No: 603-002-00-5, Nemčija).

**pGEM-T Easy Vector System II** (20 reactions, Promega, A1360, Madison, ZDA):

- vektor - pGEM-T Easy Vector (1,2 µg),
- kontrolna DNA - Control Insert DNA (12 µL),
- ligaza - T4 DNA Ligase (100 u),
- ligacijski pufer z ligazo - 2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase (200 µL),
- celična kultura *Escherichia coli* - JM109 Competent Cells, High Efficiency (6 × 200 µl).

### **3.2.5 Kemikalije za pripravo reakcijske mešanice za PCR v realnem času**

Za pripravo reakcijske mešanice za PCR v realnem času smo uporabili začetne oligonukleotide, specifične za kravo (BOS-F/BOS-R), začetne oligonukleotide, specifične za sesalce (MAN-F/MAN-R), in sondi, specifično za kravo ter sesalce (BOS-P/MAN-P) (López-Calleja in sod., 2007b). Sekvenca kravje mitohondrijske 12 S ribosomalne RNA z označenimi mesti prileganja začetnih oligonukleotidov in sonde je prikazana na sliki 5.

Pred naročilom začetnih oligonukleotidov in sondi smo pravilnost sekvence preverili na genski banki NCBI. Izkazalo se je, da se začetni oligonukleotid ne prilega popolnoma kravji DNA (podčrtano). López-Calleja in sod. (2007b) so uporabili 12STAQMANT: 5-TGG TTT CAT AAT AAC TTT CGC GCT -3, ki ni popolnoma komplementaren, razlika je pri četrtem nukleotidu s konca 3' (zapisan je C, a moral bi biti T). Zato smo se odločili, da bomo naročili spremenjen začetni oligonukleotid BOS-R: 5-TGG TTT CAT AAT AAC TTT CGT GCT -3.

Kravja mitohondrijska 12 S ribosomalna RNA, fragment (AJ849533)

ggtaaatctcgccagccaccgcgtcatacgattaacccaagctaaccaggatcggcgtaaaacgtgtaaagcacc  
ataccaaataaggtaattctaactaagctgaaaagccatgattaaaataaaaataatgacgaaagtgaccctacaata  
gccgacgcactatagctaagccaaactgggatttagatacccactatgcttagccctaaacacagataattacataa  
aaaatttgcgcagactactactagcaacagcttaaaactc**aaaggacttggcggtgcttataccttc****tagaggagc**  
**ctgttctataatcgataaaccccg**ataaacctcacaattctgtaatacagttatataccgcacatctcagcaaa  
ccctaaaaaggaaaaaaaagtaagcgtattatgatacataaaaacgttaggtcaaggtaacctatgaaatggg  
aagaatgggctacattctcacccaagagaatcaagcacgaaagttattatgaaaccaataaccaaaggagg  
athtagcagtaactaagaatagagtgcattgtgaattaggccatgaagcacgcacacaccgcccgtcaccctcc  
tcaaatacgatattcattttaaacgcactacatgagaggagac**aagtgcgtacaaggtaag**  
**catactgga**

**BOS-F in MAN-F :**

**5-AAAGGACTTGGCGGTGCTT-3**

**BOS-P in MAN-P:**

**5-FAM-AGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATAAACCCCG -TAMRA-3**

**BOS-R:**

**5-TGGTTTCATAATAACTTCGTGCT-3**

**MAN-R:**

**5-TCCAGTATGCTTACCTTGTACGACTT-3**

**Pomnožek specifičen za kravo (251 bp):**

**aaaggacttggcggtgcttataccttc****tagaggagcctgttctataatcgataaaccccg**ataaacctcacaattctgct  
aatacagtctataaccgcacatctcagcaacccctaaaaggaaaaaaaagtaagcgtattatgatacataaaaacgttag  
gtcaagggtgtacccatgaaatggagaagaaatgggctacattctcacccaagagaatca**agcacgaaagttattatgaa**  
**acca**

**Pomnožek specifičen za sesalce (426 bp):**

**aaaggacttggcggtgcttataccttc****tagaggagcctgttctataatcgataaaccccg**ataaacctcacaattctgct  
aatacagtctataaccgcacatctcagcaacccctaaaaggaaaaaaaagtaagcgtattatgatacataaaaacgttag  
gtcaagggtgtacccatgaaatggagaagaaatgggctacattctcacccaagagaatca**agcacgaaagttattatgaa**  
**acca**ataaccaaaggaggatttagcagtaactaagaatagagtgcattgtgaattaggccatgaagcacgcacacacc  
gccccgtcaccctccaaatagattcattgtcatctaccctattaaacgcactacatgagaggagac**aagtgcgtac**  
**aaggtaagcatactgga**

Slika 5: Sekvence začetnih oligonukleotidov, sonde in pomnožkov specifičnih za kravo in za sesalce (prijejeno po López-Calleja in sod., 2007b; NCBI, 2013)

**Legenda:** **BOS-F, BOS-R:** začetna oligonukleotida specifična za *Boss Taurus*; **BOS-P:** sonda specifična za *Boss Taurus*; **MAN-F, MAN-R:** začetna oligonukleotida specifična za *Mammalia*; **MAN-P:** sonda specifična za *Mammalia*.

### 3.2.5.1 Specifična metoda določanja pomnožkov

Za pripravo reakcijske mešanice za PCR v realnem času s specifično metodo določanja pomnožkov smo uporabili (López-Calleja in sod., 2007b):

- Par začetnih oligonukleotidov, specifičnih za kravo:

- i. BOS-F: 5-AAA GGA CTT GGC GGT GCT T-3
- ii. BOS-R: 5-TGG TTT CAT AAT AAC TTT CGT GCT-3
- b. Sondo BOS-P: 5-FAM-TAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATAAACCCCG-TAMRA-3
- c. Par začetnih oligonukleotidov, specifičnih za sesalce:
  - i. MAN-F: 5-AAA GGA CTT GGC GGT GCT T-3
  - ii. MAN-R: 5-TCC AGT ATG CTT ACC TTG TTA CGA CTT-3
- d. Sondo MAN-P: 5-FAM-TAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATAAACCCCG-TAMRA-3
- e. PCR vodo (Nuclease Free Water),
- f. TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems).

### 3.2.5.2 Nespecifična metoda določanja pomnožkov

Za pripravo reakcijske mešanice za izvedbo PCR v realnem času z nespecifično metodo določanja pomnožkov smo uporabili (López-Calleja in sod., 2007b):

- a. Par začetnih oligonukleotidov, specifičnih za kravo:
  - i. BOS-F: 5-AAA GGA CTT GGC GGT GCT T-3
  - ii. BOS-R: 5-TGG TTT CAT AAT AAC TTT CGT GCT-3
- b. Par začetnih oligonukleotidov, specifičnih za sesalce:
  - i. MAN-F: 5-AAA GGA CTT GGC GGT GCT T-3
  - ii. MAN-R: 5-TCC AGT ATG CTT ACC TTG TTA CGA CTT-3
- c. PCR vodo (Nuclease Free Water),
- d. SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems).

### 3.2.5.3 Kemikalije za pripravo standardne DNA

Za pripravo standardne DNA krave smo pomnožili odsek kravje DNA, ki je vseboval specifičen odsek za sesalce in specifičnega za kravo. Reakcijsko mešanico za PCR smo pripravili z:

- a. PCR pufer 10x PCR Buffer (Promega, ZDA),
- b. 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega, ZDA),
- c. 2,5 mM dNTP (Sigma, ZDA),
- d. par začetnih oligonukleotidov, specifičnih za sesalce:
  - i. MAN-F: 5-AAA GGA CTT GGC GGT GCT T-3,
  - ii. MAN-R: 5-TCC AGT ATG CTT ACC TTG TTA CGA CTT-3,
- e. ddH<sub>2</sub>O,
- f. Taq polimeraza (5 U/μl) (Promega, ZDA).

### 3.2.6 Kemikalije za izolacijo proteinov iz mleka

Komplet 2-D Clean up kit (GE Healthcare, 80-6484-51, Björkgatan, Švedska):

- Precipitant (16 mL),
- Co-precipitant (17,5 mL),
- pufer »Wash buffer« (50 mL),
- aditiv »Wash additive« (1 mL),
- raztopino za rehidracijo »Rehydration solution«.

### 3.2.7 Kemikalije za izvedbo SDS-PAGE in 2-D elektroforeze

- ddH<sub>2</sub>O,
- Bradfordov reagent Bio-Rad Protein assay (Bio-Rad Laboratories, 500-0006, ZDA),
- urea (Sigma, U5378, ZDA),
- tiourea (Sigma, T8656, ZDA),
- detergent CHAPS (GE Healthcare, 17-1314-01, Švedska),
- IPG pufer (GE Healthcare, 17-6000-87, Švedska),
- ditiotreitol - DTT (Sigma, D0632, ZDA),
- inhibitor proteaz (Roche Diagnostics, 11697498001, Nemčija),
- bromfenolmodro (Sigma, 114391, ZDA),
- trak z imobiliziranim pH gradientom (3-10) (GE Healthcare, 17-6001-14, Švedska),
- mineralno olje (Sigma, M5904, ZDA),
- akrilamid/bisakrilamid (30 % : 0,8 %) (Sigma, A2917, ZDA)
- Tris (Sigma, T5941, ZDA),
- natrijev dodecil sulfat - SDS (Sigma, 71727, ZDA),
- amonijev persulfat - APS (Sigma, A3678, ZDA),
- N,N,N',N'-Tetrametiletilentiamine - TEMED (Sigma, T9281, ZDA),
- glicerol (Sigma, G5516, ZDA),
- jodoacetamid - JAA (Sigma, I1149, ZDA),
- raztopina proteinov znanih molekulskih mas (Invitrogen, LC5625, ZDA),
- agarozna (Sigma, A9311, ZDA),
- tris-baza (Sigma, T6066, ZDA),
- glicin (Merck, 100590, Nemčija),
- nanašalni pufer (Fermentas, R1011, ZDA),
- metanol (Merck, 1060092500, Nemčija),
- ocetna kislina (Merck, 8187559025, Nemčija),
- barvilo za gel SYPRO Ruby (Invitrogen, S-12000, ZDA).

### 3.3 METODE

#### 3.3.1 Postopki izolacije DNA iz mleka, pinjenca in sirotke

##### 3.3.1.1 Komercialni komplet NucleoSpin Food

Pred izolacijo DNA s komercialnim kompletom NucleoSpin Food smo vzorce različno predpripravili.

Čiščenje:

- Čiščenje s pufrom PBS

Polovico vzorcev smo večkratno očistili s pufrom PBS tako, da smo po 1 mL mleka centrifugirali 15 min pri 1 500 RPM in previdno odpipetirali supernatant. Nato smo v treh ponovitvah dodali 1 mL pufra PBS, centrifugirali 5 min pri 12 000 RPM, previdno odpipetirali in zavrgli supernatant ter pelet uporabili za izolacijo DNA.

- Brez čiščenja

Drugo polovico vzorcev smo 10 min centrifugirali pri 11 337 RPM in previdno odpipetirali supernatant in pelet uporabili za izolacijo DNA.

Razbijanje celic:

- Razbijanje celic s kroglicami

Polovico vzorcev, ki so bili čiščeni s PBS, in polovico vzorcev, ki jih nismo čistili s PBS, smo obdelali s steklenimi kroglicami. Ko smo vzorcem dodali prvi pufer iz protokola za izolacijo DNA s komercialnim kompletom NucleoSpin Food, smo vzorec s kroglicami 1 min mešali na vrtinčnem mešalu.

- Brez razbijanja celic s kroglicami

Preostale vzorce smo brez obdelave s kroglicami uporabili za izolacijo DNA s komercialnim kompletom NucleoSpin Food.

Predpripravljenemu vzorcu mleka (1 mL) smo dodali 550 µL pufra CF, ki smo ga predhodno v vodni kopeli segreli na 65 °C. Mikrocentrifugirko z mlekom in pufrom smo 15 s mešali na vrtinčnem mešalu, nato smo dodali 20 µL proteinaze-K (7,5 mg/mL) in ponovno premešali na vrtinčnem mešalu (30 s). Sledila je 30 min inkubacija pri 65 °C.

Po inkubaciji smo vzorce 10 min centrifugirali pri 12 000 RPM. 300 µL dobljenega supernatanta smo prestavili v novo mikrocentrifugirko. Dodali smo 300 µL pufra C4, 300 µL absolutnega etanola in 30 s mešali na vrtinčnem mešalu.

750 µL mešanice smo iz mikrocentrifugirke prestavili v kolono za izpiranje z zbirno epruveto. Kolono za izpiranje smo centrifugirali 1 min pri 12 000 RPM in zavrgli tekočo fazo, ki je prešla v zbirno epruveto.

Sledilo je čiščenje in sušenje kolone. Na sredino filtra smo dodali 400 µL pufra CQW, centrifugirali 1 min pri 12 000 RPM in zavrgli tekočo fazo, ki je prešla v zbirno epruveto. Na sredino filtra dodali 700 µL pufra C5, centrifugirali 1 min pri 10 000 RPM in zavrgli tekočo fazo, ki je prešla v zbirno epruveto. Nazadnje smo dodali 200 µL pufra C5, centrifugirali 2 min pri 10 000 RPM in zavrgli tekočo fazo, ki je prešla v zbirno epruveto.

Naslednja stopnja je služila za elucijo DNA, ki se je vezala na membrano v koloni. Kolono za izpiranje smo prestavili v novo zbirno epruveto. Na sredino filtra smo dodali 100 µL pufra CE, ki smo ga predhodno v vodni kopeli segreli na 70 °C. Sledilo je 5 min inkubacije pri sobni temperaturi. Nato smo kolono centrifugirali 1 min pri 10 000 RPM. DNA je prešla v tekočo fazo v zbirni epruveti, ki smo jo po merjenju koncentracije in čistosti shranili pri -20 °C.

### 3.3.1.2 Komercialni komplet QIAprep Spin Miniprep

Vzorec mleka (1 mL oz. 5 mL) smo centrifugirali 3 min pri 11 337 RPM in previdno odpipetirali in zavrgli supernatant. Dodali smo 250 µL pufra P1 in 250 µL pufra P2. Vsebino mikrocentrifugirke smo premešali s 4 do 6 kratnim obračanjem. Vzorce smo nekaj minut inkubirali na sobni temperaturi – dokler ni tekočina postala bistra. Dodali smo 350 µL pufra N3 in ponovno premešali s 4 do 6 kratnim obračanjem. Vzorce smo 10 minut centrifugirali pri 11 337 RPM. Supernatant smo prenesli na kolone s filtrom in centrifugirali 60 sekund pri 11 337 RPM. Tekoča fazo, ki je prešla v zbirno epruveto pod filtrom, smo zavrgli. V filter-kolono smo dodali 500 µL pufra PB, centrifugirali 60 sekund pri 11 337 RPM in zavrgli tekočo fazo v zbirni epruveti. V filter-kolono smo nanesli 750 µL pufra PE, centrifugirali 60 sekund pri 11 337 RPM in zavrgli tekočo fazo v zbirni epruveti. Filter v koloni smo posušili tako, da smo jo ponovno centrifugirali 60 sekund pri 11 337 RPM. Filter-kolono smo prenesli v novo zbirno epruveto in na sredino filtra dodali 50 µL elucijskega pufra EB. Vzorec smo 1 minuto inkubirali na sobni temperaturi, nato pa 60 sekund centrifugirali pri 11 337 RPM. DNA je raztopljena v pufru EB prešla v zbirno epruveto. Izmerili smo ji koncentracijo in čistost ter jo do nadaljnje uporabe hranili na -20 °C.

### 3.3.1.3 Komercialni komplet DNeasy Blood & Tissue

Vzorec (1 oz. 10 mL) mleka smo 5 minut centrifugirali pri 4 293 RPM in zavrgli supernatant. Dobleni pelet smo raztopili v 200 µL PBS, dodali 20 µL proteinaze K (aktivnost 600 mAU/mL) in 200 µL pufra AL. Vsebino mikrocentrifugirke smo premešali na vrtinčnem mešalu. Vzorec smo 10 minut inkubirali v vodni kopeli pri 56 °C. Po inkubaciji smo vzorcu dodali 200 µL absolutnega etanola in vsebino mikrocentrifugirke

premešali na vrtinčnem mešalu. Vzorec smo prenesli na filter-kolono z zbirno epruveto in 1 minuto centrifugirali pri 4 293 RPM. Tekočo fazo, ki je prešla v zbirno kolono, smo zavrgli. V filter-kolono smo dodali 500 µL pufra AW1, nato smo 1 minuto centrifugirali pri 4 293 RPM in tekočo fazo, ki je prešla v zbirno kolono, zavrgli. V filter-kolono smo dodali 500 µL pufra AW2, nato smo 3 minute centrifugirali pri 13 148 RPM in tekočo fazo, ki je prešla v zbirno kolono, zavrgli. Filter-kolono smo prenesli v novo zbirno epruveto in na sredino filtra nanesli 200 µL elucijskega pufra AE. Po 1 minutni inkubaciji na sobni temperaturi smo vzorec 1 minuto centrifugirali pri 4 293 RPM. DNA je s filtra skupaj z elucijskim pufrom AE prešla v zbirno epruveto. Dobljeni DNA smo izmerili koncentracijo in čistost ter jo do nadaljnje uporabe hranili na -20 °C.

#### 3.3.1.4 Komercialni komplet DNeasy Food

Vzorec (2 mL) mleka smo prenesli v 50 mL centrifugirko in dodali 10 mL pufra Food Lysis Buffer ter 25 µL proteinaze K. Vsebino centrifugirke smo premešali na vrtinčnem mešalu. Vzorec smo 30 minut inkubirali pri 60 °C in med inkubacijo večkrat premešali na vrtinčnem mešalu. Tako po inkubaciji smo centrifugirke prenesli na led in tako ohladili vzorec. Sledilo je 5 minut centrifugiranja pri 2 500 RPM. V že prej pripravljeno mikrocentrifugirko, ki je vsebovala 500 µL kloroforma smo dodali 700 µL supernatanta in vsebino premešali na vrtinčnem mešalu. Vzorce smo 15 minut centrifugirali pri 14 000 RPM. V prej pripravljeno mikrocentrifugirko z 350 µL pufra PB smo dodali 350 µL zgornjega vodnega sloja in premešali na vrtinčnem mešalu. Mešanico smo prenesli na filter-kolono z zbirno epruveto in 60 sekund centrifugirali pri 17 900 RPM. Tekočo fazo, ki je prešla v zbirno epruveto, smo zavrgli. V filter-kolono smo dodali 500 µL pufra AW2 in 60 s centrifugirali pri 17 900 RPM. Tekočo fazo, ki je prešla v zbirno epruveto, smo zavrgli. Nato smo ponovno 60 sekund centrifugirali pri 17 900 RPM in s tem osušili filter membrano. Kolono smo prestavili v novo zbirno epruveto in na sredino filtra dodali 150 µL elucijskega pufra EB. Po 1 minutni inkubaciji na sobni temperaturi smo vzorec 1 minuto centrifugirali pri 17 900 RPM in DNA je skupaj z elucijskim pufrom prešla v zbirno kolono. Po merjenju koncentracije in čistosti smo jo do nadaljnje uporabe hranili pri -20 °C.

#### 3.3.1.5 Komercialni komplet SmartHelix First DNAid

2 mL vzorca mleka smo 5 minut centrifugirali pri 10 000 RPM. Odstranili smo supernatant, dodali 400 µL D-stroyer pufra in 200 µg proteinaze K, ter premešali na vrtinčnem mešalu. Vzorcu smo dodali steklene kroglice, ponovno premešali, in z razbijalcem celic 2 minuti stresali pri hitrosti na stopnji 8. Sledila je 15 minutna inkubacija v vodni kopeli pri 56 °C in ponovno 2 minutno razbijanje celic pri hitrosti na stopnji 8. Nato smo vzorec ponovno 15 minut inkubirali v vodni kopeli pri 56 °C in 2 minuti

razbijali celice pri hitrosti na stopnji 8. Vzorec smo 10 minut inkubirali v vreli vodi, nato pa 3 minute ohlajali na -20 °C. Tako pripravljen vzorec smo 5 minut centrifugirali pri 10 000 RPM. Supernatant smo prenesli v nove mikrocentrifugirke, dodali trikratni volumen B-pufra, premešali na vrtinčnem mešalu in 700 µL vzorca prenesli v filter-kolone z zbirno epruveto. Po 1 minutni inkubaciji na sobni temperaturi smo vzorec 1 minuto centrifugirali pri 16 000 RPM in zavrgli tekočo fazo. Na filter smo nanesli preostali vzorec, ponovno 1 minuto inkubirali pri sobni temperaturi, 1 minuto centrifugirali pri 16 000 RPM in zavrgli tekočo fazo. V filter-kolono smo dodali 600 µL W-pufra, 1 min centrifugirali pri 16 000 RPM in zavrgli tekočo fazo. Dodali smo 500 µL W-pufra, 5 min centrifugirali pri 16 000 RPM, zavrgli tekočo fazo. Filter smo osušili tako, da smo ga ponovno centrifugirali 1 min pri 16 000 RPM in zavrgli tekočo fazo. Filter-kolono smo prenesli v novo zbirno epruveto, dodali 100 µL E-pufra in 1 minuto inkubirali na sobni temperaturi. Sledilo je 1 minutno centrifugiranje pri 16 000 RPM, DNA je prešla v zbirno epruveto, izmerili smo ji koncentracijo in čistost ter jo shranili pri -20 °C.

### 3.3.1.6 Komercialni komplet SmartHelix Complex Samples

V mikrocentrifugirko smo dodali 500 µL vzorca mleka, 300 µL Sol II in premešali s pipeto. Dodali smo 375 mg steklenih kroglic, 375 mL Sol III, premešali z vrtinčnim mešalom in 2 minuti stresali na razbijalcu celic pri hitrosti na stopnji 8. Vzorec smo 5 minut centrifugirali pri 10 000 RPM in zgornjo fazo prenesli v novo mikrocentrifugirko. Sledila je dvakratna ponovitev razbijanja celic. Vzorcu smo dodali 300 µL Sol II in preostali volumen Sol III, premešali na vrtinčnem mešalu, 2 minuti stresali na razbijalcu celic pri hitrosti na stopnji 8, 5 minut centrifugirali pri 10 000 RPM, in prenesli zgornjo fazo v novo mikrocentrifugirko. Po razbijanju celic smo dodali 300 µL Sol III, premešali na vrtinčnem mešalu in 5 minut centrifugirali pri 10 000 RPM. Zgornjo fazo smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in postopek ponovno ponovili. Nato smo dodali ¼ volumna Sol IV in 2 volumna hladne Sol V. Vzorec smo premešali s 4 do 6 kratnim obračanjem in 1 uro inkubirali pri -20 °C. Sledilo je 25 minutno centrifugiranje pri 14 000 RPM, supernatant smo zavrgli. Peletu smo dodali 750 µL Sol VI, 15 minut centrifugirali pri 14 000 RPM in 4 °C. Supernatant smo odpipetirali in pelet posušili. DNA smo raztopili v 50 µL H<sub>2</sub>O, izmerili koncentracijo in čistost ter jo shranili pri -20 °C.

### 3.3.1.7 Klasična metoda izolacije DNA s fenol-kloroformom po De in sod. (2011)

Protokol za klasično metodo izolacije DNA s fenol-kloroformom smo povzeli po objavi De in sod. (2011).

Vzorec mleka (1 mL oz. 10 mL) smo 2 min centrifugirali pri 6 708 RPM in zavrgli supernatant. Pelet smo spirali z dodatkom 500 µL 0,9 % NaCl, premešali na vrtinčnem

mešalu, 2 minuti centrifugirali pri 12 000 RPM in zavrgli supernatant. Dobljeni pelet smo raztopili v 500 µL TENS z dodatkom proteinaze K (25 mg/mL) in premešali na vrtinčnem mešalu. Sledila je 3 urna inkubacija v vodni kopeli pri 50 °C. Po inkubaciji smo vzorcu dodali 500 µL fenol-kloroforma (1:1), premešali na vrtinčnem mešalu in 2 minuti centrifugirali pri 12 000 RPM. Zgornjo vodno fazo smo prenesli v novo 2 mL mikrocentrifugirko. Vzorcu smo dodali 500 µL kloroforma premešali na vrtinčnem mešalu in 2 minuti centrifugirali pri 12 000 RPM. Zgornjo vodno fazo smo prenesli v novo mikrocentrifugirko. Vzorcu smo dodali 50 µL 3 M Na-acetata in 400 µL izopropanola ter ročno premešali s 4 do 6 kratnim obračanjem. Vzorec smo najmanj 30 minut inkubirali pri -20 °C. Sledilo je 10 minutno centrifugiranje pri 13 000 RPM in DNA je prešla v pelet. Supernatant smo previdno odstranili in pelet posušili. Naknadno smo ga raztopili v H<sub>2</sub>O. Po merjenju koncentracije in čistosti izolirane DNA, smo jo shranili pri -20 °C.

### 3.3.1.8 Dvakratna klasična metoda izolacije DNA s fenol-kloroformom

Dvakratno klasično metodo izolacije DNA s fenol-kloroformom smo izvedli tako, da smo DNA izolirali po postopku opisanem v poglavju 3.2.1.7 Protokol za klasično metodo izolacije DNA s fenol-kloroformom. Nato smo dobljen izolat DNA ponovno čistili po istem postopku.

### 3.3.1.9 Izolacija DNA po Bonaiti in sod. (2006)

Vzorcu mleka (2 mL) smo dodali 4 mL guanidin-tiocianat-Tris-HCl in 250 µL 10 % lauroilsarkozina. Po 3 minutah mešanja na vrtinčnem mešalu smo 350 µL tako pripravljenega vzorca prenesli v novo mikrocentrifugirko. Dodali smo 200 mg steklenih kroglic, 50 µL 20 % SDS, 300 µL fosfatnega pufra, 300 µL Na-acetat-EDTA in 400 µL mešanice fenol-kloroform-izoamilni alkohol (25:24:1). Mikrocentrifugirko smo dvakrat po 30 sekund premešali na vrtinčnem mešalu in vzorec med mešanjem ohladili na ledu. Sledilo je 30 minutno centrifugiranje pri 20 800 RPM, po katerem smo zgornjo vodno fazo prenesli v novo mikrocentrifugirko. Naslednji postopki so služili čiščenju dobljene DNA. Dodali smo enak volumen mešanice fenol-kloroform-izoamilni alkohol (25:24:1) in premešali na vrtinčnem mešalu. Nato smo vsebino 15 minut centrifugirali pri 20 800 RPM in zgornjo vodno fazo prenesli v novo mikrocentrifugirko. Nato smo dodali enak volumen mešanice kloroform-izoamilni alkohol (24:1), premešali na vrtinčnem mešalu, 15 minut centrifugirali pri 20 800 RPM in zgornjo vodno fazo prenesli v novo mikrocentrifugirko. Tako očiščeno DNA smo oborili z dodatkom dvakratnega volumena ohlajenega absolutnega etanola (-20 °C) in 2 uri inkubirali na -20 °C. Po inkubaciji smo vzorec 15 minut centrifugirali pri 20 800 RPM in odstranili supernatant. Sledilo je dvakratno čiščenje z absolutnim etanolom in 15 minutnim centrifugiranjem pri 20 800 RPM. Dobljeni pelet smo

posušili in ga raztopili v 100 µL Tris-EDTA. Po merjenju koncentracije in čistosti smo izolirano DNA do nadaljnje uporabe hranili pri -20 °C.

### 3.3.1.10 Izolacija DNA po Murphy in sod. (2002)

Vzorec mleka (50 mL) smo 15 minut centrifugirali pri 2 200 RPM in odstranili zgornji maščobni sloj ter supernatant tako, da je na dnu poleg peleta ostal še 1 mL supernatanta. To smo prenesli v mikrocentrifugirko in dodali 300 µL 0,5 M EDTA (pH 8.0), 200 µL pufra TE (10 mM Tris-HCl- 1 mM EDTA (pH 7,6)) ter premešali na vrtinčnem mešalu. Vzorec smo na sobni temperaturi inkubirali dokler se ni zbistril. Nato smo 60 sekund centrifugirali pri 14 000 RPM in odpipetirali supernatant tako, da ga je na dnu, poleg peleta, ostalo okoli 100 µL. Sledilo je dvakratno čiščenje s pufom TE. V mikrocentrifugirko smo dodali 1,4 mL pufra TE, premešali na vrtinčnem mešalu, 1 minuto centrifugirali pri 14 000 RPM in zavrgli supernatant. Po ponovnem čiščenju s TE smo vzorcu dodali 100 µL mešanice A (40 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 µL Tween 20 in 20 µL Proteinaze-K (20 mg/mL). Vzorec smo 3 ure inkubirali v vodni kopeli pri 55 °C. Po inkubaciji je sledila klasična ekstrakcija s fenol kloroformom od vključno dodatka fenol-kloroforma (1:1) dalje. Protokol je opisan v poglavju 3.3.1.7.

### 3.3.2 Merjenje koncentracije in čistosti izolirane DNA

Koncentracijo in čistost izolirane DNA smo določili spektrofotometrično. Merilno kiveto smo sprali z dH<sub>2</sub>O, jo osušili in nanesli 3 µL izolirane DNA. Merili smo s programom za merjenje DNA pri nastavivah: dolžina poti 10 mm, dilucijski faktor 10,0, ozadje vključeno, enote µg/mL in faktor 50,0. Po končanem merjenju smo zapisali koncentracijo DNA podano v µg/mL in čistost DNA podano kot razmerje absorbanc A260/A280 in A260/A230.

### 3.3.3 Priprava standardne DNA

Za določitev teoretične občutljivosti PCR v realnem času in za izdelavo teoretične umeritvene krivulje za kvantifikacijo kravjega mleka v mešanicah smo pripravili standardno DNA. Standardno DNA smo izdelali tako, da smo pomnožek DNA, specifičen za sesalce, ki vključuje del specifičen za kravo, vstavili v plazmidno DNA bakterij vrste *Escherichia coli* JM109. S PCR v realnem času z začetnimi oligonukleoti, specifičnimi za sesalce (MAN-F/MAN-R), smo pomnožili izbrani odsek kravje DNA. Pomnožke smo očistili s komercialnim kompletom High pure PCR product purification kit. Sledila je ligacija očiščenega pomnožka in transformacija. Plazmid z ustavljenim pomnožkom smo izolirali s komercialnim kompletom GeneElutePlasmid Miniprep Kit.

### 3.3.3.1 Pomnoževanje izbranega odseka DNA

S PCR smo pomnožili odsek kravje DNA, specifičen za sesalce. Reakcijska mešanica za en vzorec je imela volumen 45 µL, pripravili smo jo z:

- 9,2 µL 10x PCR pufra (Promega, ZDA),
- 3,657 µL MgCl<sub>2</sub> (Promega, ZDA),
- 3,675 µL dNTP (Sigma, ZDA),
- 2,3 µL začetnega oligonukleotida MAN-F (10 µM),
- 2,3 µL začetnega oligonukleotida MAN-R (10 µM),
- 23,65 µL ddH<sub>2</sub>O,
- 0,2 µL Taq-polimeraze (5 U/µL) (Promega, ZDA).

Tako pripravljeni mešanici smo dodali 5 µL DNA izolirane iz kravjega mleka.

### 3.3.3.2 Čiščenje pomnožkov

Pomnožke smo očistili s komercialnim kompletom High pure PCR product purification kit. 100 µL pomnožkov smo dodali 500 µL pufra za vezavo na membrano (Binding Buffer) in vsebino mikrocentrifugirke premešali na vrtinčnem mešalu. Mešanico smo prenesli na filter-kolono z zbirno epruveto in 60 sekund centrifugirali pri najvišji hitrosti. Dobleni supernatant smo zavrgli, vzorcu dodali 500 µL pufra za izpiranje (Wash Buffer) in 1 min centrifugirali pri 13 000 RPM. Zavrgli smo dobljeni supernatant in dodali 200 µL pufra za izpiranje (Wash Buffer). Vzorec smo 1 min centrifugirali pri 13 000 RPM in zavrgli novo nastali supernatant. Zamenjali smo zbirno kolono in na membrano filter-kolone previdno nanesli 50 µL pufra za elucijo pomnožka (Elution Buffer). Vzorec smo 1 min centrifugirali pri 13 000 RPM. Iz zbirne kolone smo v novo mikrocentrifugirko prenesli eluiran očiščen pomnožek.

### 3.3.3.3 Ligacija in transformacija pomnožkov

Za ligacijo in transformacijo smo uporabili komercialni komplet pGEM-T Easy Vector System II. Za izvedbo ligacije pomnožka smo v mikrocentrifugirki zmešali 5 µL 2x ligacijskega pufra, 1 µL vektorja, 3 µL očiščenega pomnožka in 1 µL ligaze iz komercialnega kompleta. Vzorec smo 1 uro inkubirali pri sobni temperaturi, nato 6 ur na 4 °C ter čez noč na -20 °C.

Po inkubaciji smo izvedli transformacijo. Ligacijsko mešanico smo na hitro centrifugirali in 2 µL mešanice prenesli v 1,5 mL mikrocentrifugirko hlajeno na ledu. Pripravili smo kontrolno mikrocentrifugirko z 0,1 ng plazmida. Celično kulturo *E. coli* JM109 (High Efficiency Competent Cells) smo 5 min ohlajali v ledeni kopeli in jih premešali z obračanjem mikrocentrifugirke. 50 µL celic smo prenesli v mikrocentrifugirko z ligacijsko mešanico in premešali z obračanjem. Celice smo 20 min inkubirali na ledu, nato pa jih za

45 do 50 s prenesli v vodno kopel s 42 °C in ponovno prenesli na led za 2 min. Dodali smo 950 µL medija SOC in 1,5 ure s stresanjem inkubirali pri 37 °C. Na v naprej pripravljene plošče s trdnim gojiščem LB, ki smo mu dodali ampicilin, IPTG in X-Gal smo inokulirali 100 µL kulture in čez noč inkubirali pri 37 °C. Za izolacijo plazmida smo s plošče izmed modrih in belih kolonij izbrali bele kolonije, ki so vsebovale pomnožek.

#### 3.3.3.4 Izolacija plazmida

Plazmid smo iz celične kulture *E. coli* (JM109 High Efficiency Competent Cells) izolirali s komercialnim kompletom GenElute Plasmid Miniprep Kit. 1 mL kulture smo 1 min centrifugirali pri 12 000 RPM in zavrgli supernatant. Dodali smo 200 µL raztopine za resuspenzijo (Resuspension Solution), premešali na vrtinčnem mešalu, dodali 200 µL raztopine za lizo celic (Lysis Solution) in previdno premešali z obračanjem mikrocentrifugirke. Vzorec smo inkubirali pri sobni temperaturi, dokler se ni zbistril. Dodali smo 350 µL raztopine za nevtralizacijo (Neutralisation Solution) in previdno premešali z obračanjem. Vzorec smo 10 min centrifugirali pri 12 000 RPM. Pripravili smo filter-kolono tako, da smo nanjo nanesli 500 µL raztopine za pripravo kolone (Column Preparation Solution), 1 min centrifugirali pri 12 000 RPM in zavrgli vsebino zbirne epruvete. Lizat smo iz mikrocentrifugirke prenesli na filter-kolono, 1 min centrifugirali pri 12 000 RPM in zavrgli vsebino zbirne epruvete. Dodali smo 750 µL raztopine za izpiranje (Wash, dvakrat po 1 min centrifugirali pri 12 000 RPM in zavrgli vsebino zbirne epruvete. Filter-kolono smo prestavili v novo zbirno epruveto in dodali 100 µL raztopine za elucijo (Elution Solution). Po 1 min centrifugiranju pri 12 000 RPM smo izoliran plazmid iz zbirne epruvete prenesli v novo mikrocentrifugirko.

#### 3.3.4 Priprava in izvedba PCR v realnem času

Za določanje potvorb ovčjega in kozjega mleka s kravjim mlekom smo se odločili preizkusiti tako PCR v realnem času s specifično metodo določanja pomnožkov, kot PCR v realnem času z nespecifično metodo določanja pomnožkov.

Začetne oligonukleotide (MAN-F, MAN-R, BOS-F, BOS-R) in sonde (MAN-P, BOS-P) smo pripravili tako, da smo 10 nmol začetnega oligonukleotida dodali 1000 µL H<sub>2</sub>O, dobro premešali in razdelili na manjše enote po 100 µL s koncentracijo 10 µM.

##### 3.3.4.1 Nespecifična metoda določanja pomnožkov

Za izvedbo PCR v realnem času z nespecifično metodo določanja pomnožkov smo pripravili 25 µL reakcijske mešanice. Da pripravimo mešanico za en vzorec za določanje sesalcev potrebujemo:

- 12,5 µL SybrGreen PCR Master Mix,
- ustrezno koncentracijo začetnega oligonukleotida MAN-F,

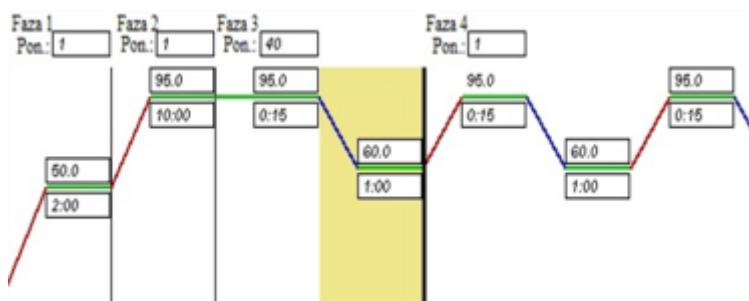
- ustreznou koncentracijo začetnega oligonukleotida MAN-R,
- volumen  $H_2O_{PCR}$ , da dosežemo skupni volumen 25  $\mu L$

Za pripravo mešanice za en vzorec za določanje krave pa zmešamo:

- 12,5  $\mu L$  SybrGreen PCR Master Mix,
- ustreznou koncentracijo začetnega oligonukleotida BOS-F,
- ustreznou koncentracijo začetnega oligonukleotida BOS-R,
- volumen  $H_2O_{PCR}$ , da dosežemo skupni volumen 25  $\mu L$

Tako pripravljeni reakcijski mešanici tik pred zagonom PCR reakcije dodamo 2,5  $\mu L$  izolirane DNA vzorca oziroma 2,5  $\mu L$   $dH_2O$  pri negativnih kontrolah.

Razmere pomnoževanja, ki smo jih nastavili na aparatu za pomnoževanje in določanje pomnožkov, so prikazane na sliki 6.



Slika 6: Nastavite temperature in časa za pomnoževanje ter določanje pomnožkov z nespecifično metodo z aparatom ABI Prism 7500

Po vsakem končanem PCR v realnem času smo rezultate vrednotili. Da smo rezultate lahko med sabo primerjali, smo ročno nastavili mejo zaznavanja na vrednost 0,02, določitev meje izhodišča pa smo nastavili na avtomatsko. V primeru, da je prišlo do pomnoževanja DNA, smo kot rezultat dobili vrednost  $C_t$ . Ta predstavlja cikel PCR, pri katerem je fluorescenčni signal vzorca presegel fluorescenčni signal ozadja. Z vrednostjo  $C_t$ , ustreznostjo oblike krivulje pomnoževanja in, pri nespecifični metodi določanja pomnožkov, s temperaturo taljenja pomnožkov ( $T_m$ ), smo določali, ali je rezultat pozitiven ali negativen. Temperatura taljenja pomnožkov predstavlja tisto temperaturo, pri kateri se polovica pomnožkov spremeni v disociirano stanje.

### 3.3.4.2 Specifična metoda določanja pomnožkov

PCR v realnem času s specifično metodo določanja pomnožkov smo izvedli v 25  $\mu L$  reakcijski mešanici. Za pripravo mešanice za en vzorec za določanje sesalcev potrebujemo:

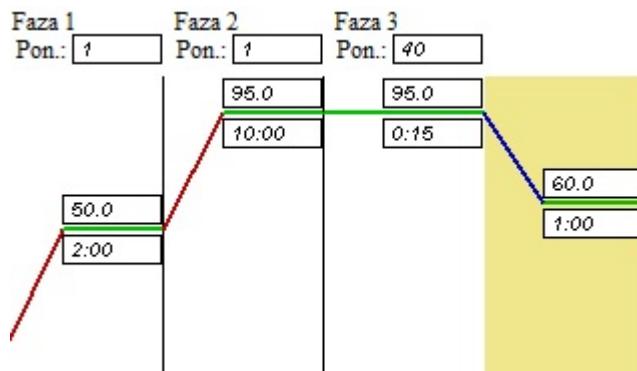
- 12,5  $\mu\text{L}$  TaqMan Universal PCR Master Mix,
- ustrezeno koncentracijo začetnega oligonukleotida MAN-F,
- ustrezeno koncentracijo začetnega oligonukleotida MAN-R,
- ustrezeno koncentracijo sonde MAN-P,
- volumen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{PCR}}$ , da dosežemo skupni volumen 25  $\mu\text{L}$

Za pripravo mešanice za en vzorec za določanje krave pa zmešamo:

- 12,5  $\mu\text{L}$  TaqMan Universal PCR Master Mix,
- ustrezeno koncentracijo začetnega oligonukleotida BOS-F,
- ustrezeno koncentracijo začetnega oligonukleotida BOS-R,
- ustrezeno koncentracijo sonde BOS-P,
- volumen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{PCR}}$ , da dosežemo skupni volumen 25  $\mu\text{L}$ .

Reakcijski mešanici tik pred zagonom PCR reakcije dodamo 2,5  $\mu\text{L}$  izolirane DNA vzorca oz. 2,5  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$  v primeru negativne kontrole.

Za pomnoževanje in določanje pomnožkov smo uporabili aparat ABI Prism 7500 na katerem smo določilo razmere pomnoževanja, kot jih prikazuje slika 7.



Slika 7: Nastavite temperature in časa za pomnoževanje ter določanje pomnožkov s specifično metodo z aparatom ABI Prism 7500

### 3.3.5 Optimizacija nespecifične metode določanja pomnožkov

Pri optimizaciji PCR v realnem času z nespecifično metodo določanja pomnožkov, smo iskali kombinacijo začetnih oligonukleotidov, specifičnih za kravo (BOS-F/BOS-R), in kombinacijo začetnih oligonukleotidov, specifičnih za sesalce (MAN-F/MAN-R), ki so pri pomnoževanju DNA krave s PCR v realnem času dali najboljše rezultate. Kot kriterij za odločanje smo uporabili vrednosti  $C_t$  in  $R^2$  ter E standardne krivulje. Izbrali smo tisto kombinacijo začetnih oligonukleotidov, ki nam je dala najnižje vrednosti  $C_t$ , kjer se je  $R^2$

standardne krivulje najbolj približal 1 in kjer je bil E standardne krivulje najbližji vrednosti 100.

Najprej smo preizkusili kombinacije, kjer imata oba začetna oligonukleotida enako koncentracijo v reakcijski mešanici. Na podlagi dobljenih rezultatov smo se odločili preizkusiti še nekatere kombinacije, kjer koncentraciji oben začetnih oligonukleotidov nista enaki. Kombinacije začetnih oligonukleotidov, ki smo jih preizkusili, so prikazane v preglednicah 5 in 6.

Preglednica 5: Šahovnica kombinacij začetnih oligonukleotidov, specifičnih za kravo (BOS-F, BOS-R), pri optimizaciji PCR v realnem času

Začetni oligonukleotid		BOS-F		
BOS-R	C (nM)	300	600	900
	300	X	-	-
	600	X	X	-
	900	X	X	X

**Legenda:** X: kombinacija začetnih oligonukleotidov, ki smo jo preizkusili; -: kombinacija začetnih oligonukleotidov, ki je nismo preizkusili

Preglednica 6: Šahovnica kombinacij začetnih oligonukleotidov, specifičnih za sesalce (MAN-F, MAN-R), pri optimizaciji PCR v realnem času

Začetni oligonukleotid		MAN-F		
MAN-R	C (nM)	300	600	900
	300	X	-	-
	600	-	X	X
	900	X	X	X

**Legenda:** X: kombinacija začetnih oligonukleotidov, ki smo jo preizkusili; -: kombinacija začetnih oligonukleotidov, ki je nismo preizkusili

### 3.3.6 Optimizacija specifične metode določanja pomnožkov

Pri optimizaciji PCR v realnem času s specifično metodo določanja pomnožkov smo izhajali iz že znanih rezultatov optimizacije PCR v realnem času z nespecifično metodo določanja pomnožkov (3.3.5). Poleg optimizacije začetnih oligonukleotidov (preglednica 5 in preglednica 6) je pri optimizaciji kemizma encimske reakcije pri specifični metodi določanja pomnožkov potrebno določiti tudi optimalno koncentracijo sonde (preglednica 7).

Pri optimizaciji sonde specifične za kravo (BOS-P) smo prilagajali koncentracijo sonde (preglednica 7), koncentracija začetnih oligonukleotidov pa je bila taka, ki smo jo kot optimalno določili po postopku opisanem v poglavju 3.3.5.

Preglednica 7: Koncentracije sond (BOS-P, MAN-P) pri optimizaciji PCR v realnem času

Sonda	C (nM)
BOS-P/MAN-P	200
	100
	50

Optimizacijo koncentracije sonde specifične za sesalce (MAN-P) smo povzeli po optimizaciji sonde specifične za kravo.

### 3.3.7 Določitev občutljivosti PCR v realnem času

#### 3.3.7.1 Določitev teoretične občutljivosti PCR v realnem času

Teoretično občutljivost PCR v realnem času smo določali s standardno DNA krave, ki smo jo pridobili z vstavitvijo pomnožka, specifičnega za kravo, v plazmidno DNA bakterij *E. coli* JM109 (3.3.3).

Teoretično občutljivost PCR v realnem času smo določali tako pri nespecifični metodi določanja pomnožkov, kot pri specifični metodi določanja pomnožkov. V obeh primerih smo pomnoževali z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za sesalce (MAN-F/MAN-R), in z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za kravo (BOS-F/BOS-R). V primeru specifične metode določanja pomnožkov smo dodali še ustrezno sondu (MAN-P ali BOS-P). Da smo ugotovili kakšna je minimalna koncentracija DNA, ki jo še lahko zaznamo z izbranimi tehnikami pomnoževanja s PCR v realnem času, smo pripravili različne koncentracije standardne DNA. Pomnoževali smo standardno DNA krave, ki smo jo predhodno razredčili od  $10^{-1}$  do  $10^{-7}$ . Občutljivost smo določili kot najmanjšo koncentracijo pri kateri se je signal krivulje pomnoževanja dvignil nad signal ozadja. V primeru, da se je pri vzorcu pojavila vrednost  $C_t$ , a je bila krivulja pomnoževanja zelo netipična, smo rezultat označili kot negativen in kot občutljivost metode določili predhodno koncentracijo.

#### 3.3.7.2 Določitev praktične občutljivosti PCR v realnem času

Praktično občutljivost PCR v realnem času smo določali z mešanicami kravjega in ovčjega mleka oz. kravjega in kozjega mleka. Pripravili smo 14 mešanic mleka. Ovčjemu mleku

smo dodali 20 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % in 0 % (vol.) kravjega mleka. Enake deleže kravjega mleka smo uporabili tudi pri mešanicah s kozjim mlekom. Iz mešanic mleka smo izolirali DNA in vsakemu vzorcu pomerili koncentracijo. Vzorce za določanje praktične občutljivosti PCR v realnem času z ovčjim mlekom in vzorce s kozjim mlekom smo normalizirali na najvišjo možno koncentracijo, tako da smo jim dodali ustrezен volumen dH<sub>2</sub>O.

Praktično občutljivost PCR v realnem času smo določali pri nespecifični in specifični metodi določanja pomnožkov. Izolirano in normalizirano DNA različnih mešanic smo pomnoževali z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za kravo (BOS-F/BOS-R), in, pri specifični metodi določanja pomnožkov, še s sondo, specifično za kravo (BOS-P). Pri PCR v realnem času s specifično metodo določanja pomnožkov smo rezultat označili za pozitiven, če je signal pomnoževanja prišel nad signal ozadja in če je bila krivulja pomnoževanja tipične oblike. Pri nespecifični metodi detekcije pa smo poleg omenjenih parametrov upoštevali še temperaturo taljenja pomnožkov. Rezultat smo določili za negativen, če T<sub>m</sub> ni bila pravilna in ni bila znotraj meje odstopanja.

### 3.3.8 Določitev specifičnosti PCR v realnem času

Specifičnost PCR v realnem času smo preverili z nespecifično in s specifično metodo detekcije pomnožkov. Zbrali smo različne vzorce mleka in stranskih produktov proizvodnje mlečnih izdelkov. Uporabili smo 8 vzorcev kravjega mleka, 2 vzorca ovčjega mleka, 2 vzorca kozjega mleka in 4 vzorce stranskih produktov proizvodnje mlečnih izdelkov. Preverili smo tudi vpliv toplotne obdelave mleka na detekcijo s PCR v realnem času, 5 vzorcev je bilo toplotno obdelanih z metodo UHT, en vzorec smo sterilizirali v laboratorijskem avtoklavu (121 °C, 120 kPa, 20 min), enega pa smo pasterizirali v vodni kopeli (60 °C, 30 min). Podrobnejše so izbrani vzorci opisani v preglednici 17 skupaj z rezultati določanja specifičnosti PCR v realnem času.

Iz vzorcev smo izolirali DNA in jo pomnožili z nespecifično metodo določanja pomnožkov z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za kravo (BOS-F/BOS-R). Kot pozitivne rezultate smo določili tiste, kjer se je pojavila vrednost C<sub>t</sub>, so bile krivulje značilnih oblik in, v primeru nespecifične metode določanja pomnožkov, da je bila T<sub>m</sub> znotraj določenega območja. Nato smo določili pravilnost rezultata. Če je pri kravjem mleku rezultat pozitiven, ga določimo za pravilnega. V primeru, da je pri pomnoževanju DNA, izolirane iz kravjega mleka, rezultat negativen, je to napačno. Po enakem sistemu smo določili pravilnost rezultatov pomnoževanja DNA, izolirane iz kozjega in ovčjega mleka. Pri vzorcih iz stranskih produktov izdelave mlečnih izdelkov, smo kot pravilno šteli, da smo določili kravjo DNA. Odstotek pravilnih rezultatov pri posameznem pristopu določanja pomnožkov predstavlja specifičnost PCR.

### 3.3.9 qPCR kravjega mleka

S kvantitativnim PCR (qPCR) kravjega mleka smo določali odstotek kravjega mleka v mešanicah različnih vrst kozjega in ovčjega mleka, ki so vsebovale 5 %, 10 % in 20 % (vol.) kravjega mleka.

Odstotek kravjega mleka v mešanicah ovčjega in kozjega mleka smo izračunali z različnimi pristopi:

- a. z metodo standardne plazmidne DNA (López-Calleja in sod., 2007b),
- b. z metodo  $\Delta\Delta C_t$  (Livak in Schmittgen, 2001),
- c. s praktičnimi umeritvenimi krivuljami iz mešanic mleka (UK):
  - i. z umeritveno krivuljo za kozje mleko,
  - ii. z umeritveno krivuljo za ovče mleko.

Odstotek kravjega mleka smo z metodo standardne plazmidne DNA (López-Calleja in sod., 2007b) izračunali preko enačbe 1 (poglavlje 2.2.1).

Drug pristop h kvantifikaciji rezultatov PCR v realnem času je bila metoda, ki sta jo leta 2001 predstavila Livak in Schmittgen ter temelji na razliki  $C_t$  vrednosti ( $\Delta\Delta C_t$ ). Odstotek kravjega mleka smo v vzorcih (vz.) iz enačbe 4 izračunali glede na rezultate enega standardnega vzorca (st.).

Bradfordov reagent smo 5 krat redčili z ddH<sub>2</sub>O. Ravno tako smo z ddH<sub>2</sub>O pripravili različne razredčitve mleka. V mikrotitrsko ploščico smo nanesli 4 µL ustreznograzredčenega mleka in 196 µL razredčenega Bradfordovega reagenta. Na enak način smo pripravili tudi slepi poskus, le da smo namesto mleka kot vzorec uporabili ddH<sub>2</sub>O. Po 5 min inkubaciji smo merili absorbanco vzorcev s čitalcem mikrotitrskih ploščic. Iz dobljene absorbance smo po enačbi umeritvene krivulje (enačba 5) s pomočjo enačbe 6 izračunali koncentracijo proteinov v razredčenem mleku. Umeritvena krivulja (priloga D) je bila predhodno izdelana v laboratoriju za proteomiko iz različnih koncentracij govejega serumskega albumina (BSA). Za nadaljnjo uporabo smo izbrali tisto redčitev mleka, ki je dala koncentracijo proteinov okoli 1 g/L.

Ločilni gel za elektroforezo SDS-PAGE smo pripravili iz 13 mL ddH<sub>2</sub>O, 0,4 mL 10 % (w/v) SDS; 15,7 mL raztopine akrilamid/bisakrilamid (30 % : 0,8 %), 9,8 mL 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 195 µL 10 % APS (w/v) in 13 µL TEMED. Navedene količine ustrezajo za pripravo dveh gelov. Po 19 mL tako pripravljenega ločilnega gela smo prenesli v čista steklena oblikovala in prekrili s 3 mL ddH<sub>2</sub>O, ki je preprečila izsušitev in onemogočila dostop kisika. Gel je čez noč polimeriziral, naslednji dan smo odlili ddH<sub>2</sub>O in ga dobro osušili.

Iz 1,33 mL raztopine akrilamid/bisakrilamid (30 % : 0,8 %), 2,5 mL 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,1 mL 10 % SDS (w/v), 6 mL ddH<sub>2</sub>O, 50 µL 10 % (w/v) APS in 5 µL TEMED smo pripravili koncentracijski gel. Na polimeriziran ločilni gel smo dodali glavnicek, ki ustvari prostorčke za nanos vzorca. Steklena oblikovala smo dopolnili s koncentracijskim gelom in počakali, da je polimeriziral. Odstranili smo glavnicek in gel sprali z ddH<sub>2</sub>O.

Po 100 µg vzorcev proteinov smo raztopili v 100 µL ekstrakcijskega pufra (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4 % (w/v), IPG pufer 2 % (v/v), DTT 1 % (w/v)), nato smo 8 µL posamezne raztopine dodali 6 µL ddH<sub>2</sub>O, 1 µL 20x raztopine DTT in 5 µL 4x nanašalnega pufra (PLB). Tako pripravljene vzorce smo po 20 µL s pipeto nanašali v jamice v koncentracijskem gelu.

Gele smo prenesli v posode za izvedbo elektroforeze in jih prelimili z 1x SDS pufrom (25 mM Tris-Baza, 192 mM glicin, 0,1 % SDS.). Napravo smo priključili na električni tok tako, da je ločevanje potekalo v dveh fazah:

- 15 min pri 20 mA/gel (prva faza),
- približno 2 h pri 40 mA/gel (druga faza).

Potovanje proteinov smo spremljali s pomočjo spremljanja fronte barvila bromfenol modro, ki v gelu najhitreje potuje. Elektroforezo smo prekinili po približno 2 h oz. ko je fronta doseglja spodnji del gela.

Gele smo previdno odstranili iz oblikoval in jih fiksirali ter obarvali v štirih korakih:

- 2x 30 min v fiksacijskem pufru (50 % (v/v) metanol, 7 % (v/v) acetna kislina),
- čez noč v barvilu Sypro Ruby,
- 2x 30 min v raztopini za izpiranje (10 % (v/v) metanol, 7 % (v/v) acetna kislina),
- 2x 5 min in 1x 15 min v ddH<sub>2</sub>O.

Gele smo takoj po barvanju slikali z napravo CAM-GX-CHEMI HR (Syngene). Po slikanju smo gele zavarili v plastične mape in jih hrаниli pri 4 °C.

### 3.3.13 2-D elektroforeza

2-D elektroforeza je potekala v dveh stopnjah. Izvedli smo jo po metodi s spremembo prve dimenzijskega izoselektričnega fokusiranja, ki jo je uvedel O'Farrel (1975) (Görg in sod., 1991). Najprej smo izvedli prvo fazo 2-D elektroforeze, izoselektrično fokusiranje. Pri izoselektričnem fokusiranju so se proteini razporedili po njihovi izoselektrični točki glede na pH gradient na traku za izoselektrično fokusiranje. V drugi fazi 2-D elektroforeze smo proteine ponovno ločili s pomočjo SDS-PAGE elektroforeze, pri kateri so se proteini razporedili po masi.

Prvi korak pri izvedbi 2-D elektroforeze je rehidracija trakov za izoselektrično fokusiranje z imobiliziranim pH gradientom. V 270 µL rehidracijskega pufra (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2 % (w/v), IPG pufer 2 % (v/v), BFM 0,002 % (w/v)) s 3 mg DTT/mL smo raztopili 100 µg ekstrahiranih proteinov. V sredino reže na podstavku za rehidracijo trakov smo s pipeto prenesli 250 µL tako pripravljenega vzorca in vanj položili ter omočili trak za izoselektrično fokusiranje z imobiliziranim pH gradientom (3-10). Da smo preprečili izhlapevanje, smo trakove prekrili s 3 mL mineralnega olja, in rehidracija je potekla čez noč.

Naslednji dan je potekalo izoselektrično fokusiranje. Rehidriran trak za izoselektrično fokusiranje z imobiliziranim pH gradientom smo sprali z ddH<sub>2</sub>O in tako odstranili nevezane proteine. Trak smo položili na hlajeno ploščo za izoselektrično fokusiranje (20 °C), pravokotno nanj smo položili dva elektrodna trakova, na katera smo namestili elektrodi. Trakove smo prelili s 150 mL mineralnega olja, da smo preprečili izhlapevanje. Elektroforeza je potekala v 4 različno dolgih fazah, pri katerih smo spremenjali električno napetost:

- 1 min pri dvigovanju električne napetosti do 300 V (prva faza),
- 1 h pri 300 V (druga faza),
- 1 h 30 min pri dvigovanju električne napetosti do 3500 V (tretja faza),
- 5 h pri 3500 V (četrta faza).

Po končanem izoselektričnem fokusiranju smo trakove do nadaljnje uporabe hranili pri -80 °C.

Gel za drugo fazo ločevanja proteinov z 2-D elektroforezo smo pripravili tako, da smo zmešali 13 mL ddH<sub>2</sub>O, 0,4 mL 10 % (w/v) SDS; 15,7 mL raztopine akrilamid/bisakrilamid (30 % : 0,8 %), 9,8 mL 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 195 µL 10 % APS (w/v) in 13 µL TEMED. Navedene količine ustrezajo za pripravo dveh gelov. Po 19 mL raztopine gela

smo vlili v čista steklena oblikovala in na vrh gela dodali ddH<sub>2</sub>O, da smo onemogočili dostop kisika. Polimerizacija gela je potekla čez noč, vodo smo odlili in gele osušili.

Trakove, na katerih je poteklo izoelektrično fokusiranje proteinov, smo pred uporabo uravnotežili v dveh korakih. Najprej smo jih 15 min inkubirali na stresalniku v mešanici pufra za uravnoteženje (Tris-HCl 75 mM (pH 8,8); urea 6 M, glicerol 30 % (v/v), SDS 2 % (w/v), BFM 0,002 % (w/v)) in 65 mM DTT, nato še 15 min v mešanici pufra za uravnoteženje in 260 mM JAA.

Na osušene polimerizirane gele smo dodali 5 mL agarozne raztopine (0,5 g agaroza, 1 kristalček BFM, 1x SDS pufer do 100 mL), ki smo jo stopili v mikrovalovni pečici. V agarozno raztopino smo vstavili trakove za izoelektrično fokusiranje tako, da so ležali na polimeriziranem gelu.

Ko se je agaroza strdila, smo gele prenesli v posode za izvedbo SDS-PAGE elektroforeze in izvedli ločevanje, tako kot je opisano v poglavju 3.3.12.

Gele smo fiksirali, barvali in slikali, kot je opisano v poglavju 3.3.12.

2-D gele smo primerjali s programom GeneSnap in določili lise, specifične za proteine kravjega mleka. Te lise smo iz gela izrezali in jih poslali na dodatne analize z masno spektrometrijo na Oddelek za biologijo Univerze v Yorku (VB). Izvedli so MALDI-MS/MS spektrometrijo in proteinske lise, s pomočjo podatkovne zbirke NCBI (National Center for Biotechnology Information, ZDA), identificirali.

## 4 REZULTATI Z RAZPRAVO

### 4.1 ŠTEVILO SOMATSKIH CELIC

Število somatskih celic (ŠSC) v vzorcih mleka so določili na Inštitutu za mlekarstvo in probiotike. Zaradi pojava kosmičenja ob tajanju mleka, nekaterih vzorcev ni bilo mogoče analizirati (Matijašec in Podkrajšek, 2013). Rezultati so prikazani v preglednici 8, celoten izvid pa je priložen v prilogi E.

Preglednica 8: Število somatskih celic v vzorcih kravjega, kozjega in ovčjega mleka (Matijašec in Podkrajšek, 2013).

Vzorec	Oznaka vzorca	ŠSC/mL
Surovo ovčje mleko (planina Mangart)	2441/6-1	2 772 000
Surovo kozje mleko (planina Mangart)	2441/6-2	923 000
Sterilno kravje mleko (tržnica Koseze)	2441/6-3	NP
Surovo kravje mleko (tržnica Koseze)	2441/6-4	NP
Surovo kozje mleko (tržnica Koseze)	2441/6-5	NP
Surovo ovčje mleko (tržnica Koseze)	2441/6-6	2 236 000

**Legenda:** NP: vzorci niso bili analizirani zaradi pojava kosmičenja mleka; ŠSC: število somatskih celic.

Kljub pomanjkljivim rezultatom smo lahko razbrali, da je bilo število somatskih celic v vzorcih zelo različno. Žal, analiza kravjega mleka zaradi kosmičenja ni uspela. Vendar smo upali, da je kravje mleko po številu somatskih celic vseeno ustrezalo. Iz istih razlogov ni bila opravljena analiza surovega kozjega mleka, kupljenega na tržnici Koseze. Predvidevali smo, da je število somatskih celic v enakem rangu, kot število somatskih celic v surovem kozjem mleku s planine Mangart. Normalne vrednosti števila somatskih celic pri kozjem mleku se gibljejo med 750 000 in 5,4 milijona SC/mL (Park in Haenlein, 2006). Izmerjena vrednost pri vzorcu kozjega mleka s planine Mangart je torej v območju normalnih vrednosti števila somatskih celic. Izven normalnega območja 500 000 do 1 000 000 SC/mL (Park in Haenlein, 2006) pa sta bila oba vzorca ovčjega mleka. Ker je ovčje mleko na slovenskem tržišču težko dostopno, v času praktičnega izvajanja magistrskega dela, ni bilo mogoče najti drugih vzorcev ovčjega mleka.

### 4.2 OPTIMIZACIJA IZOLACIJE DNA IZ MLEKA

Za izolacijo DNA smo uporabili različne metode, ki so vključevale komercialne komplete, klasično izolacijo in protokole, ki smo jih povzeli po strokovnih objavah (Bonaiti in sod., 2006; De in sod., 2011; Murphy in sod., 2002). Skupno smo preizkusili 12 različnih metod izolacije DNA iz mleka.

## 4.2.1 Komercialni kompleti

### 4.2.1.1 NucleoSpin Food

Izolacijo DNA iz mleka s komercialnim kompletom NucleoSpin Food smo izvedli iz začetnega volumna 1 mL, elucijski volumen pa je bil 100  $\mu$ L. Povprečna koncentracija DNA je znašala 7,3 ng/ $\mu$ L, povprečna čistost za razmerje: A260/A280 1,858 in za razmerje: A260/A230 0,638 (preglednica 9). Želeli smo primerjati tudi vpliv razbijanja celic s kroglicami in vpliv čiščenja s pufrom PBS. Vendar nismo opazili razlik v čistosti ali koncentraciji izolirane DNA med vzorci, ki smo jih predpripravili s kroglicami, ali očistili s PBS, in vzorci, ki jih nismo predpripravili. Rezultati, prikazani v preglednici 9, predstavljajo povprečje vseh izolacij s kompletom NucleoSpin Food.

### 4.2.1.2 QIAprep Spin Miniprep

Izolacijo s komercialnim kompletom QIAprep Spin Miniprep smo delali iz 5 mL in iz 1 mL začetnega volumna mleka. Obakrat smo za elucijo uporabili 50  $\mu$ L elucijskega pufra. Preračunane vrednosti na začetni volumen mleka 1 mL in elucijski volumen 100  $\mu$ L kažejo, da je povprečna koncentracija izolirane DNA 1,6 ng/ $\mu$ L (preglednica 9). Čistost izolirane DNA je bila odvisna od začetnega volumna mleka. Povprečno je za začetni volumen 5 mL razmerje A260/A280 znašalo: 1,318 in za razmerje A260/A230: 0,276. Povprečna čistost pri začetnem volumnu 1 mL pa je za razmerje A260/A280 znašala: 1,646 in za razmerje A260/A230: 0,222.

### 4.2.1.3 DNeasy Blood & Tissue

Pri komercialnem kompletu DNeasy Blood & Tissue smo uporabili različna začetna volumna mleka, enkrat smo izhajali iz 1 mL, drugič pa iz 10 mL mleka. Elucijski volumen je bil višji in je znašal 200  $\mu$ L. Če končno koncentracijo izolirane DNA preračunamo na začetni volumen mleka 1 mL in elucijski volumen 100  $\mu$ L, dobimo, da je povprečna koncentracija znašala 6,0 ng/ $\mu$ L (preglednica 9). Povprečna čistost je bila za razmerje A260/A280: 1,584 in za razmerje A260/A230: 0,526.

### 4.2.1.4 DNeasy Food

Za izolacijo DNA iz mleka smo preizkusili tudi komercialni komplet DNeasy Food. Izolacija je potekala iz 2 mL mleka, na koncu pa smo DNA eluirali s 150  $\mu$ L topila. Ko dobljene rezultate preračunamo na začetni volumen 1 mL in elucijski volumen 100  $\mu$ L, vidimo, da je bila povprečna koncentracija izolirane DNA 2,9 ng/ $\mu$ L, čistost pa je znašala 1,343 za razmerje A260/A280 in 0,518 za razmerje A260/A230 (preglednica 9).

#### 4.2.1.5 SmartHelix First DNAid

DNA smo iz mleka izolirali tudi s komercialnim kompletom SmartHelix First DNAid. Izhajali smo iz 2 mL začetnega volumna mleka, za elucijo pa smo uporabili 100 µL elucijskega pufra. Izmerjeno koncentracijo DNA smo preračunali na 1 mL začetnega volumna mleka. Povprečna normalizirana koncentracija znaša 5,9 ng/µL, njena povprečna čistost pa je za razmerje A260/A280: 1,768 in za razmerje A260/A230: 0,767 (preglednica 9).

#### 4.2.1.6 SmartHelix Complex Samples

DNA iz mleka smo poskusili izolirati tudi s komercialnim kompletom SmartHelix Complex Samples. Izolacijo smo začeli s 500 µL mleka in zaključili z raztapljanjem oborjene DNA v 50 µL H<sub>2</sub>O. Ko preračunamo na začetni volumen mleka 1 mL in na volumen topila 100 µL, se pokaže, da je koncentracija izolirane DNA visoka in povprečno znaša 60,0 ng/µL (preglednica 9). Tudi povprečje čistosti izolirane DNA je optimalno in znaša za razmerje A260/A280: 1,867 in za razmerje A260/A239: 1,655.

### 4.2.2 Klasični načini izolacije DNA

Pri klasičnem načinu izolacije DNA smo temeljili na postopku, ki so ga opisali De in sod. (2011). Preizkusili smo enkratno izolacijo DNA s fenol-kloroformom in dvakratno izolacijo DNA s fenol-kloroformom.

#### 4.2.2.1 Izolacija DNA s fenol-kloroformom po De in sod. (2011)

DNA smo iz vzorcev mleka izolirali s klasično metodo izolacije s fenol-kloroformom. Izhodiščni volumen mleka je bil 1 mL ali 10 mL, DNA pa smo topili v 25 µL ali 50 µL H<sub>2</sub>O. V preglednici 9 so prikazani dobljeni rezultati koncentracije in čistosti izolirane DNA, v zadnjih stolpcih pa je koncentracija normalizirana na začetni volumen 1 mL mleka in na 100 µL topila. Povprečna normalizirana koncentracija je znašala 306,6 ng/µL, vendar je bila njena čistost slaba.

#### 4.2.2.2 Dvakratna izolacija DNA s fenol-kloroformom

Dvakratno izolacijo DNA s fenol-kloroformom smo izvedli tako, da smo po 4.2.2.1 izolirano DNA ponovno čistili s fenol-kloroformom. Izmerjene koncentracije smo normalizirali na 1 mL začetnega volumna mleka pri prvi izolaciji in na 100 µL topila pri drugi izolaciji. Povprečna normalizirana koncentracija znaša 98,7 ng/µL. Vendar je čistost še vedno zelo slaba.

#### 4.2.3 Kombinirane metode izolacije DNA

S kombiniranimi metodami izolacije DNA smo poskušali DNA, izolirano s klasično fenol-kloroformno izolacijo, očistiti z uporabo komercialnih kompletov. Rezultati kombiniranih izolacij so podani v preglednici 9.

##### 4.2.3.1 Fenol-kloroform in komercialni komplet NucleoSpin Food

Klasično izolacijo DNA s fenol-kloroformom smo kombinirali tudi s komercialnim kompletom NucleoSpin Food. Najprej smo izolirali DNA s fenol-kloroformom, nato pa smo dobljeno suspenzijo čistili s komplemom NucleoSpin Food. Končno koncentracijo DNA smo normalizirali na 1 mL začetni volumen mleka za fenol-kloroform izolacijo in na 100  $\mu$ L elucijski volumen pri komercialnem kompletu NucleoSpin Food. Normalizirana koncentracija DNA je zelo nizka (1,7 ng/ $\mu$ L).

##### 4.2.3.2 Fenol-kloroformom in komercialni komplet DNeasy Food & Tissue

Podobno, kot smo opisali zgoraj, smo preizkusili izolirati DNA s kombinacijo klasične fenol-kloroformne izolacije in komercialnega kompleta DNeasy Food & Tissue. Izmerjene koncentracije smo normalizirali na 1 mL začetnega volumena mleka pri klasični izolaciji in na 100  $\mu$ L topila pri izolaciji s komercialnim komplemom. Vidimo lahko, da je koncentracija sicer visoka, ampak je odstopanje od povprečne vrednosti preveliko. Ravno tako je čistost slaba.

##### 4.2.3.3 Izolacija DNA po Bonaiti in sod. (2006)

DNA smo iz mleka izolirali tudi po metodi, ki so jo opisali Bonaiti in sod. (2006). Na koncu smo izmerjene vrednosti dobljene DNA preračunali na 1 mL začetnega volumena mleka in na 100  $\mu$ L končnega topila. Vidimo lahko, da je bila dobljena koncentracija zelo nizka, čistost izolirane DNA pa zelo slaba (preglednica 9).

##### 4.2.3.4 Izolacija DNA po Murphy in sod. (2002)

Za izolacijo DNA iz mleka smo preizkusili metodo, ki so jo leta 2002 opisali Murphy in sodelavci. Dobljena koncentracija DNA je preračunana na začetni volumen mleka 1 mL in na vsebnost topila 100  $\mu$ L. Koncentracija DNA je zelo visoka, vendar je njena čistost preslabna (preglednica 9).

#### 4.2.4 Zbir rezultatov optimizacije izolacije DNA

Rezultate različnih izolacij DNA iz mleka smo zbrali v preglednici 9. Da bi metode izolacije lahko med seboj primerjali po koncentraciji izolirane DNA, smo izmerjeno koncentracijo normalizirali tako, da smo jo preračunali na začetni volumen vzorca 1 mL in na elucijski volumen 100 µL. Normalizirane vrednosti so v preglednici podane v stolpcu  $C_n \pm SD$ .

Preglednica 9: Koncentracija in čistost DNA, izolirane z različnimi postopki iz mleka

Način izolacije		$V_{vzorca}$ (mL)	A260/A280 ± SD	A260/A230 ± SD	$C \pm SD$ (ng/µL)	$C_n \pm SD$ (ng/µL)
Komercialni kompleti	NucleoSpin Food	1	1,858 ± 0,533	0,638 ± 0,110	7,3 ± 2,2	7,3 ± 2,2
	QIAprep Spin Miniprep	5	1,318 ± 0,081	0,276 ± 0,034	15,5 ± 1,4	1,6 ± 0,7
		1	1,646 ± 0,118	0,222 ± 0,091	3,3 ± 2,5	
	DNeasy Blood & Tissue	10	1,568 ± 0,247	0,754 ± 0,449	3,5 ± 1,0	6,0 ± 2,0
		1	1,600 ± 0,095	0,298 ± 0,117	24,7 ± 8,3	
	DNeasy Food	2	1,343 ± 0,323	0,518 ± 0,229	3,9 ± 2,4	2,9 ± 1,8
Klasični načini	SmartHelix First DNAid	2	1,768 ± 0,025	0,767 ± 0,094	11,8 ± 1,8	5,9 ± 0,9
	SmartHelix Complex Samples	0,5	1,867 ± 0,011	1,665 ± 0,303	60,0 ± 8,5	60,0 ± 8,5
	Izolacija DNA s FC	10	1,144 ± 0,030	0,397 ± 0,179	98,2 ± 114,3	306,6 ± 427,3
		1	1,568 ± 0,247	0,754 ± 0,449	3,5 ± 1,0	
	Dvakratna izolacija DNA s FC	10	1,120 ± 0,139	0,551 ± 0,0877	38,0 ± 21,2	98,7 ± 95,4
		1	0,905 ± 0,105	0,862 ± 0,33	35,1 ± 22,6	

Se nadaljuje ...

... nadaljevanje: Preglednica 9: Koncentracija in čistost DNA, izolirane z različnimi postopki iz mleka

Način izolacije	V <sub>vzorca</sub> (mL)	A260/A280 ± SD	A260/A230 ± SD	C ± SD (ng/µL)	C <sub>n</sub> ± SD (ng/µL)
Kombinirani načini	FC in NucleoSpin Food	10 1	1,738 ± 0,100 2,500 ± 0,707	0,492 ± 0,068 0,450 ± 0,450	16,8 ± 9,5 1,8 ± 0,4
	FC in DNeasy Blood & Tissue	10	4,449 ± 0	0,700 ± 0	838,0 ± 0
		1	4,403 ± 0,079	0,632 ± 0,371	651,3 ± 343,3
	Bonaiti in sod. (2006)	2	0,480 ± 0,138	0,211 ± 0	7,0 ± 0,7
	Murphy in sod. (2002)	50	1,067 ± 0,004	0,266 ± 0,041	192,0 ± 0,7

**Legenda:** V<sub>vzorca</sub>: začetni volumen vzorca; FC: Izolacija DNA s fenol-kloroformom; C ± SD: povprečje in standardni odklon izmerjenih koncentracij DNA; C<sub>n</sub> ± SD: povprečje in standardni odklon koncentracije DNA, ki smo jo normalizirali na začetni volumen vzorca 1 mL in na elucijski volumen 100 µL

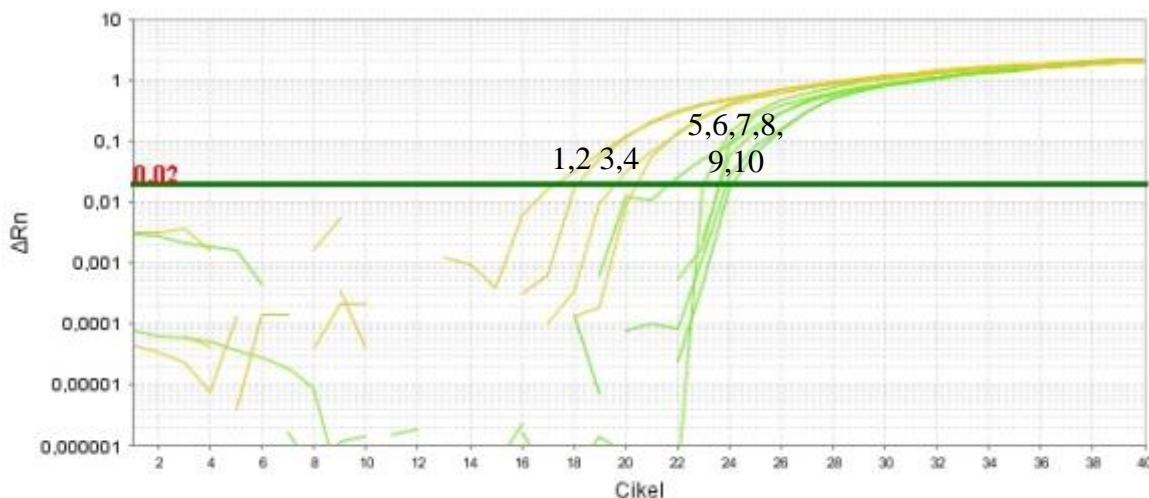
Uspešnost izolacije DNA določamo glede na koncentracijo izolirane DNA in glede na čistost, določeno z razmerjem absorbanc. DNA velja za čisto, če sta razmerji A260/A280 in A260/230 višji od 1,8 (Understanding and measuring ... , 2011). Med opravljenimi postopki izolacije DNA iz mleka smo iskali takega, kjer je bila koncentracija čim višja in po paralelkah čim bolj enotna, hkrati pa bi bila čistost optimalna.

Glede na spektrofotometrične meritve, kot najboljši postopek izolacije DNA, določimo izolacijo s komercialnim kompletom SmartHelix Complex Samples. Najslabše rezultate pa smo dobili s postopkom, ki so ga opisali Bonaiti in sod. (2006). Pričakovali smo, da se bo ravno ta postopek izkazal za dobrega, saj so ga Bonaiti in sod. (2006) razvili za ekstrakcijo DNA iz sira, in v objavi prikazali izolirano DNA visokih koncentracij in odlične čistosti. Metoda izolacije DNA iz mleka, ki so jo razvili Murphy in sod. (2002), uporablja EDTA, s katero odstranimo Ca<sup>2+</sup> ione, ki so znan inhibitor PCR (Bickley in sod., 1996; Wilson, 1997). Rezultati sicer kažejo nenavadno visoke vrednosti DNA, a je čistost slaba. Izolacijo s fenol-kloroformom smo povzeli po objavi De in sod. (2011). DNA so izolirali iz mleka in sirov in jo uspešno pomnožili s PCR. Povprečna izmerjena koncentracija naših vzorcev je visoka, a je standardna deviacija ogromna. Pri vseh načinih izolacije DNA, ki so nam dali visoko koncentracijo DNA (izolacija DNA s fenol-kloroformom, dvakratna izolacija DNA s fenol kloroformom in kombinirani načini izolacije), je bila navadno standardna deviacija

izredno visoka in/ali čistost ni bila ustrezna. Sklepamo lahko, da je visoka koncentracija DNA navidezna, in je lahko posledica nečistoč, ki so absorbirale svetlobo v podobnem območju (Understanding and measuring ... , 2011). Visoke vsebnosti DNA pri izolacijah, kjer je bil v metodo vključen fenol, so lahko samo navidezne. Maksimalna absorbanca fenola je pri 270 nm, medtem ko je maksimalna absorbanca DNA pri 260 nm, in spektra absorbance se deloma prekrivata. Kakršnikoli ostanki fenola v končnem izolatu DNA vplivajo na lažno določeno previsoko koncentracijo DNA, ker fenol delno absorbira tudi valovno dolžino 260 nm, s katero določamo DNA. Poleg tega fenol vpliva na nižanje razmerja A260/A230, ki bi v idealnih pogojih moral znašati med 1,8 in 2,0. Vzorci, kjer smo s fenolno izolacijo dobili visoko izmerjeno koncentracijo DNA, so imeli vedno zelo nizko razmerje A260/A230. Opazili smo tudi, da so imeli nekateri vzorci, kljub večkratnemu čiščenju z etanolom in sušenju na zraku, še vedno rahel, do močan vonj po fenolu. Posledično lahko sklepamo, da so v njih ostanki fenola, in izmerjen rezultat ni pravilen (Understanding and measuring ... , 2011). Ostanek fenola v izolirani DNA lahko inhibitorno vpliva na pomnoževanje s PCR (Demeke in Jenkins, 2010), kar lahko vodi do napačnih rezultatov.

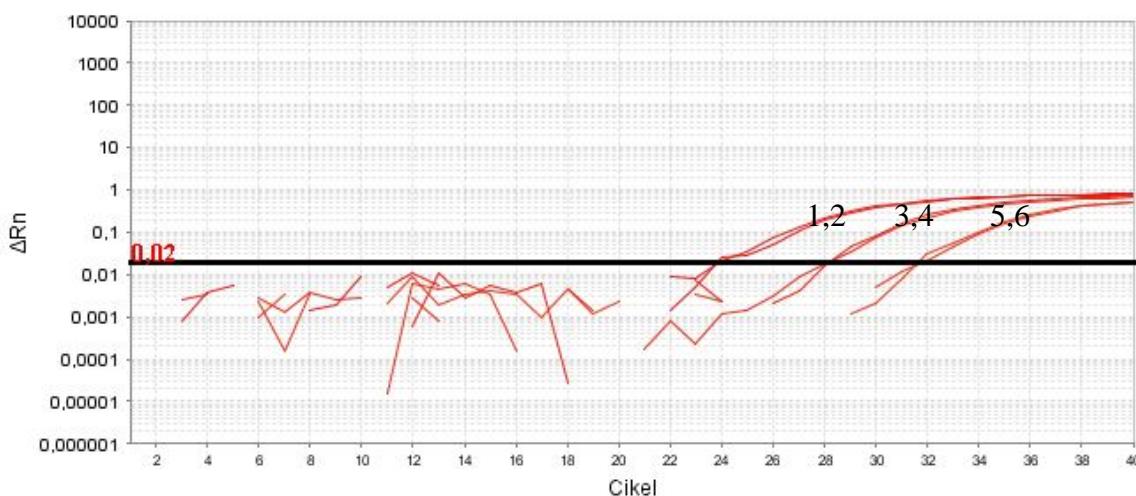
#### 4.2.5 Preverjanje kakovosti izolirane DNA s PCR v realnem času

Kakovost vzorcev izolirane DNA smo preverjali s PCR v realnem času. Rezultati so zbrani v preglednici 10 in prikazani na slikah od 8 do 19.



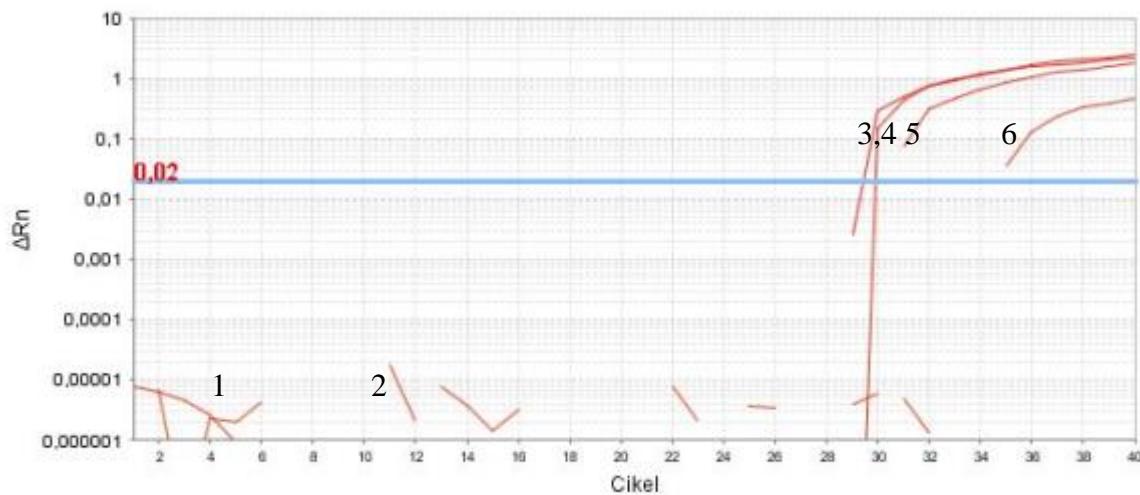
Slika 8: Pomnoževanje DNA izolirane iz mleka s komercialnim kompletom NucleoSpin Food

Legenda: **ΔRn:** normaliziran fluorescentni signal; **1, 2:** 8,0 ng/µL; **3, 4:** 1,6 ng/µL; **5, 6:** 0,8 ng/µL; **7, 8:** 0,3 ng/µL; **9, 10:** 0,2 ng/µL



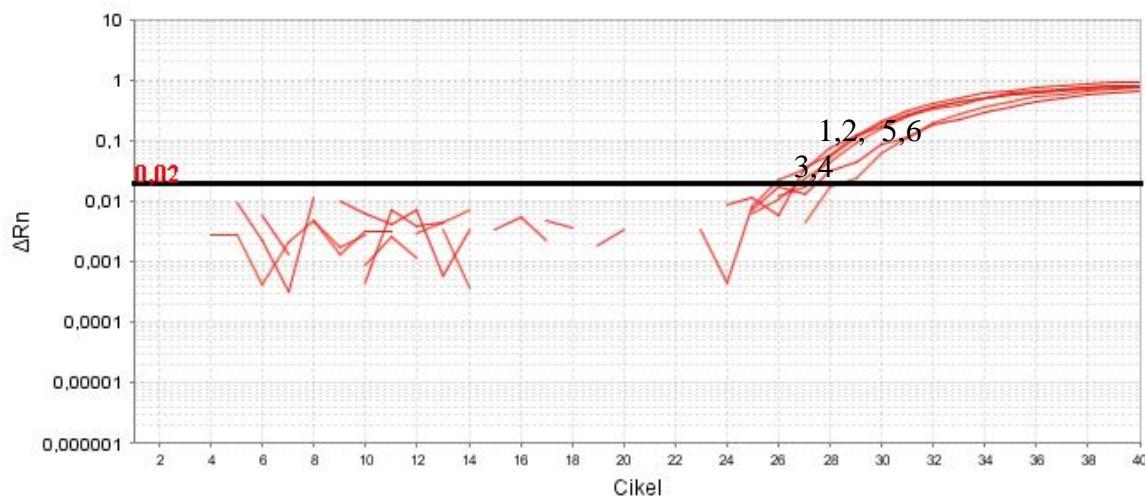
Slika 9: Pomnoževanje DNA izolirane s komercialnim kompletom QIAprep Spin Miniprep

Legenda: **1, 2:** 14,5 ng/µL; **3, 4:** 1,45 ng/µL; **5, 6:** 0,145 ng/µL



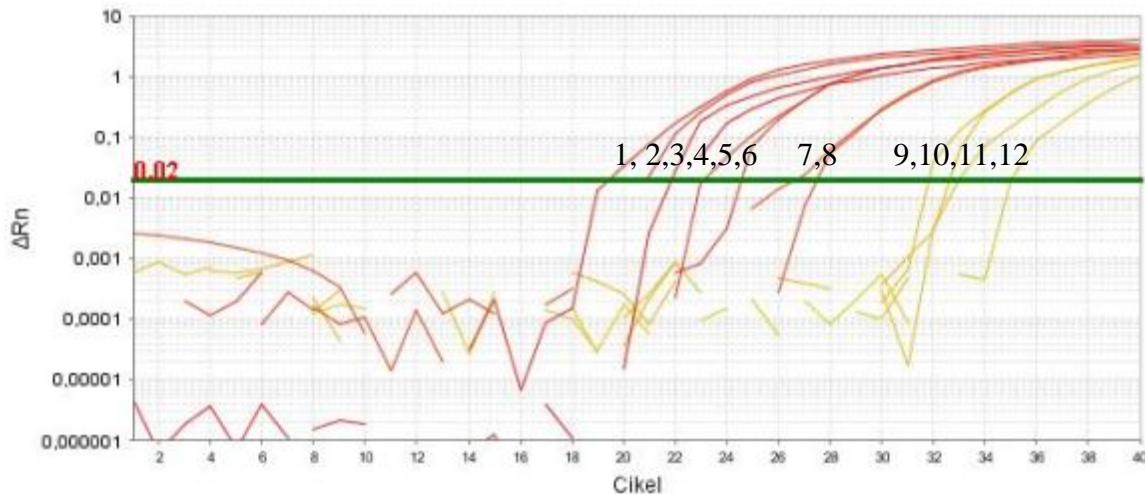
Slika 10: Pomnoževanje DNA izolirane iz mleka s komercialnim komplettom DNeasy Blood & Tissue

**Legenda:**  $\Delta Rn$ : normaliziran fluorescentni signal; 1, 2: 3,5 ng/ $\mu$ L; 3, 4: 0,35 ng/ $\mu$ L; 5, 6: 0,035 ng/ $\mu$ L



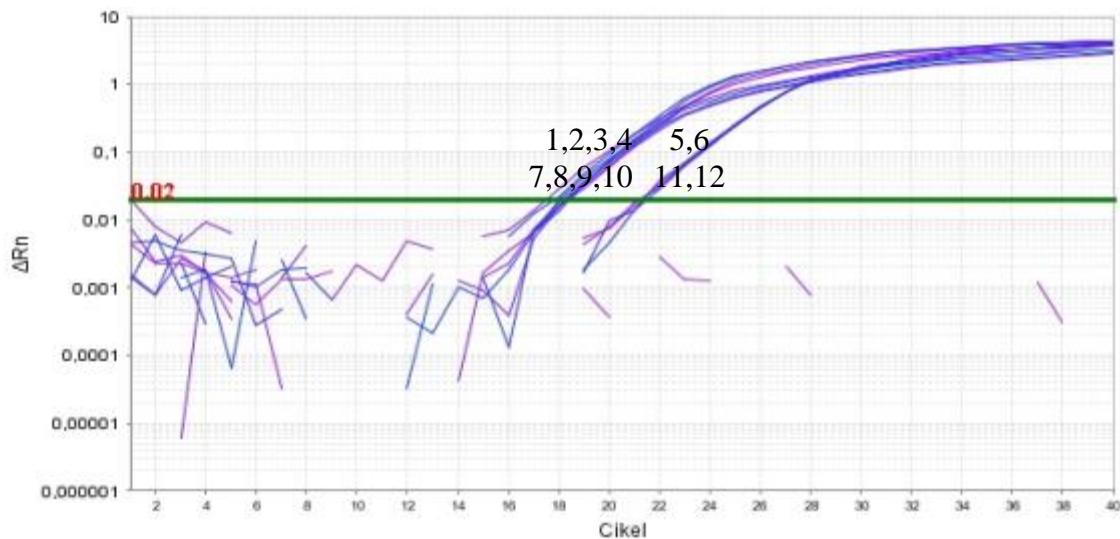
Slika 11: Pomnoževanje DNA izolirane iz mleka s komercialnim komplettom DNeasy Food

**Legenda:**  $\Delta Rn$ : normaliziran fluorescentni signal; 1, 2: 2,0 ng/ $\mu$ L; 3, 4: 0,20 ng/ $\mu$ L; 5, 6: 0,020 ng/ $\mu$ L.



Slika 12: Pomnoževanje DNA izolirane iz mleka s komercialnim kompletom SmartHelix First DNAid

**Legenda:**  $\Delta Rn$ : normaliziran fluorescentni signal; **1, 2:** 13 ng/ $\mu$ L; **3, 4:** 1,3 ng/ $\mu$ L; **5, 6:** 0,13 ng/ $\mu$ L; **7, 8:** 0,013 ng/ $\mu$ L; **9, 10:** 0,0013 ng/ $\mu$ L; **11, 12:** 0,00013 ng/ $\mu$ L



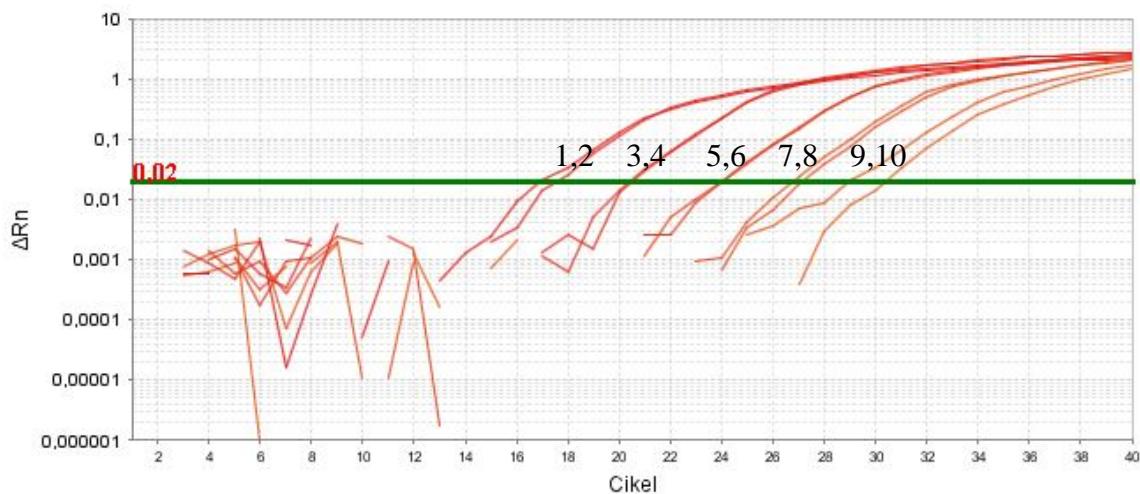
Slika 13: Pomnoževanje DNA izolirane iz mleka s komercialnim kompletom Smart Helix Complex Samples

**Legenda:**  $\Delta Rn$ : normaliziran fluorescentni signal; **1, 2:** vzorec 1, 66 ng/ $\mu$ L; **3, 4:** vzorec 1, 6,6 ng/ $\mu$ L; **5, 6:** vzorec 1, 0,66 ng/ $\mu$ L; **7, 8:** vzorec 2, 54 ng/ $\mu$ L; **9, 10:** vzorec 2, 54 ng/ $\mu$ L; **11, 12:** vzorec 2, 54 ng/ $\mu$ L.



Slika 14: Pomnoževanje DNA izolirane iz mleka s fenol-kloroformom

**Legenda:**  $\Delta Rn$ : normaliziran fluorescentni signal; 1, 2: 161,5 ng/ $\mu$ L; 3, 4: 16,15 ng/ $\mu$ L; 5, 6: 1,615 ng/ $\mu$ L.



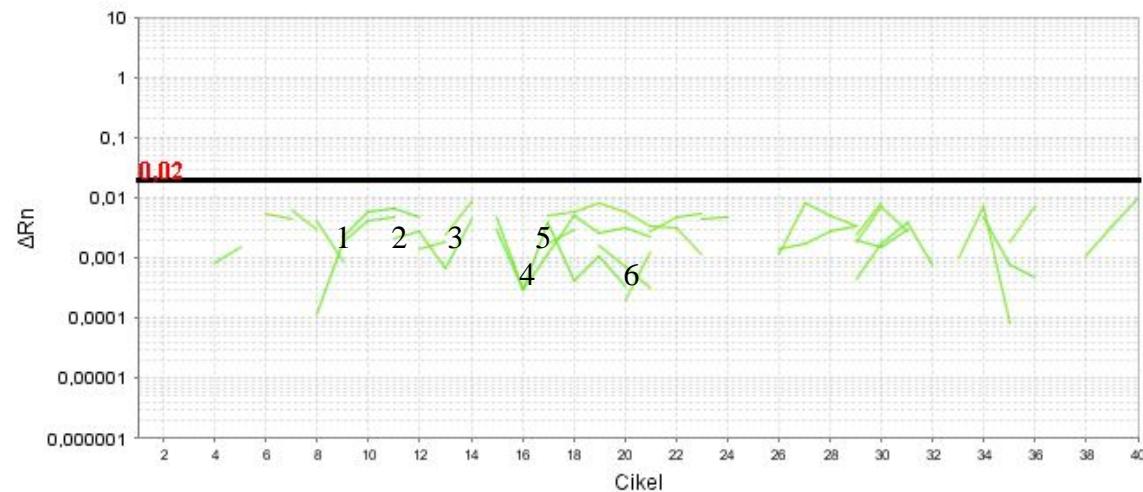
Slika 15: Pomnoževanje DNA izolirane iz mleka z dvakratno izolacijo s fenol-kloroformom

**Legenda:**  $\Delta Rn$ : normaliziran fluorescentni signal; 1, 2: 64,5 ng/ $\mu$ L; 3, 4: 6,45 ng/ $\mu$ L; 5, 6: 0,645 ng/ $\mu$ L; 7, 8: 0,0645 ng/ $\mu$ L; 9, 10: 0,00645 ng/ $\mu$ L.



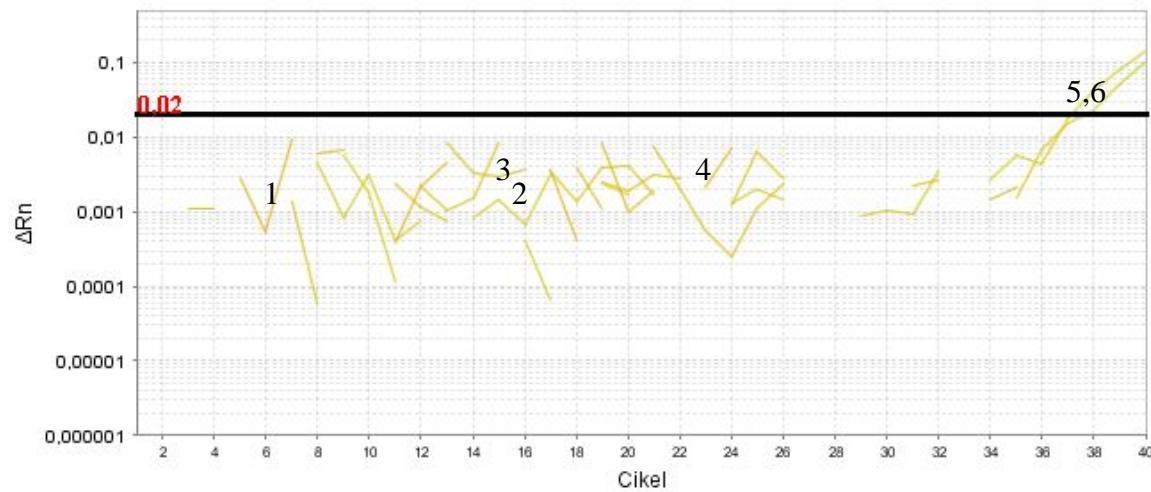
Slika 16: Pomnoževanje DNA izolirane iz mleka s fenol-kloroformom in komercialnim kompletom NucleoSpin Food

**Legenda:**  $\Delta Rn$ : normaliziran fluorescentni signal; **1, 2:** 10,0 ng/ $\mu$ L; **3, 4:** 1,0 ng/ $\mu$ L; **5, 6:** 0,1 ng/ $\mu$ L.



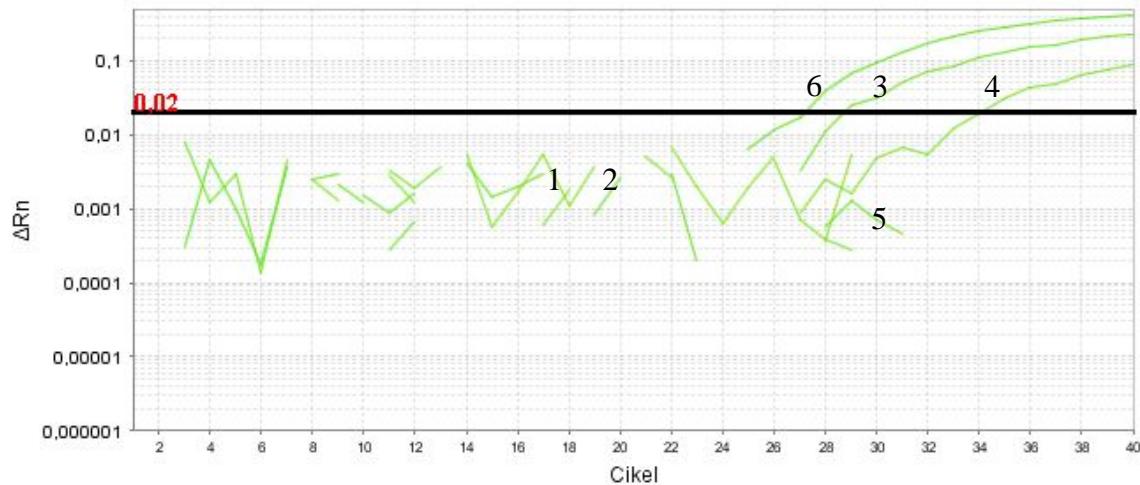
Slika 17: Pomnoževanje DNA izolirane iz mleka s fenol-kloroformom in komercialnim kompletom DNeasy Blood & Tissue

**Legenda:**  $\Delta Rn$ : normaliziran fluorescentni signal; **1, 2:** 10,0 ng/ $\mu$ L; **3, 4:** 1,0 ng/ $\mu$ L; **5, 6:** 0,1 ng/ $\mu$ L.



Slika 18: Pomnoževanje DNA izolirane iz mleka po protokolu Bonaiti in sod. (2006)

**Legenda:**  $\Delta Rn$ : normaliziran fluorescentni signal; 1, 2: 7,5 ng/ $\mu$ L; 3, 4: 0,75 ng/ $\mu$ L; 5, 6: 0,075 ng/ $\mu$ L.



Slika 19: Pomnoževanje DNA izolirane iz mleka po protokolu Murphy in sod. (2002)

**Legenda:**  $\Delta Rn$ : normaliziran fluorescentni signal; 1, 2: 192,5 ng/ $\mu$ L; 3, 4: 19,25 ng/ $\mu$ L; 5, 6: 1,925 ng/ $\mu$ L.

Preglednica 10: Rezultati PCR v realnem času za preverjanje kakovosti DNA izolirane iz vzorcev mleka z različnimi metodami

Način izolacije	Razredčitev	C (ng/µL)	C <sub>t</sub> ± SD (ng/µL)	R <sup>2</sup>	E (%)
NucleoSpin Food	D	8,0	17,8 ± 0,4	0,88	89,3
	10 <sup>-0,7</sup>	1,6	20,0 ± 0,4		
	10 <sup>-1</sup>	0,8	22,8 ± 0,2		
	10 <sup>-1,4</sup>	0,3	23 ± 1		
	10 <sup>-1,7</sup>	0,2	24,0 ± 0,3		
QIAprep Spin Miniprep	D	14,5	24,1 ± 0,0	1,00	82,9
	10 <sup>-1</sup>	1,45	28,3 ± 0,0		
	10 <sup>-2</sup>	0,145	32,0 ± 0,1		
DNeasy Blood & Tissue	D	3,5	Nedoločeno	0,56	88,2
	10 <sup>-1</sup>	0,35	28,6 ± 0,3		
	10 <sup>-2</sup>	0,035	26 ± 5		
DNeasy Food	D	2,0	27,1 ± 0,6	0,14	77 · 10 <sup>3</sup>
	10 <sup>-1</sup>	0,2	26,5 ± 0,5		
	10 <sup>-2</sup>	0,02	28 ± 1		
SmartHelix First DNAid	D	13	21,9 ± 0,6	0,89	126,3
	10 <sup>-1</sup>	1,3	20,2 ± 0,9		
	10 <sup>-2</sup>	0,13	23,8 ± 0,7		
	10 <sup>-3</sup>	0,013	27,1 ± 0,5		
	10 <sup>-4</sup>	0,0013	32,0 ± 0,5		
	10 <sup>-5</sup>	0,00013	35,0 ± 2		
SmartHelix Complex Samples	D	66	18,2 ± 0,1	0,76	302,7
	10 <sup>-1</sup>	6,6	18,2 ± 0,4		
	10 <sup>-2</sup>	0,66	21,5 ± 0,2		
	D	54	18,1 ± 0,8		
	10 <sup>-1</sup>	5,4	18,4 ± 0,1		
	10 <sup>-2</sup>	0,54	21,4 ± 0,1		
Izolacija DNA s FC	D	161,5	26,5 ± 0,7	0,97	126,9
	10 <sup>-1</sup>	16,15	29,5 ± 0,5		
	10 <sup>-2</sup>	1,615	32,1 ± 0,2		

Se nadaljuje ...

... nadaljevanje: Preglednica 10: Rezultati PCR v realnem času za preverjanje kakovosti DNA izolirane iz vzorcev mleka z različnimi metodami

Način izolacije	Razredčitev	C (ng/µL)	C <sub>t</sub> ± SD (ng/µL)	R <sup>2</sup>	E (%)
Dvakratna izolacija DNA s FC	D	64,5	17,4 ± 0,4	0,99	108,5
	10 <sup>-1</sup>	6,45	20,6 ± 0,0		
	10 <sup>-2</sup>	0,645	24,1 ± 0,1		
	10 <sup>-3</sup>	0,0645	27,1 ± 0,3		
	10 <sup>-4</sup>	0,00645	29,8 ± 0,9		
FC in NucleoSpin Food	D	10,0	25,8 ± 0,4	0,99	90,1
	10 <sup>-1</sup>	1,0	29,2 ± 0,5		
	10 <sup>-2</sup>	0,1	33,0 ± 0,1		
FC in DNeasy Blood & Tissue	D	838,0	Ni pomnoževanja	/	/
	10 <sup>-1</sup>	83,8	Ni pomnoževanja		
	10 <sup>-2</sup>	8,38	Ni pomnoževanja		
Bonaiti in sod. (2006)	D	7,5	Ni pomnoževanja	/	/
	10 <sup>-1</sup>	0,75	Ni pomnoževanja		
	10 <sup>-2</sup>	0,075	37,5 ± 0,3		
Murphy in sod. (2002)	D	192,5	Ni pomnoževanja	0,51	-39,6
	10 <sup>-1</sup>	19,25	31 ± 4		
	10 <sup>-2</sup>	1,914	26,8 ± 0,0		

**Legenda:** C: koncentracija DNA; C<sub>t</sub>: cikel meje določanja; R<sup>2</sup>: korelacijski faktor; E: učinkovitost PCR

Izolirano DNA smo pomnožili s PCR v realnem času z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za kravo, z namenom, da bi potrdili ali ovrgli domnevo, da slaba čistost in visok SD pri vzorcih DNA negativno vplivata na pomnoževanje. Zbrali in primerjali smo rezultate pomnoževanja: vrednost C<sub>t</sub>, odstopanje vrednosti C<sub>t</sub> med paralelkami, tipičnost krivulj, pojav inhibicije, R<sup>2</sup> standardne krivulje in E standardne krivulje.

Da bi potrdili ali ovrgli domnevo, da slaba čistost in visok SD pri vzorcih izoliranih s klasičnimi postopki izolacije DNA negativno vplivata na pomnoževanje DNA, smo tudi z nekaterimi vzorci DNA iz te skupine izvedli PCR. Rezultati zaradi pogostosti inhibicije, netipičnih krivulj in visokih vrednosti C<sub>t</sub>, večinoma niso bili zadovoljivi.

Kljub temu, da je po koncentraciji in čistosti izolirane DNA najbolj pozitivno izstopala izolacija s komercialnim kompletom SmartHelix Complex Samples, se pri pomnoževanju s PCR, zaradi pojava inhibicije, ni izkazalo tako. Tudi večina rezultatov ostalih izolacij DNA kaže na inhibicijo PCR pri neredčenih vzorcih DNA. Neredčeni vzorci imajo pogosto višjo vrednost C<sub>t</sub> (DNeasy Food, SmartHelix First DNAid, SmartHelix Complex

Samples), v skrajnih primerih pa do pomnoževanja sploh ni prišlo (DNeasy Blood & Tissue, FC in DNeasy Blood & Tissue, Bonaiti in sod. (2006), Murphy in sod. (2006)). Izjema so izolacije s fenol-kloroformom, izolacija s komercialnim kompletom NucleoSpin Food in kombinacija s fenol-kloroformom ter izolacija s komercialnim komplemom QIAprep Spin Miniprep, pri katerih inhibicija PCR ni opazna.

Najnižje vrednosti  $C_t$ , ki omogočajo nižjo mejo detekcije, ter  $R^2$  in E, ki se najbolj približata optimalnim vrednostim, so bile pri rezultatih pomnoževanja DNA izolirane z dvakratno izolacijo s fenol-kloroformom. Zadovoljive rezultate smo dobili tudi pri izolaciji s komercialnim kompleтом NucleoSpin Food. Komercialni komplet NucleoSpin Food je bil ugoden tudi z vidika enostavnosti, hitrosti izolacije DNA in finančne dostopnosti. Izolacija DNA iz mleka s komercialnim kompletom NucleoSpin Food poteka do 2 uri, medtem ko dvokratna izolacija s fenol-kloroformom lahko traja tudi do 3 dni. Vse nadaljnje izolacije DNA smo, če ni zapisano drugače, opravili s komercialnim kompletom NucleoSpin Food.

Primerjava rezultatov spektrofotometričnih meritev in rezultatov pomnoževanja PCR nam ne da jasne korelacije med določeno čistostjo in uspešnostjo PCR. Po koncentraciji in čistosti se je kot optimalna izkazala izolacija s komercialnim kompletom SmartHelix Complex Samples, a se je pri pomnoževanju s PCR zaradi inhibicije reakcije uvrstila med slabše metode. Nasprotno pa smo dvakratno izolacijo s fenol-kloroformom zaradi rezultatov spektrofotometričnih meritev (slaba čistost, visok SD koncentracije) šteli za slabšo metodo. Pri pomnoževanju s PCR pa se je ravno ta metoda odrezala kot najboljša, vendar je zaradi časovne zamudnosti nismo izbrali za nadaljnje delo. Iz rezultatov spektrofotometričnih meritev in rezultatov preverjanja kakovosti DNA s PCR v realnem času lahko zaključimo, da v primeru inhibicije PCR DNA mleka inhibitorno ne vplivajo snovi, ki jih določamo spektrofotometrično. Z razmerjem A260/A280 določamo, če DNA vsebuje nečistoče v obliki proteinov, in z razmerjem A260/A230, če DNA vsebuje nečistoče v obliki organskih snovi (npr. ogljikove hidrate, fenol, EDTA ...) (Understanding and measuring ..., 2011). V našem primeru inhibicija PCR ni bila vedno povezana s spektrofotometrično določeno slabo čistostjo izolirane DNA. Sklepamo lahko, da je inhibitorno vplivala snov, ki je pri spektrofotometričnem določanju čistosti DNA ne zaznamo. Bickley in sod. (1996) so kot močne inhibitorje PCR izpostavili ione kalcija, ki se vežejo z ioni magnezija v PCR mešanici, in preprečijo njihovo kofaktorsko funkcijo ter s tem onemogočijo delovanje polimeraze (Wilson, 1997).

#### 4.3 KAKOVOST STANDARDNE DNA

Standardno DNA, ki je vsebovala specifičen del za kravo in specifičen del za sesalce, smo pripravili tako, da smo vstavili specifičen pomnožek za sesalce v plazmidni vektor *E. coli* (JM109 High Efficiency Competent Cells) (preglednica 11).

Preglednica 11: Koncentracija in čistost standardne DNA

Način izolacije	Vzorec	V <sub>vzorca</sub> (mL)	A260/A280	A260/A230	C (ng/µL)
GeneElutePlasmid Miniprep Kit	1	1	1,714	0,857	60,5
	2		1,652	0,944	60,0

S PCR v realnem času s specifično metodo določanja pomnožkov smo preverili, če je v izoliranem plazmidu prisoten izbran specifičen odsek DNA sesalcev in specifičen del DNA krave. Rezultati pomnoževanja so prikazani v preglednici 12.

Preglednica 12: Rezultati pomnoževanja standardne DNA z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za sesalce (MAN) in za kravo (BOS)

Vzorec plazmida	Začetni oligonukleotid	Vzorec	Razredčitev	Koncentracija (ng/µL)	C <sub>t</sub>
1	MAN-F/MAN-R	1	D	60,5	15,8
		2	10 <sup>-1</sup>	6,05	14,8
		3	10 <sup>-2</sup>	0,605	19,7
	BOS-F/BOS-R	4	D	60,5	11,3
		5	10 <sup>-1</sup>	6,05	10,9
		6	10 <sup>-2</sup>	0,605	13,1
2	MAN-F/MAN-R	7	D	60,0	12,9
		8	10 <sup>-1</sup>	0,60	14,4
		9	10 <sup>-2</sup>	0,060	19,7
	BOS-F/BOS-R	10	D	60,0	4,9
		11	10 <sup>-1</sup>	0,60	9,9
		12	10 <sup>-2</sup>	0,060	13,5

**Legenda:** **MAN-F/MAN-R:** začetni oligonukleotidi, specifični za sesalce; **BOS-F/BOS-R:** začetni oligonukleotidi, specifični za kravo; **C<sub>t</sub>:** cikel meje določanja

Standradna DNA krave je imela visoko koncentracijo (60 ng/µL). Pričakovali smo, da bo pomnoževanje s PCR v realnem času uspešno in da bomo dobili nizke vrednosti C<sub>t</sub>, ki bodo z redčenjem vzorca naraščale. Poleg tega smo pričakovali podobne vrednosti C<sub>t</sub> pri

pomnoževanju standardne DNA krave z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za kravo (BOS), in začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za sesalce (MAN). Izkazalo se je, da vrednost  $C_t$  ni vedno naraščala z redčenjem vzorca. Razlagamo si lahko, da je višji  $C_t$  pri nekaterih neredčenih vzorcih (vzorec plazmida 1) posledica inhibitorjev v pripravljeni standardni DNA (Wilson, 1997). Presenetila nas je tudi velika razlika med vrednostmi  $C_t$  pri istih razredčitvah, pomnoženih z začetnimi oligonukleotidi BOS in MAN. Razlog za to je lahko v dizajnu začetnih oligonukleotidov (López-Calleja in sod., 2007b) (poglavlji 2.3.1 in 4.7 (Applied Biosystems, 2005; Ann Van Hee, 2013)), kar pa ni bil namen magistrskega dela.

#### 4.4 OPTIMIZACIJA PCR V REALNEM ČASU

##### 4.4.1 Nespecifična metoda določanja pomnožkov

Optimizacija PCR v realnem času za določevanje potvorb ovčjega in kozjega mleka s kravjim mlekom je potekala v dveh stopnjah. Najprej smo optimizirali koncentracijo začetnih oligonukleotidov, specifičnih za kravo (BOS), nato pa smo optimizirali koncentracijo začetnih oligonukleotidov, ki so specifični za vse sesalce (MAN) in služijo kot pozitivna kontrola in referenčni del za kvantifikacijo.

Optimizacijo PCR v realnem času smo izvedli z različnimi reakcijskimi mešanicami z volumnom 25  $\mu\text{L}$  in z volumnom DNA v reakcijski mešanici 2,5  $\mu\text{L}$ . Spreminjali smo koncentracijo posameznih parov začetnih oligonukleotidov.

###### 4.4.1.1 Začetni oligonukleotidi, specifični za kravo

V sklopu optimizacije PCR v realnem času smo preizkusili različne kombinacije koncentracij začetnih oligonukleotidov, specifičnih za kravo BOS-F in BOS-R. Preizkusili smo šest kombinacij, ki so prikazane v preglednici 5 (3.2.5). Uporabili smo različne razredčitve DNA, ki smo jo iz kravjega mleka izolirali s kompletom NucleoSpin Food.

Kot optimalno kombinacijo smo izbrali tisto, ki je dala pozitiven rezultat pri najnižji vrednosti  $C_t$  in kjer je imela standardna krivulja najboljši  $R^2$  in najboljši E. Rezultati so prikazani v preglednici 13. Izkazalo se je, da zgornjim zahtevam najbolj ustreza kombinacija začetnih oligonukleotidov BOS-F = 300 nmol/L in BOS-R = 900 nmol/L. Enake optimalne koncentracije so določili tudi avtorji začetnih oligonukleotidov (López-Calleja in sod., 2007b).

Preglednica 13: Parametri PCR v realnem času pri optimizaciji koncentracije začetnih oligonukleotidov, specifičnih za kravo

Začetni oligo-nukleotid	C (nM)	Par.	<b>BOS-F: 300 nM</b>						
			<b>C<sub>DNA</sub> (ng/µL) (redčitev)</b>						
			6,5 (D)	1,3 (10 <sup>-0,7</sup> )	0,65 (10 <sup>-1</sup> )	0,26 (10 <sup>-1,4</sup> )	0,13 (10 <sup>-1,7</sup> )	0,065 (10 <sup>-2</sup> )	
BOS-R	300	C <sub>t</sub>	28,9	27,0	24,9	27,5	27,5	28,6	
		T <sub>m</sub>	<b>75,2</b>	<b>75,0</b>	<b>75,4</b>	<b>75,2</b>	<b>75,8</b>	<b>75,0</b>	
		R <sup>2</sup>	0,00						
		E	-100,0						
	600	C <sub>t</sub>	24,5	25,4	33,0	27,0	33,4	29,0	
		T <sub>m</sub>	75,2	75,2	75,2	75,8	75,4	75,4	
		R <sup>2</sup>	0,56						
		E	486,8						
	900	C <sub>t</sub>	<b>19,0</b>	<b>21,0</b>	<b>23,4</b>	<b>23,7</b>	<b>24,9</b>	<b>34,2</b>	
		T <sub>m</sub>	<b>76,0</b>	<b>75,9</b>	<b>75,9</b>	<b>76,1</b>	<b>76,1</b>	<b>76,0</b>	
		R <sup>2</sup>	<b>0,95</b>						
		E	<b>93,2</b>						
	600	C (nM)	<b>BOS-F: 600 nM</b>						
			<b>C<sub>DNA</sub> (ng/µL) (redčitev)</b>						
			6,5 (D)	1,3 (10 <sup>-0,7</sup> )	0,65 (10 <sup>-1</sup> )	0,26 (10 <sup>-1,4</sup> )	0,13 (10 <sup>-1,7</sup> )	0,065 (10 <sup>-2</sup> )	
		C <sub>t</sub>	27,2	24,9	25,2	26,8	27,9	28,2	
		T <sub>m</sub>	74,8	75,0	75,4	75,8	75,4	75,2	
		R <sup>2</sup>	0,23						
		E	1189,0						
		900	C <sub>t</sub>	25,6	24,8	25,6	26,1	26,4	
			T <sub>m</sub>	75,8	74,6	75,2	75,4	75,4	
			R <sup>2</sup>	0,31					
			E	112,6					

Se nadaljuje ...

... nadaljevanje: Preglednica 13: Parametri PCR v realnem času pri optimizaciji koncentracije začetnih oligonukleotidov, specifičnih za kravo

Začetni oligo-nukleotid	C (nM)	Par.	<b>BOS-F: 300 nM</b>							
			<b>C<sub>DNA</sub> (ng/µL) (redčitev)</b>							
			6,5 (D)	1,3 (10 <sup>-0,7</sup> )	0,65 (10 <sup>-1</sup> )	0,26 (10 <sup>-1,4</sup> )	0,13 (10 <sup>-1,7</sup> )	0,065 (10 <sup>-2</sup> )		
<b>BOS-R</b>	C (nM)	Par.	<b>BOS-F: 900 nM</b>							
			<b>C<sub>DNA</sub> (ng/µL) (redčitev)</b>							
			6,5 (D)	1,3 (10 <sup>-0,7</sup> )	0,65 (10 <sup>-1</sup> )	0,26 (10 <sup>-1,4</sup> )	0,13 (10 <sup>-1,7</sup> )	0,065 (10 <sup>-2</sup> )		
			C <sub>t</sub>	27,6	26,7	25,5	26,9	28,2		
			T <sub>m</sub>	75,0	75,2	75,4	75,4	75,6		
	900		R <sup>2</sup>	0,22						
			E	1667,6						

**Legenda:** Par.: parametri; C<sub>t</sub>: cikel meje določanja; T<sub>m</sub>: temperatura taljenja pomnožkov; R<sup>2</sup>: korelacijski koeficient; E: učinkovitost PCR (%)

#### 4.4.1.2 Začetni oligonukleotidi, specifični za sesalce

V sklopu optimizacije PCR v realnem času smo preizkusili različne kombinacije koncentracij začetnih oligonukleotidov MAN-F in MAN-R, ki so specifični za sesalce. Preizkusili smo šest kombinacij, ki so opisane v preglednici 6 (3.2.5).

Uporabili smo različne razredčitve DNA, ki smo jo iz kravjega mleka izolirali s kompletom NucleoSpin Food.

Kot optimalno kombinacijo smo izbrali tisto, ki je dala pozitiven rezultat pri najnižji vrednosti C<sub>t</sub> in kjer je imela standardna krivulja najboljši R<sup>2</sup> in najboljši E. Rezultati so prikazani v preglednici 14. Izkazalo se je, da zgornjim pogojem najbolj ustreza kombinacija začetnih oligonukleotidov MAN-F = 600 nM in MAN-R = 900 nmol/L. Določena optimalna koncentracija začetnih oligonukleotidov MAN ni enaka optimalni koncentraciji, ki so jo določili López-Calleja in sod. (2007b). V njihovem primeru so izbrali kombinacijo MAN-F = 300 nM in MAN-R = 900 nM.

Preglednica 14: Parametri PCR v realnem času pri optimizaciji koncentracije začetnih oligonukleotidov, specifičnih za sesalce

Začetni oligo-nukleotid	C (nM)	Parametri	<b>MAN-F: 300 nM</b>		
			<b>C<sub>DNA</sub> (ng/µL) (redčitev)</b>		
			6,5 (D)	0,65 (10 <sup>-1</sup> )	0,065 (10 <sup>-2</sup> )
<b>MAN-R</b>	<b>300</b>	C <sub>t</sub>	nedoločen	37,8	34,3
		T <sub>m</sub>	69,2	73,7	75,9
		R <sup>2</sup>		1,00	
		E		-48,1	
	<b>900</b>	C <sub>t</sub>	nedoločen	34,1	33,0
		T <sub>m</sub>	69,1	76,3	77,1
		R <sup>2</sup>		1,00	
		E		-90,4	
	<b>600</b>	<b>MAN-F: 600 nM</b>			
		<b>C<sub>DNA</sub> (ng/µL) (redčitev)</b>			
		6,5 (D)	0,65 (10 <sup>-1</sup> )	0,065 (10 <sup>-2</sup> )	
		C <sub>t</sub>	31,6	28,3	32,2
		T <sub>m</sub>	76,7	76,9	76,9
		R <sup>2</sup>		0,02	
		E		2170005,1	
<b>900</b>	C <sub>t</sub>	<b>26,9</b>	<b>27,0</b>	<b>30,6</b>	
	T <sub>m</sub>	<b>77,1</b>	<b>77,1</b>	<b>77,1</b>	
	R <sup>2</sup>		<b>0,75</b>		
	E		<b>253,1</b>		

Se nadaljuje ...

... nadaljevanje: Preglednica 14: Parametri PCR v realnem času pri optimizaciji koncentracije začetnih oligonukleotidov, specifičnih za sesalce

Začetni oligonukleotid	C (nM)	Parametri	<b>MAN-F: 300 nM</b>		
			<b>C<sub>DNA</sub> (ng/µL) (redčitev)</b>		
			6,5 (D)	0,65 (10 <sup>-1</sup> )	0,065 (10 <sup>-2</sup> )
MAN-R	600	C (nM)	<b>MAN-F: 900 nM</b>		
			<b>C<sub>DNA</sub> (ng/µL) (redčitev)</b>		
		T <sub>m</sub>	6,5 (D)	0,65 (10 <sup>-1</sup> )	0,065 (10 <sup>-2</sup> )
		R <sup>2</sup>	1		
		E	151,0		
	900	C <sub>t</sub>	nedoločen	29,0	31,5
		T <sub>m</sub>	76,1	77,1	77,3
		R <sup>2</sup>	29,68		
		E	114,7		

**Legenda:** C<sub>t</sub>: cikel meje določanja; T<sub>m</sub>: temperatura taljenja pomnožkov; R<sup>2</sup>: korelacijski faktor; E: učinkovitost PCR (%)

#### 4.4.1.3 Značilna temperatura taljenja pomnožkov, specifičnih za kravo

Značilno temperaturo taljenja pomnožkov (T<sub>m</sub>), specifičnih za kravo, in njeno standardno deviacijo, smo določali z rezultati za vzorce kravjega mleka (8 vzorcev, v treh razredčitvah). DNA je bila iz vseh vzorcev izolirana s komercialnim kompletom NucleoSpin Food.

Preglednica 15: Podatki za izračun standardne temperature taljenja pomnožkov, specifičnih za kravo

Vzorec	Razredčitev	T <sub>m</sub>	Vzorec	Razredčitev	T <sub>m</sub>
1	D	75,8	5	D	76,3
	-1	75,8		-1	76,5
	-2	75,8		-2	76,5
2	D	76,0	6	D	76,3
	-1	76,1		-1	76,3
	-2	76,1		-2	76,3
3	D	76,0	7	D	76,1
	-1	76,0		-1	76,3
	-2	76,0		-2	76,5
4	D	76,0	8	D	76,5
	-1	76,3		-1	76,5
	-2	76,3		-2	76,5
<b>Povprečna vrednost: 76,2 ± 0,3</b>					

Povprečna T<sub>m</sub> pomnožkov pri vzorcih kravjega mleka je bila 76,2 °C, standardna deviacija pa je znašala 0,3 °C (preglednica 15). Ker smo upoštevali odstopanje ene standardne deviacije, je značilno območje T<sub>m</sub> za vzorce kravjega mleka od 75,9 °C do 76,5 °C (Toplak, 2013).

#### 4.4.2 Specifična metoda določanja pomnožkov

Optimizacijo začetnih oligonukleotidov za PCR v realnem času s specifično metodo določanja pomnožkov smo povzeli po optimizaciji pri nespecifični metodi določanja pomnožkov (4.3.1). Kot optimalni sta se izkazali kombinaciji začetnih oligonukleotidov BOS-F = 300 nM in BOS-R = 900 nM ter MAN-F = 600 nM in MAN-R = 900 nM.

Optimalno koncentracijo sonde smo iskali pri PCR v realnem času s specifično metodo določanja pomnožkov za sondu, specifično za kravo. Pri optimizaciji sonde smo uporabili začetne oligonukleotide BOS-F = 300 nM in BOS-R = 900 nM in preizkusili tri koncentracije sonde BOS-P. Izbrane koncentracije sonde in dobljeni rezultati so prikazani v preglednici 16. Kot optimalno koncentracijo sonde smo izbrali tisto, kjer je bila vrednost C<sub>t</sub> najnižja in kjer je imela standardna krivulja najboljši R<sup>2</sup> in najboljši E.

Preglednica 16: Parametri PCR v realnem času pri optimizaciji sonde BOS-P

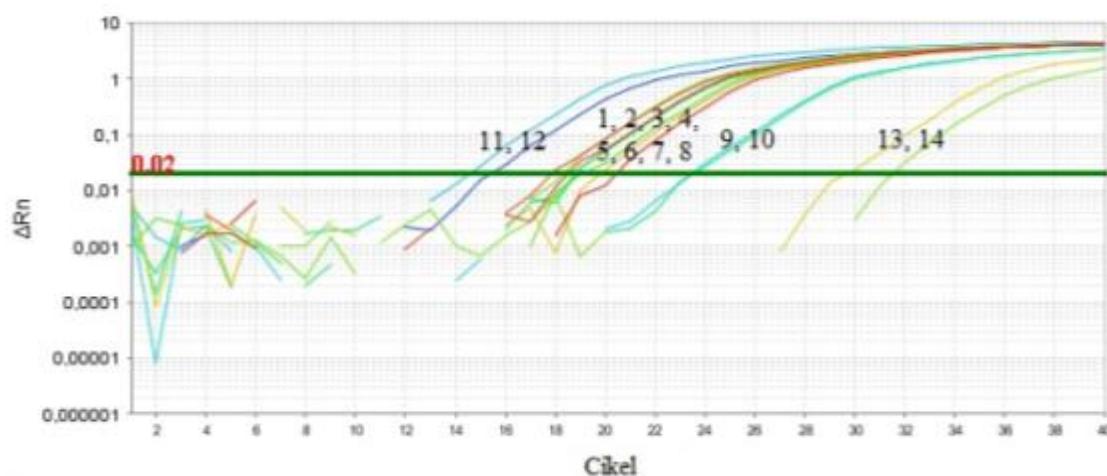
Sonda	C (nM)	Parametri	C <sub>DNA</sub> (ng/µL) (redčitev)		
			8 (D)	0,8 (10 <sup>-1</sup> )	0,08 (10 <sup>-2</sup> )
BOS-P	200	C <sub>t</sub>	22,3	21,6	24,5
		R <sup>2</sup>		0,42	
		E		705,0	
	100	C <sub>t</sub>	20,8	21,2	24,7
		R <sup>2</sup>		0,80	
		E		223,2	
	50	C <sub>t</sub>	19,3	21,1	24,7
		R <sup>2</sup>		0,96	
		E		132,6	

**Legenda:** C<sub>t</sub>: cikel meje določanja; T<sub>m</sub>: temperatura taljenja pomnožkov; R<sup>2</sup>: korelacijski faktor; E: učinkovitost PCR (%)

Najboljše rezultate smo dobili pri koncentraciji sonde BOS-P 50 nM. R<sup>2</sup> je znašal 0,96, E pa 132,6. Sondi za specifično določanje krave BOS-P in za specifično določanje sesalcev imata enako zaporedje in se vežeta na isti odsek DNA (slika 4). Dobljen rezultat smo zato lahko uporabili tudi kot optimalno koncentracijo sonde, specifične za sesalce MAN-P. López-Calleja in sod. (2007b) so pri svojem delu uporabljali višjo koncentracijo sonde. Tako z začetnimi oligonukleotidi MAN, kot z začetnimi oligonukleotidi BOS, so uporabljali 200 nM sonde.

#### 4.5 SPECIFIČNOST PCR V REALNEM ČASU ZA DOLOČANJE KRAVE

Specifičnost PCR v realnem času smo določali z DNA, ki smo jo izolirali iz različnih vrst mleka na tržišču. Na sliki 20 je na primeru nespecifične metode določanja pomnožkov prikazan rezultat PCR v realnem času iz 10 krat redčenih vzorcev izolirane DNA. Krivulje 1 do 8 prikazujejo pomnoževanje DNA iz kravjega mleka, krivulji 9 in 10 pomnoževanje DNA iz sirotke, krivulji 11 in 12 pa pomnoževanje DNA iz pinjenca. Rezultati pomnoževanja so zbrani v preglednici 17, v kateri je prikazana tudi pravilnost rezultata za posamezni vzorec.



Slika 20: Specifičnost PCR v realnem času določena s pomnoževanjem DNA izolirane iz različnih vrst mleka

**Legenda:** **ΔRn:** normaliziran fluorescentni signal; **1:** kravje mleko, UHT, polnomastno, Milfina; **2:** kravje mleko, UHT, polnomastno, Alpsko mleko; **3:** kravje mleko, surovo, polnomastno, Volarje; **4:** kravje mleko, UHT, polposneto, Milfina; **5:** kravje mleko, sterilno, tržnica Koseze; **6:** kraje mleko, pasterizirano, tržnica Koseze; **7:** kravje mleko, UHT, Pomursko mleko; **8:** kravje mleko, UHT, Pomursko z dodatkom vitaminov; **9:** sirotka, tržnica Koseze; **10:** sladka sirotka, tržnica Koseze; **11:** pinjenec, tržnica Koseze; **12:** sladek pinjenec, tržnica Koseze; **13:** ovčje mleko, surovo, tržnica Koseze; **14:** kozje mleko, surovo, tržnica Koseze.

Preglednica 17: Specifičnosti PCR v realnem času določena s pomnoževanjem DNA izolirane iz različnih vrst mleka

Št.	Vzorec	Nespecifična metoda				Specifična metoda		
		C <sub>t</sub>	T <sub>m</sub>	Št.	Vzorec	C <sub>t</sub>	Rez.	Pravil.
1	kravje mleko, UHT, polnomastno, Milfina	20,3	75,7		X	33,7	+	✓
2	kravje mleko, UHT, polnomastno, Alpsko mleko	18,5	76,1	+	✓	33,7	+	✓
3	kravje mleko, surovo, polnomastno, Volarje	17,9	76,0	+	✓	31,8	+	✓
4	kravje mleko, UHT, polposneto, Milfina	16,8	76,3	+	✓	33,2	+	✓
5	kravje mleko, sterilno, tržnica Koseze	18,3	76,5	+	✓	31,7	+	✓

Se nadaljuje ...

... nadaljevanje: Preglednica 17: Specifičnosti PCR v realnem času določena s pomnoževanjem DNA izolirane iz različnih vrst mleka pomnoževanjem DNA izolirane iz različnih vrst mleka

Št.	Vzorec	Nespecifična metoda				Specifična metoda		
		C <sub>t</sub>	T <sub>m</sub>	Št.	Vzorec	C <sub>t</sub>	T <sub>m</sub>	Pravil.
6	kravje mleko, pasterizirano, tržnica Koseze	19,5	76,3	+	✓	34,5	+	✓
7	kravje mleko, UHT, Pomursko mleko	18,8	76,1	+	✓	32,5	+	✓
8	kravje mleko, UHT, Pomursko z dodatkom vitaminov	18,7	76,5	+	✓	31,7	+	✓
9	sirotka 1, tržnica Koseze	23,6	76,5	+	✓	30,3	+	✓
10	sirotka 2, tržnica Koseze	23,5	76,5	+	✓	38,0	+	✓
11	pinjenec 1, tržnica Koseze	14,6	76,5	+	✓	28,5	+	✓
12	pinjenec 2, tržnica Koseze	15,5	76,1	+	✓	30,2	+	✓
13	ovčje mleko, surovo, tržnica Koseze	29,8	76,3	+	X	-	-	✓
14	kozje mleko, surovo, tržnica Koseze	31,6	77,6		✓	-	-	✓
15	ovčje mleko, surovo, Planina Mangart	34,7	79,3		✓	-	-	✓
16	kozje mleko, surovo, Planina Mangart	36,1	64,7		✓	-	-	✓

**Legenda:** Rez.: rezultat; +: pozitiven rezultat;

vzorčenega ovčjega mleka s kravjim mlekom. Odločili smo se ponoviti poskus z drugim virom ovčjega in kozjega mleka. Kozje in ovče mleko smo vzorčili na Planini Mangart, ki se ukvarja izključno s pirejo in predelavo kozjega ter ovčjega mleka. Rezultati lastnega vzorčenja so prikazani v preglednici 17, skupaj s predhodnimi rezultati. Pri novih vzorcih je prišlo do pomnoževanja in krivulja fluorescence je bila nad mejo detekcije, vendar je tokrat rezultat pravilen, saj temperatura taljenja pomnožkov ne ustreza tisti, ki je značilna za kravje mleko.

Skupno je bil od šestnajstih preizkušenih vzorcev rezultat pravilen pri 14 vzorcih, pri 2 vzorcih pa napačen. Specifičnost PCR v realnem času z nespecifično metodo določanja in začetnimi oligonukleotidi BOS je 87,5 %. Toplotna obdelava mleka in mlečnih izdelkov je lahko poškodovala DNA v somatskih celicah in s tem poslabšala rezultate PCR v realnem času. Če upoštevamo samo rezultate tistih vzorcev, ki niso bili topotno obdelani, je specifičnost reakcije 88,8 %. Upoštevajoč zgolj rezultate topotno obdelanega mleka in mlečnih izdelkov pa je dobljena specifičnost 85,7 %. Iz tega lahko zaključimo, da topotna obdelava mleka in mlečnih izdelkov bistveno ne vpliva na specifičnost reakcije. Drug vzrok za nespecifične rezultate bi lahko bila nespecifičnost izbranih začetnih oligonukleotidov.

Preizkus specifičnosti PCR v realnem času za določanje krave smo opravili tudi za specifično metodo določanja pomnožkov. Pri vseh vzorcih je bil rezultat pravilen, pri vzorcih kravjega mleka ali mlečnih izdelkov pozitiven, pri vzorcih mleka drobnice pa negativen. Specifičnost reakcije je bila 100 %. S tem smo tudi ovrgli možnost, da je ovče mleko (vzorec 13) potvorjeno s kravjim, kot so kazali rezultati nespecifične metode določanja pomnožkov, in hkrati potrdili, da je specifičnost te metode res 87,5 % in ne višja.

## 4.6 OBČUTLJIVOST PCR V REALNEM ČASU

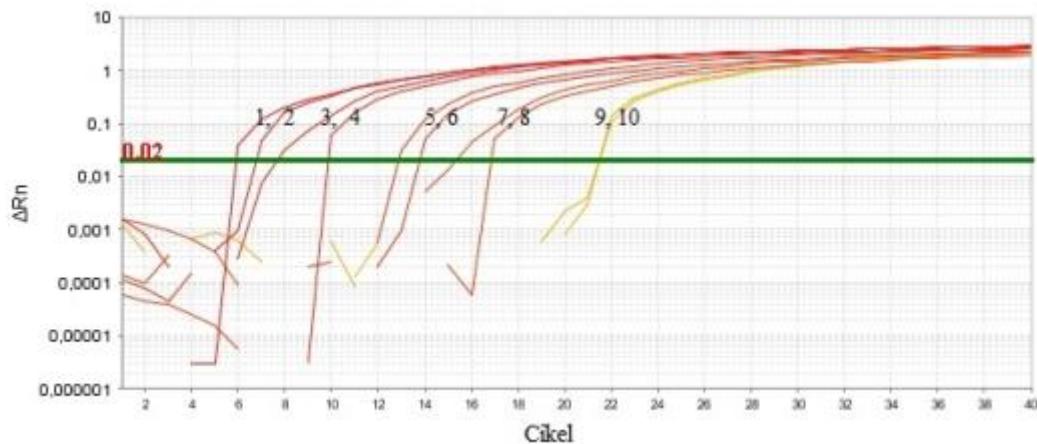
### 4.6.1 Teoretična občutljivost PCR v realnem času

Teoretično občutljivost PCR v realnem času smo določali s standardno DNA, ki smo jo pripravili po postopku, opisanem v 3.3.3.

#### 4.6.1.1 Določanje kravje DNA z nespecifično metodo določanja pomnožkov

Na sliki 21 in v preglednici 18 je prikazana občutljivost PCR v realnem času, pri katerem smo uporabili začetne oligonukleotide, specifične za kravo (BOS-F/BOS-R). Kot vir čiste DNA je bila uporabljena standardna DNA, vzorec 1. Do pomnoževanja je prišlo vse do

razredčitve  $10^{-5}$  ( $0,000605 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ). Pri večjih razredčitvah do pomnoževanja ni prišlo. Ta koncentracija ustreza 0,0015 ng DNA v reakcijski mešanici.



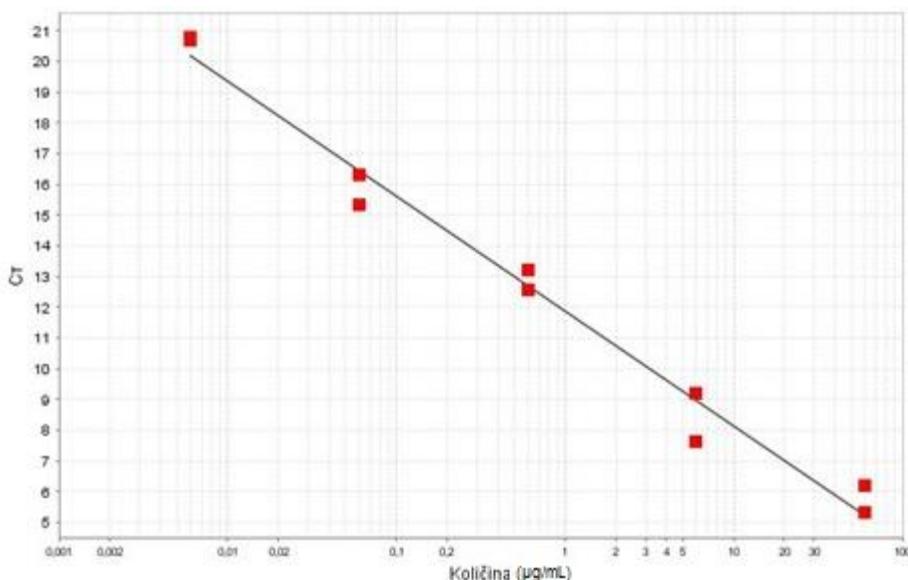
Slika 21: Pomnoževanje standardne DNA krave z začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za kravo, s PCR v realnem času z nespecifično metodo določanja pomnožkov

**Legenda:**  $\Delta R_n$ : normaliziran fluorescentni signal, **1, 2:**  $6,05 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ; **3, 4:**  $0,605 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ; **5, 6:**  $0,0605 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ; **7, 8:**  $0,00605 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ; **9, 10:**  $0,000605 \text{ ng}/\mu\text{L}$

Preglednica 18: Rezultati pomnoževanja standardne DNA s PCR v realnem času z nespecifično metodo določanja pomnožkov in začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za kravo

Vzorec	Razredčitev	Koncentracija ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ )	$C_t$	Povp. $C_t$
1	$10^{-1}$	6,05	5,3	5,8
2			6,2	
3	$10^{-2}$	0,605	7,6	8,4
4			9,2	
5	$10^{-3}$	0,0605	13,2	12,9
6			12,6	
7	$10^{-4}$	0,00605	16,3	15,8
8			14,3	
9	$10^{-5}$	0,000605	20,8	20,7
10			20,7	
11	$10^{-6}$	0,0000605	Ni pomnoževanja	/
12			Ni pomnoževanja	

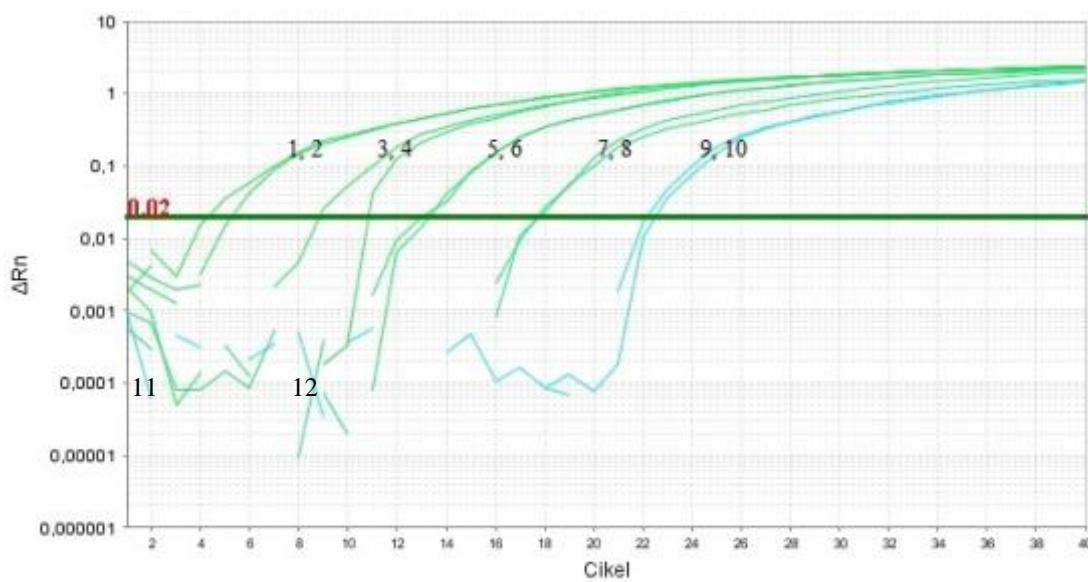
Teoretično standardno krivuljo (slika 22) smo naredili glede na rezultate pomnoževanja standardne DNA (preglednica 18). Njen  $R^2$  znaša 0,98, E pa je 85,3. Pričakovali smo, da bo učinkovitost PCR pri standardni DNA krave občutno boljša, kot pri DNA, izolirani iz mešanic mleka, in da se bo približala idealni vrednosti  $E = 100$ . Standardna DNA naj ne bi vsebovala inhibitorjev PCR in slaba vrednost E nas je presenetila. Razlog je lahko tudi v dizajnu začetnih oligonukleotidov (poglavlji 2.3.1 in 4.7 (Applied Biosystems, 2005; Ann Van Hee, 2013)).



Slika 22: Standardna krivulja za določanje teoretične občutljivosti PCR v realnem času pri nespecifični metodi določanja pomnožkov za začetne oligonukleotide, specifične za kravo

#### 4.6.1.2 Določanje sesalčje DNA z nespecifično metodo določanja pomnožkov

Na sliki 23 in v preglednici 19 je prikazana občutljivost PCR v realnem času z začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za sesalce (MAN-F/MAN-R). Kot vir čiste DNA smo uporabili standardno DNA. Do pomnoževanja je prišlo do razredčitve  $10^{-5}$  (0,000605 ng/µL) (slika 23). Maksimalno število razredčitev, pri katerih še lahko pride do pomnoževanja, se ujema z maksimalnim številom, določenim z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za kravo. Tudi v tem primeru je bila potrebna količina DNA v reakcijski mešanici 0,0015 ng.



Slika 23: Pomnoževanja standardne DNA z začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za sesalce, s PCR v realnem času z nespecifično metodo določanja pomnožkov

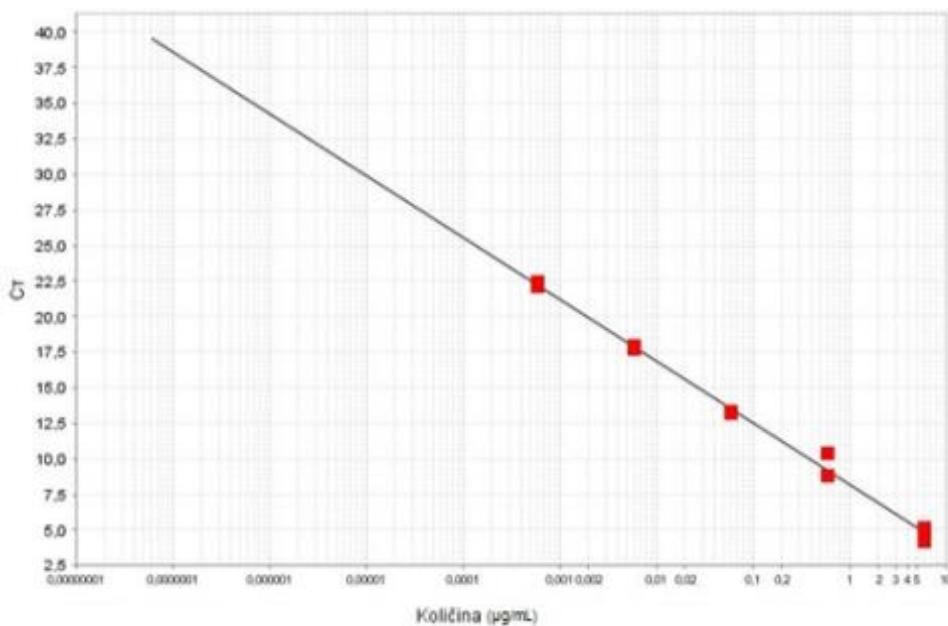
**Legenda:** **ΔRn:** normaliziran fluorescentni signal; **1, 2:** 6,05 ng/µL; **3, 4:** 0,605 ng/µL; **5, 6:** 0,0605 ng/µL; **7, 8:** 0,00605 ng/µL; **9, 10:** 0,000605 ng/µL; **11, 12:** 0,0000605 ng/µL

Preglednica 19: Rezultati pomnoževanja standardne DNA s PCR v realnem času z nespecifično metodo določanja pomnožkov in začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za sesalce

Vzorec	Razredčitev	Koncentracija (ng/µL)	C <sub>t</sub>	Povp. C <sub>t</sub>
1	10 <sup>-1</sup>	6,05	4,3	4,7
2			5,2	
3	10 <sup>-2</sup>	0,605	10,4	9,6
4			8,8	
5	10 <sup>-3</sup>	0,0605	13,3	13,2
6			13,2	
7	10 <sup>-4</sup>	0,00605	17,9	17,8
8			17,7	
9	10 <sup>-5</sup>	0,000605	22,2	22,3
10			22,5	
11	10 <sup>-6</sup>	0,0000605	Ni pomnoževanja	/
12			Ni pomnoževanja	

Teoretično standardno krivuljo (slika 24) smo naredili s standardno DNA krave s podatki iz preglednice 19. R<sup>2</sup> umeritvene krivulje znaša 0,99 in njen E je 69,9. Tudi v primeru začetnih oligonukleotidov, specifičnih za sesalce, je bila slaba učinkovitost nepričakovana.

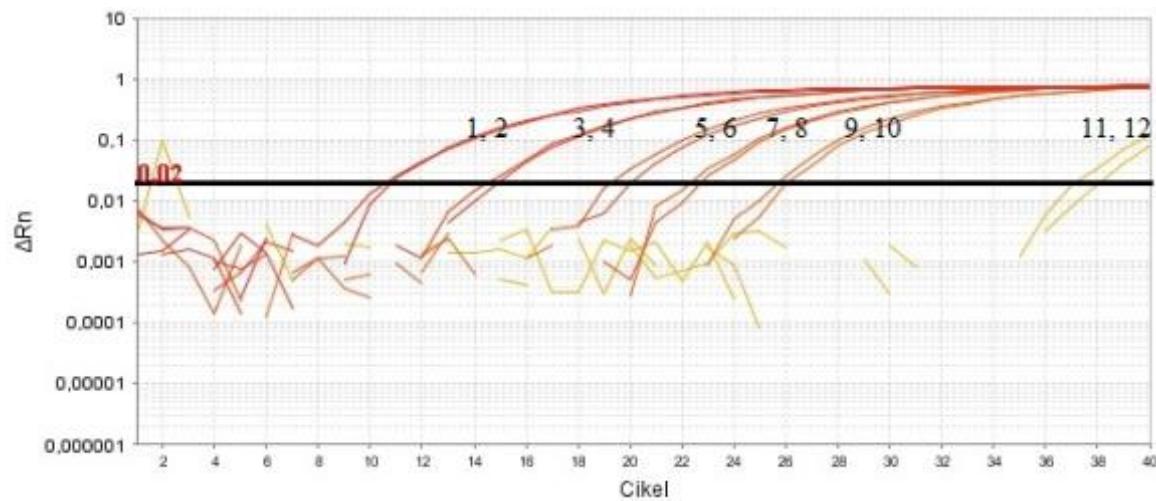
Ker je bila standardna DNA pripravljena kot vir čiste DNA brez inhibitorjev, menimo, da je razlog za slabo učinkovitost v dizajnu začetnih oligonukleotidov MAN. Učinkovitost PCR z začetnimi oligonukleotidi MAN je lahko slabša od učinkovitosti z začetnimi oligonukleotidi BOS zaradi neprimerno velikega pomnožka, ki nastaja pri določanju sesalcev (2.3.1 in 4.7 (Applied Biosystems, 2005; Ann Van Hee, 2013)).



Slika 24: Standardna krivulja za določanje teoretične občutljivosti PCR v realnem času pri nespecifični metodi določanja pomnožkov za začetne oligonukleotide, specifične za sesalce

#### 4.6.1.3 Določanje kravje DNA s specifično metodo določanja pomnožkov

Pri določanju teoretične občutljivosti PCR v realnem času, pri specifični metodi določanja pomnožkov za določanje krave, smo uporabili začetne oligonukleotide, specifične za kravo (BOS-F/BOS-R), in sondu, specifično za kravo (BOS-P). Kot vir čiste DNA smo za matrično DNA uporabili standardno DNA krave. Rezultati so prikazani v preglednici 20 in na sliki 25. Do smiselnega pomnoževanja je prišlo do razredčitve  $10^{-5}$  (0,000605 ng/ $\mu\text{L}$ ). Večje razredčitve so imele občutno višjo  $C_t$  vrednost, poleg tega so bile krivulje neznačilne. Maksimalno število redčitev, ko še pride do pomnoževanja, je bilo pri specifični metodi detekcije pomnožkov nižje od nespecifične metode. V tem primeru pomnoževanja je signal prešel mejo detekcije tudi pri milijonkrat redčenih vzorcih (0,00015 ng DNA v reakcijski mešanici). Zaradi pozne vrednosti  $C_t$  v primerjavi z ostalimi vzorci in netipičnosti krivulje, te redčitve nismo šteli kot pozitiven rezultat.



Slika 25: Pomnoževanje standardne DNA krave z začetnima oligonukleotidoma, specifičima za kravo, s PCR v realnem času s specifično metodo določanja pomnožkov

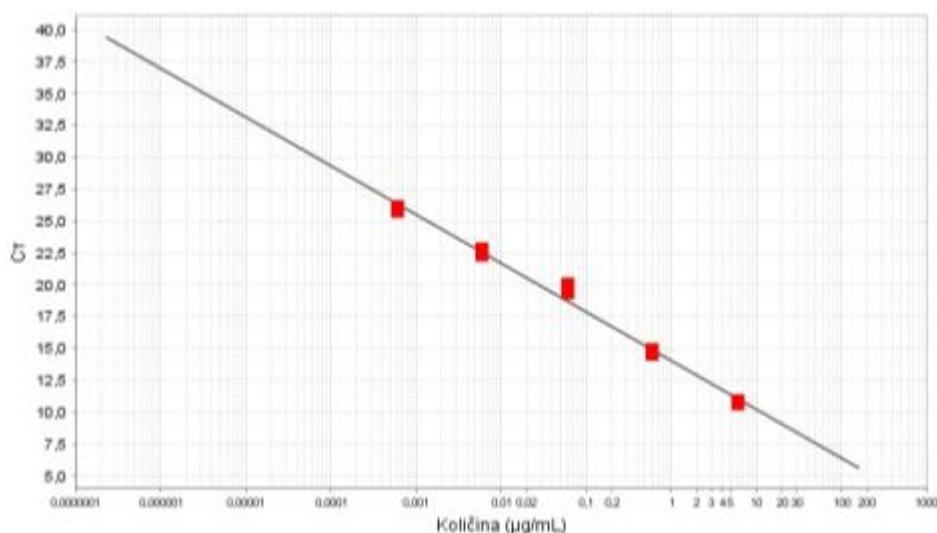
**Legenda:** **ΔRn:** normaliziran fluorescentni signal; **1, 2:** 6,05 ng/µL; **3, 4:** 0,605 ng/µL; **5, 6:** 0,0605 ng/µL; **7, 8:** 0,00605 ng/µL; **9, 10:** 0,000605 ng/µL; **11, 12:** 0,0000605 ng/µL

Preglednica 20: Rezultati pomnoževanja standardne DNA krave s PCR v realnem času s specifično metodo določanja pomnožkov in začetnima oligonukleotidoma, specifičima za kravo

Vzorec	Razredčitev	Koncentracija (ng/µL)	C <sub>t</sub>	Povprečen C <sub>t</sub>
1	10 <sup>-1</sup>	6,05	10,9	10,8
2			10,6	
3	10 <sup>-2</sup>	0,605	14,9	14,7
4			14,6	
5	10 <sup>-3</sup>	0,0605	20,0	19,7
6			19,4	
7	10 <sup>-4</sup>	0,00605	22,8	22,6
8			22,4	
9	10 <sup>-5</sup>	0,000605	25,8	25,9
10			26,1	
11	10 <sup>-6</sup>	0,0000605	37,3	37,6
12			38,0	

Teoretična umeritvena krivulja je narejena na podlagi podatkov iz preglednice 20, le da smo izpustili vzorca 11 in 12, ker sta C<sub>t</sub> in krivulji neznačilni. Umeritvena krivulja je prikazana na sliki 26. Njen R<sup>2</sup> je 0,99, E pa znaša 82,9. Učinkovitost PCR je podobna učinkovitosti, ki smo jo dosegli pri nespecifični metodi določanja pomnožkov. Tudi pri

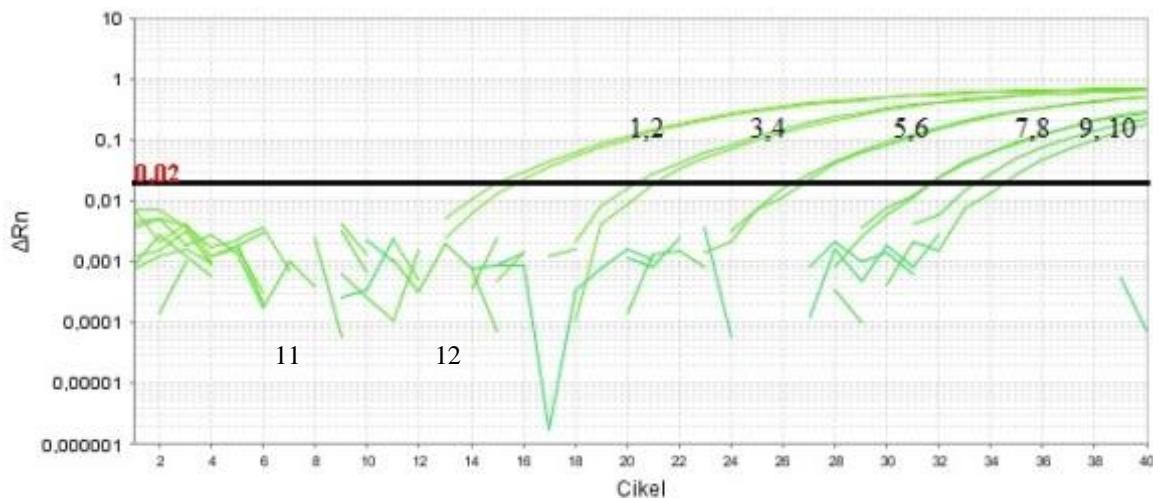
specifični metodi učinkovitost ni bila idealna, razlog je lahko v dizajnu začetnih oligonukleotidov (BOS) in sonde (BOS-P) (2.3.1 in 4.7 (Applied Biosystems, 2005; Ann Van Hee, 2013)).



Slika 26: Standardna krivulja za določanje teoretične občutljivosti PCR v realnem času pri specifični metodi določanja pomnožkov za začetne oligonukleotide, specifične za kravo

#### 4.6.1.4 Določanje sesalčje DNA s specifično metodo določanja pomnožkov

Občutljivost PCR, pri kateri smo uporabili začetne oligonukleotide (MAN-F/MAN-R), specifične za sesalce, in sondu (MAN-P), specifično za sesalce, je prikazana na sliki 27 in v preglednici 21. Kot vir čiste DNA smo uporabili standardno DNA. Do pomnoževanja je prišlo do razredčitve  $10^{-5}$  (0,000605 ng/ $\mu\text{L}$ ), kar znaša 0,0015 ng DNA v reakcijski mešanici. Takšna je bila tudi maksimalna razredčitev pri pomnoževanju standardne DNA s PCR z nespecifično metodo detekcije. Pri začetnih oligonukleotidih BOS in specifični metodi detekcije pa smo, sicer netipičen signal, ki je prešel mejo detekcije, dobili tudi pri milijonkrat redčenem vzorcu. Neponovljivost rezultatov pomnoževanja z začetnimi oligonukleotidi MAN znotraj specifične metode detekcije nakazuje na slabše delovanje začetnih oligonukleotidov, specifičnih za kravo (MAN) (poglavlji 2.3.1 in 4.7 (Applied Biosystems, 2005; Ann Van Hee, 2013)).



Slika 27: Pomnoževanje standardne DNA krave z začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za sesalce, s PCR v realnem času s specifično metodo določanja pomnožkov

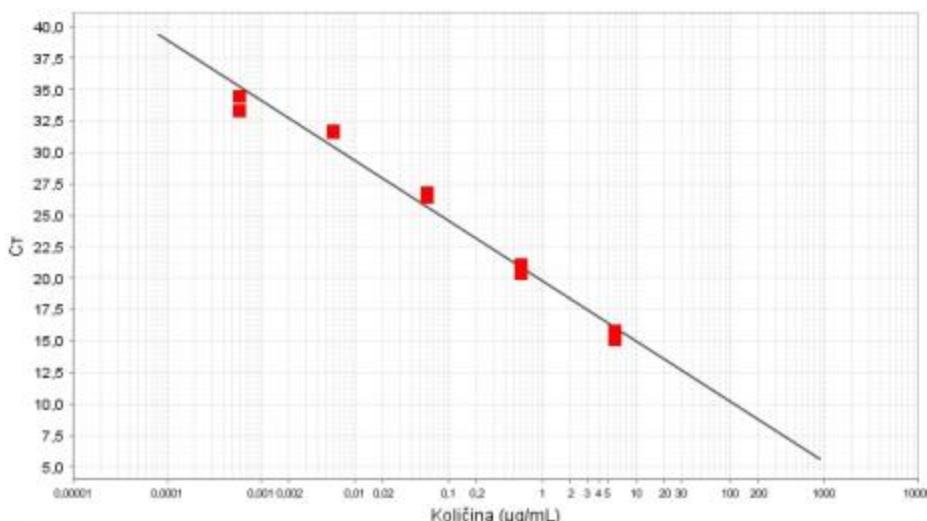
**Legenda:**  $\Delta R_n$ : normaliziran fluorescentni signal; **1, 2:** 6,05 ng/ $\mu$ L; **3, 4:** 0,605 ng/ $\mu$ L; **5, 6:** 0,0605 ng/ $\mu$ L; **7, 8:** 0,00605 ng/ $\mu$ L; **9, 10:** 0,000605 ng/ $\mu$ L; **11, 12:** 0,0000605 ng/ $\mu$ L

Preglednica 21: Rezultati pomnoževanja standardne DNA krave s PCR v realnem času s specifično metodo določanja pomnožkov in začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za sesalce

Vzorec	Razredčitev	Koncentracija (ng/ $\mu$ L)	C <sub>t</sub>	Povp. C <sub>t</sub>
1	$10^{-1}$	6,05	15,8	15,4
2			15,1	
3	$10^{-2}$	0,605	21,1	20,7
4			20,4	
5	$10^{-3}$	0,0605	26,4	26,6
6			26,7	
7	$10^{-4}$	0,00605	31,8	31,7
8			37,6	
9	$10^{-5}$	0,000605	34,5	33,9
10			33,4	
11	$10^{-6}$	0,0000605	/	/
12			/	

Teoretična standardna krivulja je narejena s pomočjo podatkov iz preglednice 21 in je prikazana na sliki 28.  $R^2$  umeritvene krivulje znaša 0,98 in njen E je 61,7. Podobno slabo učinkovitost PCR smo določili tudi pri začetnih oligonukleotidih MAN pri nespecifični

metodi detekcije. Ravno tako kot pri nespecifični metodi detekcije, je tudi pri specifični metodi detekcije učinkovitost PCR slabša pri začetnih oligonukleotidih MAN. Ponovno smo mnenja, da je razlog za razliko v učinkovitosti in za slabo učinkovitost v dizajnu začetnih oligonukleotidov (poglavlji 2.3.1 in 4.7 (Applied Biosystems, 2005; Ann Van Hee, 2013)).



Slika 28: Standardna krivulja za določanje teoretične občutljivosti PCR v realnem času pri specifični metodi določanja pomnožkov za začetne oligonukleotide, specifične za sesalce

#### 4.6.2 Praktična občutljivost PCR v realnem času

Praktično umeritveno krivuljo za PCR v realnem času smo naredili iz mešanic kozjega mleka s kravjim mlekom in ovčjega mleka s kravjim mlekom. Pripravili smo mešanice mleka z različnimi koncentracijami kravjega mleka. Iz mešanic smo s kompletom NucleoSpin Food izolirali DNA in izmerili koncentracijo. Nato smo pri vseh vzorcih koncentracijo DNA v izolatih normalizirali na najnižjo izmerjeno vrednost. Pri ovčjem mleku je ta znašala 0,95 ng/µL, pri kozjem pa smo normalizirali na koncentracijo 1,00 ng/µL.

V mešanicah smo s PCR v realnem času s specifično in z nespecifično metodo določali vsebnost kravjega mleka z začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za kravo (BOS-F/BOS-R). Vsebnost kravjega mleka v mešanicah, koncentracija izolirane DNA in normalizirana koncentracija ter vrednost C<sub>t</sub>, so prikazani v preglednicah 22 in 23.

##### 4.6.2.1 Nespecifična metoda določanja pomnožkov

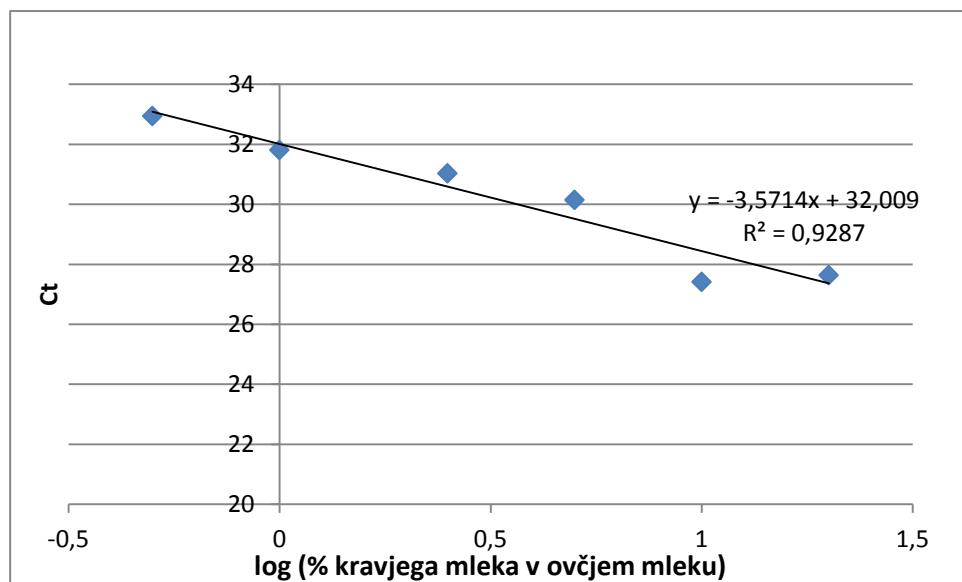
Iz preglednice 22 lahko razberemo, da vrednost C<sub>t</sub> pri vzorcih z nižjim odstotkom kravjega mleka narašča, izjema sta le vzorca 1 in 2 (kozje mleko z 20 % in z 10 % kravjega mleka).

Možno je lahko, da je pri vzorcu 1  $C_t$  nepričakovano višji zaradi inhibicije PCR reakcije. Pri vzorcih 7 in 14 (kozje in ovče mleko z 0 % kravjega mleka) se pojavi  $C_t$ , a je rezultat vseeno pravilen, saj je  $T_m$  nespecifična za kravje mleko (4.4.1.3).

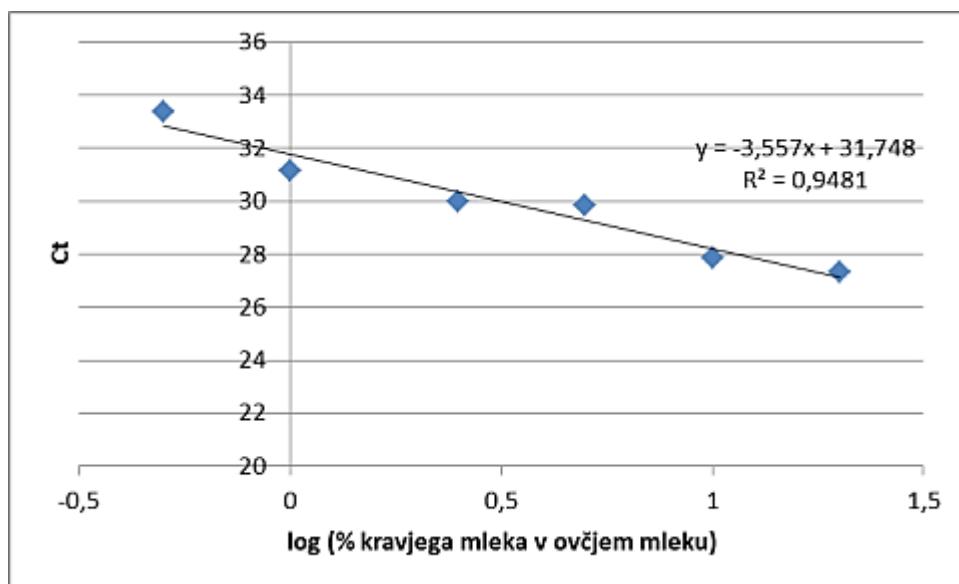
Preglednica 22: Rezultati pomnoževanja DNA za določanje praktične občutljivosti PCR v realnem času pri nespecifični metodi določanja pomnožkov za mešanice ovčjega in kravjega ter kozjega mleka

Št. vzorca	Drugo mleko	Kravje mleko (%)	Začetna konc. DNA (ng/ $\mu$ L)	Normalizirana konc. DNA (ng/ $\mu$ L)	$C_t$	$T_m$
1	kozje	20	14,0	1,00	24,6	75,9
2		10	12,5		24,3	76,2
3		5	15,0		27,1	76,2
4		2,5	16,0		27,9	76,3
5		1	13,0		28,5	76,4
6		0,5	10,0		29,9	76,4
7		0	18,5		33,5	77,9
8	ovčje	20	12,0	0,95	24,4	76,4
9		10	12,5		24,8	76,5
10		5	11,0		26,7	76,5
11		2,5	9,5		26,8	76,5
12		1	10,5		28,0	76,5
13		0,5	9,5		30,3	76,4
14		0	13,0		33,0	76,9

Standardna krivulja za vsebnost kravjega mleka v mešanici kozjega mleka s kravjim mlekom je prikazana na sliki 29 in predstavlja odvisnost vrednosti  $C_t$  od desetiškega logaritma odstotka kravjega mleka v mešanici. Vzorec 7, kjer je bila vsebnost kravjega mleka v kozjem mleku 0 %, smo izpustili, ker ga ni mogoče prikazati na logaritmični skali. Temperatura taljenja pomnožkov ( $T_m$ ) je bila izven območja značilnega za kravo in rezultat ni pozitiven, kar je pravilno za čisto kozje mleko.  $R^2$  za standardno krivuljo znaša 0,93; E je 90,5 %.



Slika 29: Standardna krivulja za vsebnost kravjega mleka pri nespecifični metodi določanja pomnožkov v mešanici kozjega mleka s kravjim mlekom



Slika 30: Standardna krivulja pri nespecifični metodi določanja pomnožkov v mešanici ovčjega in kravjega mleka

Drugo standardno krivuljo smo naredili za vsebnost kravjega mleka v mešanici ovčjega mleka s kravjim mlekom.

Prikazana je na sliki 30 in predstavlja odvisnost vrednosti  $C_t$  od desetiškega logaritma odstotka kravjega mleka v mešanici. Vzorec 14, kjer je bila vsebnost kravjega mleka v ovčjem mleku 0 %, smo zaradi logaritmične skale izpustili. Poleg tega rezultat zaradi temperature taljenja pomnožkov ( $T_m$ ) ni pozitiven, kar je pravilno za čisto ovčje mleko.  $R^2$  za standardno krivuljo znaša 0,95; E je 91,0 %.

#### 4.6.2.2 Specifična metoda določanja pomnožkov

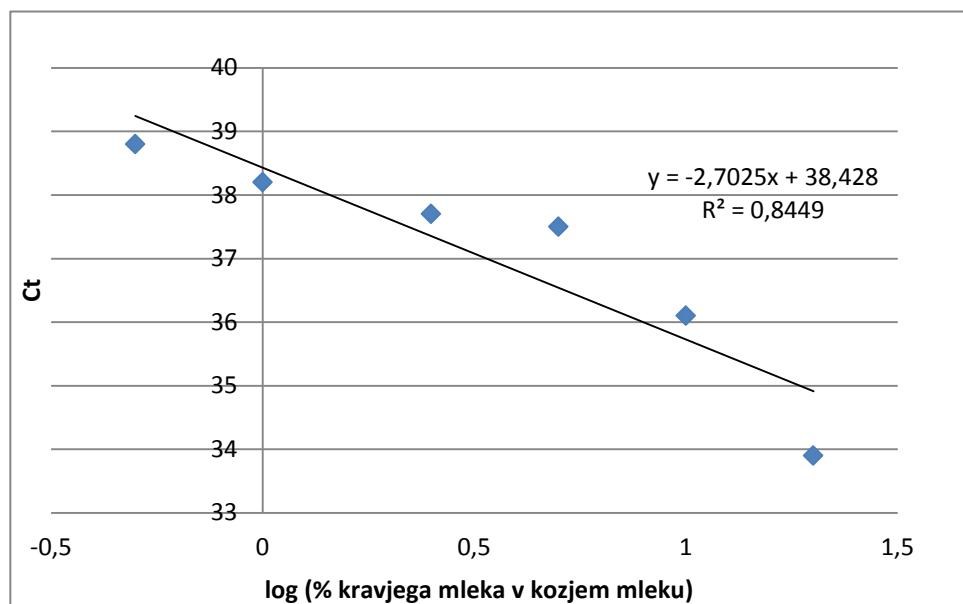
V preglednici 23 lahko vidimo, da pri vzorcih kozjega in ovčjega mleka, ki jim nismo dodali kravjega mleka, ni prišlo do pomnoževanja. Na pravilnost rezultatov kaže tudi naraščanje vrednosti  $C_t$  z vpadanjem odstotka kravjega mleka v mešanicah.

Preglednica 23: Rezultati pomnoževanja DNA za določanje praktične občutljivosti PCR v realnem času pri specifični metodi določanja pomnožkov za mešanice ovčjega in kravjega ter kozjega in kravjega mleka

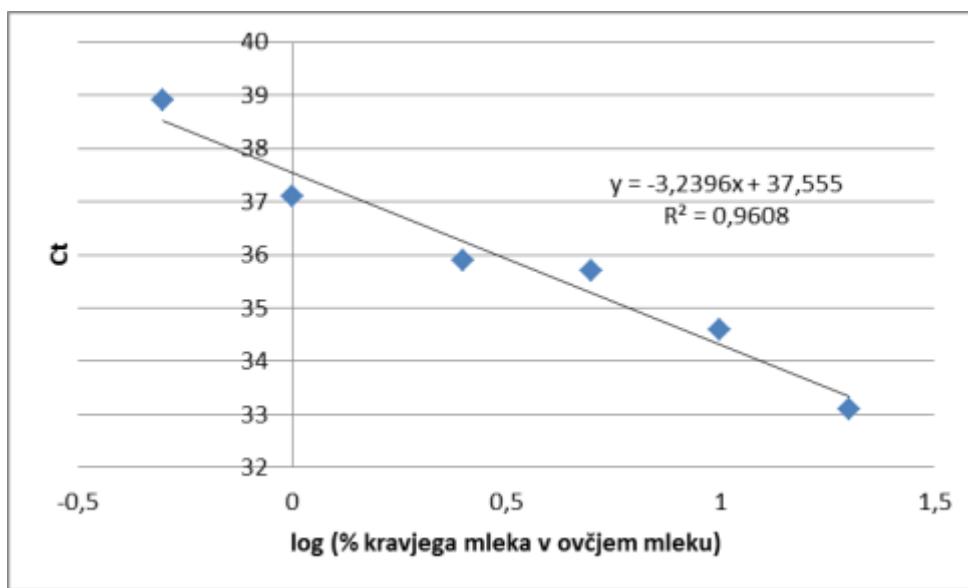
Št. vzorca	Drugo mleko	Kravje mleko (%)	Začetna konc. DNA (ng/µL)	Normalizirana konc. DNA (ng/µL)	$C_t$
1	kozje	20	14,0	1,00	33,9
2		10	12,5		36,1
3		5	15,0		37,5
4		2,5	16,0		37,7
5		1	13,0		38,2
6		0,5	10,0		38,8
7		0	18,5		/
8	ovčje	20	12,0	0,95	33,1
9		10	12,5		34,6
10		5	11,0		35,7
11		2,5	9,5		35,9
112		1	10,5		37,1
13		0,5	9,5		38,9
14		0	13,0		/

Standardno krivuljo za izračun odstotka kravjega mleka v mešanici kozjega mleka s kravjim mlekom vidimo na sliki 31. Za izdelavo standardne krivulje smo uporabili podatke vzorcev 1 do 6, ki so prikazani v preglednici 23. Njen  $R^2$  znaša 0,85; njena E je 130,4 %.

Na sliki 32 je prikazana standardna krivulja za določanje odstotka kravjega mleka v ovčjem mleku. Zajeli smo podatke iz preglednice 23, vendar smo izpustili vzorec 14, ki je vseboval 0 % kravjega mleka.  $R^2$  za standardno krivuljo znaša 0,96; E pa 103,6 %.



Slika 31: Standardna krivulja za vsebnost kravjega mleka pri specifični metodi določanja pomnožkov v mešanici kozjega mleka s kravjim mlekom



Slika 32: Standardna krivulja za vsebnost kravjega mleka pri specifični metodi določanja pomnožkov v mešanici ovčjega mleka s kravjim mlekom

#### 4.7 ZAČETNI OLIGONUKLEOTIDI IN SONDA

Začetne oligonukleotide in sondu smo izbrali na podlagi dobrih rezultatov, ki so jih objavili López-Calleja in sod. (2007b). Po opravljeni optimizaciji PCR in določanju specifičnosti smo ugotovili, da njihovih rezultatov nismo uspeli ponoviti. Razloge smo iskali v napakah pipetiranja, napakah pri izolaciji DNA, nizki koncentraciji izolirane DNA, relativno slabi čistosti izolirane DNA, v uporabljenih reagentih za izvedbo PCR, v aparatu za PCR (ABI Prism 7500) in programu, ki aparat vodi in kontrolira (7500 software v 2.05). Po servisu aparata za PCR in več ponovitvah PCR, tudi s strani drugih raziskovalcev, smo prišli do zaključka, da moramo napake iskati tudi v začetnih oligonukleotidih in sondi.

Primerjava lastnosti izbranih začetnih oligonukleotidov, sonde in pomnožkov, je pokazala, da ne ustrezajo v celoti zahtevam in priporočilom (poglavlje 2.3.1) (Applied Biosystems, 2005; Van Hee, 2013). Lastnosti začetnih oligonukleotidov so prikazane v preglednici 24. V primerih, ko lastnost začetnega oligonukleotida ali sonde ne ustreza zahtevam določenega parametra, je to označeno z rdečo barvo.

Preglednica 24: Lastnosti začetnih oligonukleotidov in sond BOS in MAN

Pogoji za začetne oligonukleotide		Razmerje G:C (%)	Ponavljanje nukleotidov	Temperatura taljenja (°C)	Konec 3'	Dolžina (bp)
BOS-F MAN-F	53	brez	58,4	2 G ali C	19	
BOS-R	33	brez	56,0	3 G ali C	24	
MAN-R	41	brez	59,5	2 G ali C	27	
Pogoji za sondu		Razmerje G:C (%)	Ponavljanje nukleotidov	Temperatura taljenja (°C)	Konec 5'	Dolžina (bp)
BOS-P MAN-P	47 %	4 krat C	79,0	brez G	32	
Pogoji za pomnožek		Dolžina pomnožka (bp)				
Pomnožek BOS		251 bp				
Pomnožek MAN		425 bp				

Začetni oligonukleotidi:

Dolžini začetnih oligonukleotidov naj bi si bili čim bolj podobni (Van Hee, 2013). Med začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za kravo, je razlika 5 nukleotidov, med

začetnima oligonukleotidoma, specifičnima za sesalce, pa kar 8 nukleotidov. Začetni oligonukleotid BOS-R ima zadnjih 5 nukleotidih gledano s konca 3', kar dvakrat nukleotid G in enkrat nukleotid C. V kolikor ne bi uporabili spremenjenega BOS-R, kot smo opisali v poglavju 3.1.5, bi imel še en dodaten nukleotid G. Poleg tega ima BOS-R temperaturo taljenja izven priporočenega območja 58-60 °C. Lastnosti ostalih začetnih oligonukleotidov (BOS-F oz. MAN-F in MAN-R) so še znotraj dovoljenih območij (Applied Biosystems, 2005).

#### Sonda:

Določanje potvorb s specifično metodo določanja pomnožkov, torej z uporabo sonde, je dalo slabše rezultate od nespecifičnega določanja pomnožkov. Pri enakih vzorcih DNA pomnoženih s specifično in z nespecifično metodo določanja pomnožkov smo opazili razliko v vrednosti  $C_t$ . Dobljene vrednosti  $C_t$  so bile višje pri vzorcih pomnoženih s specifično metodo določanja pomnožkov. Sonda ima napačno temperaturo taljenja, od zgornje meje 70 °C odstopa za kar 9 °C (Applied Biosystems, 2005). To je lahko razlog, da se je sonda slabše prilegalna na tarčno DNA. Posledično je PCR zaznaval nižji signal, kot bi ga pri optimalnem prileganju sonde. Da je signal presegel šum ozadja, je bila potrebna višja koncentracija DNA, torej potrebnih več ciklov pomnoževanja, in posledično smo določili višjo vrednost  $C_t$ . Poleg tega se pri sondi pojavi zaporedje štirih nukleotidov C, kar je še dodatno odstopanje od optimalnih parametrov (Applied Biosystems, 2005).

#### Pomnožki:

Pomnožki, specifični za kravo (BOS), in pomnožki, specifični za sesalce (MAN), so preveliki za optimalno določanje s PCR v realnem času. Priporočeno je, da so veliki od 50 do 150 bp (Applied Biosystems, 2005). V našem primeru pomnožek BOS od zgornje meje odstopa za 100 bp, pomnožek MAN pa za celih 275 bp. Tudi to je lahko razlog za probleme, ki smo jih imeli s pomnoževanjem in detekcijo DNA s PCR v realnem času. Pri začetnih oligonukleotidih MAN so bile v primerjavi z začetnimi oligonukleotidi BOS vrednosti  $C_t$  in E umeritvene krivulje slabše. Morda je razlog v večjem odstopanju pomnožkov MAN od optimalne vrednosti.

### 4.8 qPCR ZA DOLOČANJE KRAVJEGA MLEKA

Kvantifikacijo kravjega mleka smo poskušali izvesti na različnih vzorcih kozjega in ovčjega mleka, ki so vsebovali 20 %, 10 % in 5 % kravjega mleka. Nižjih vrednosti nismo poskušali kvantificirati, saj pri tako nizkih odstotkih težko govorimo o potvorbi (Jürg in sod., 2013). Mešanice, ki smo jih poskusili kvantificirati so bile:

- a. vzorci DNA mleka, ki smo ga uporabili za pripravo praktičnih umeritvenih krivulj (mleko s tržnice Koseze);

- b. vzorci DNA iz mešanic mleka iz drugega vira (mleko s planine Mangart in kmetije Potokar).

Kljub temu, da smo imeli v teoriji postavljeni tako metodi za nespecifično, kot za specifično določanje pomnožkov, smo kvantifikacijo v praksi preizkusili samo z nespecifično metodo. Tako smo se odločili zaradi šibkega signala, visokih in slabo ponovljivih vrednosti  $C_t$ , ki smo jih dobili pri metodi s specifičnim določanjem pomnožkov. Sklepamo, da je razlog za težave v dizajnu sonde (poglavlji 2.3.1 in 4.7 (Applied Biosystems, 2005; Van Hee, 2013)).

qPCR za detekcijo kravjega mleka v mešanicah ovčjega in kozjega mleka s kravjim mlekom lahko izvedemo (López-Calleja in sod., 2007b) tako, da za kvantifikacijo uporabimo standardno DNA (poglavlje 4.6.1). Uporabili smo standardno DNA, ki smo jo pridobili z vstavitvijo pomnožka v plazmidni vektor *E. coli* JM109 (poglavlje 3.3.3). Odstotek kravjega mleka v mešanicah smo izračunali po enačbi 1 (poglavlje 2.2.1).

Pogosto uporabljena metoda za kvantifikacijo rezultatov PCR v realnem času temelji na razliki  $C_t$  vrednosti ( $\Delta\Delta C_t$ ), ki sta jo leta 2001 predstavila Livak in Schmittgen. Za kvantifikacijo potrebujemo rezultate PCR v realnem času enega vzorca z znanim odstotkom dodanega kravjega mleka. Želeli smo izničiti vpliv vrste mleka, zato smo, odvisno od preiskovanih vzorcev mleka, uporabili različen standardni vzorec: kozje mleko z 10 % kravjega mleka ali ovče mleko potvorjeno z 10 % kravjega mleka. Odstotek kravjega mleka smo izračunali po enačbi 4 (poglavlje 3.3.9).

Za izvedbo kvantifikacije smo pripravili tudi praktične umeritvene krivulje iz rezultatov pomnoževanja izolirane DNA iz mešanic kozjega mleka s kravjim mlekom in mešanic ovčjega mleka s kravjim mlekom. Uporabili smo mešanice kozjega in ovčjega mleka, ki so vsebovale 20 %, 10 % in 5 % kravjega mleka. Pri uporabi metode v praksi je potrebno zagotoviti, da bosta umeritveni krivulji čim bolj ustrezali razmeram, pri katerih je bil analiziran preiskovan(i) vzorec(i). Razmere za vzorce, ki bodo tvorili umeritveno krivuljo in preiskovane vzorce, morajo biti čim bolj podobne. Zato je pri praktičnem določanju količine kravjega mleka v mešanicah s kozjim in ovčjim mlekom neustrezno, da pripravimo umeritveni krivulji, in na podlagi njih vsakič znova kvantificiramo količino kravjega mleka v mešanicah. Da zagotovimo čim bolj točne rezultate, je potrebno pri vsaki izvedbi kvantitativnega PCR izdelati tudi umeritveni krivulji. Izdelali smo novi umeritveni krivulji, za kateri smo uporabili rezultate pomnoževanja DNA, pridobljene istočasno, kot rezultate pomnoževanja preiskovanih vzorcev.

Preglednica 25: Kvantifikacija kravjega mleka v mešanicah s kozjim mlekom

Mleko	% kravjega mleka	C <sub>t</sub> BOS	C <sub>t</sub> MAN	Kvantifikacija (% kravjega mleka)		
				López-Calleja in sod. (2007b)	Livak in Schmittgen (2001)	UK
<b>Koseze kozje mleko</b>	<b>20</b>	22,1	20,8	4,8	13,2	15,1
	<b>10</b>	22,7	20,8	4,9	2,0	11,3
	<b>5</b>	23,7	20,3	5,3	5,5	5,7
<b>Mang. kozje mleko</b>	<b>20</b>	22,0	19,8	5,0	2,4	10,2
	<b>10</b>	22,4	20,8	4,8	1,5	13,8
	<b>5</b>	24,5	21,8	5,1	3,4	7,9
<b>Koseze ovčje mleko</b>	<b>20</b>	21,4	21,7	4,5	0,1	34,0
	<b>10</b>	23,1	21,8	4,8	0,4	6,0
	<b>5</b>	23,3	21,0	5,0	0,8	2,1
<b>Mang. ovčje mleko</b>	<b>20</b>	21,5	20,1	4,8	0,4	5,6
	<b>10</b>	23,6	21,2	5,0	0,9	1,7
	<b>5</b>	25,4	23,3	4,9	0,7	2,4

**Legenda:** **Koseze:** ponovno izolirani vzorci DNA iz na novo pripravljenih mešanic mleka, ki smo ga uporabili za izvedbo praktičnih umeritvenih krivulj (mleko s tržnice Koseze); **Mang.:** vzorci DNA iz mešanic mleka iz drugega vira (mleko s planine Mangart in kmetije Potokar); **UK:** umeritvena krivulja

V preglednici 25 so prikazane C<sub>t</sub> vrednosti za vzorce potvorjenega kozjega in ovčjega mleka. Z začetnimi oligonukleotidi MAN pomnožujemo skupno sesalsko DNA (npr. kozjo in kravjo) v preiskovanem vzorcu. Zgornji vzorci so bili pred pomnoževanjem normalizirani na enako koncentracijo DNA (1 ng/µL). V teoriji bi pričakovali, da bi pri uporabi začetnih oligonukleotidov MAN iz enake koncentracije tarčne DNA pridobili enake C<sub>t</sub> vrednosti. Sklepamo, da je do odstopanj prišlo zaradi različne učinkovitosti PCR, ki je lahko posledica variabilnih količin inhibitorjev v preiskovanih vzorcih in slabega dizajna začetnih oligonukleotidov MAN. Pravilno pa je pri vseh vzorcih C<sub>t</sub> vrednost obratno sorazmerna z odstotkom kravjega mleka v potvorjenem kozjem ali ovčjem mleku.

Kvantifikacija odstotka kravjega mleka preko standardne plazmidne DNA (López-Calleja in sod., 2007b) ni prinesla zadovoljivih rezultatov (preglednica 25). V vseh 12 primerih je določena potvorba okoli 5 % dodatka kravjega mleka. Rezultat je pravilen za 4 vzorce, vendar je za ostale vzorce določen odstotek napačno prenizek oz. napačno previsok.

Princip kvantifikacije temelji na standardni DNA, v katero je vstavljen pomnožek MAN. Za kvantifikacijo izvedemo tri vzporedne PCR: s standardno tarčno DNA in začetnimi oligonukleotidi BOS, z neznanim vzorcem in začetnimi oligonukleotidi BOS in z neznanim vzorcem in začetnimi oligonukleotidi MAN. Potrebno je zagotoviti enako

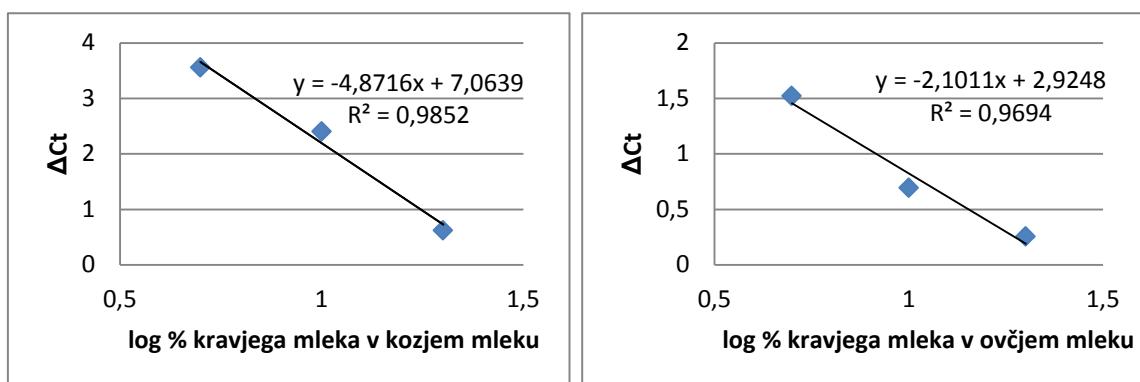
začetno koncentracijo DNA za vse tri vzorce, zato jih normaliziramo na najvišjo možno skupno koncentracijo. V primeru, da je v neznanem vzorcu samo kravje mleko, bi morale imeti vse 3 reakcije enako  $C_t$  vrednost. Vzorec, ki vsebuje nižji delež kravje DNA pa bi moral imeti sorazmerno višjo  $C_t$  vrednost pri pomnoževanju z začetnimi oligonukleotidi BOS od  $C_t$  vrednosti pri pomnoževanju z začetnimi oligonukleotidi MAN.  $C_t$  vrednosti tega vzorca pri pomnoževanju z začetnimi oligonukleotidi MAN in standardne DNA pa bi morali biti enaki. Metoda lahko uspešno deluje, če je učinkovitost PCR pomnoževanja DNA pri vseh treh reakcijah enaka. Tekom naloge smo preizkusili 12 različnih izolacij DNA iz mleka (poglavlje 4.2), a nam ni uspelo izolirati DNA brez inhibitorjev PCR (npr. kalcija (Bickley in sod., 1996; Wilson, 1997)). Problem inhibicije smo za namene kvantifikacije poskušali omiliti z redčenjem in normalizacijo vzorcev. Kljub temu je bila iz krivulj pomnoževanja jasno vidna razlika v učinkovitosti PCR s standardno DNA in učinkovitosti PCR z DNA vzorcev mleka.

Dodatne težave pri kvantifikaciji s standardno DNA povzroča število somatskih celic v kozjem ali ovčjem mleku in kravjem mleku. Število somatskih celic v mleku je znotraj vrste zelo variabilno, poleg tega pa se normalne vrednosti števila somatskih celic razlikujejo med vrstami (poglavlje 2.1.5). Metoda bi uspešno delovala, če bi bilo potvorjeno mleko sestavljeni iz kozjega oz. ovčjega mleka in kravjega mleka z enakima številoma somatskih celic. Somatske celice so vir DNA, ki jo pomnožujemo s PCR, in direktno vplivajo na določene  $C_t$  vrednosti. Vzorec mleka z višjim številom somatskih celic bo imel večjo koncentracijo DNA in zato prej dosegel  $C_t$  vrednost, kot vzorec z nizkim številom somatskih celic. Podrobnejše je problem razložen v poglavju 4.8.1.

Odstotek kravjega mleka smo poskusili kvantificirati tudi z metodo relativne kvantifikacije, ki sta jo leta 2001 opisala Livak in Schmittgen in temelji na razliki  $C_t$  vrednosti ( $\Delta\Delta C_t$ ) enega standardnega vzorca in preiskovanega vzorca. Rezultati iz preglednice 25 se ne skladajo z realnimi odstotki kravjega mleka v mešanicah, pri večini vzorcev smo določili prenizko vsebnost kravjega mleka. Po tej metodi vzorce kvantificiramo glede na en standardni vzorec. Sklepali smo, da bo kvantifikacija pravilnejša, če bi iz več standardnih vzorcev pripravili umeritveno krivuljo.

Umeritvene krivulje smo pripravili za kozje in ovče mleko tako, da smo na abscisno os nanesli logaritmirano vsebnost kravjega mleka, na ordinato pa razliko vrednosti  $C_t$ , določene z začetnimi oligonukleotidi BOS, in vrednosti  $C_t$ , določene z začetnimi oligonukleotidi MAN (slika 33). Standardni vzorci so vsebovali 20 %, 10 % in 5 % kravjega mleka. Tako dobljeni enačbi umeritvenih krivulj, po katerih smo izračunali

odstotek kravjega mleka, sta bili za v kozjem mleku (enačba 7) in v ovčjem mleku (enačba 8):



Slika 33: Umeritvene krivulje za kvantifikacijo kravjega mleka v mešanicah kozjega oz. ovčjega mleka s kravjim mlekom

e. število somatskih celic v mleku je zelo variabilno (2.1.5, 4.1 in priloge A, B ter C).

V okviru tega magistrskega dela smo preizkusili 12 različnih metod izolacije DNA iz mleka (4.2). Najboljše rezultate smo dosegli z metodo dvakratne izolacije s fenokloroformom. Za nadaljnje delo smo zaradi časovne zamudnosti te metode izbrali drugo najboljšo metodo, izolacijo s komercialnim kompletom NucleoSpin Food. Podrobnejše raziskave s poudarkom na odstranjevanju že znanih inhibitorjev prisotnih v vzorcih mleka (Powell in sod., 1994; Bickley in sod., 1996), bi lahko doprinesle k razvoju nove metode, ki bi prinesla ponovljive koncentracije izolirane DNA in jo očistila inhibitorjev PCR.

López-Calleja in sod. (2007b) so v objavi »Real-time TaqMan PCR for quantitative detection of cows' milk in ewes' milk mixtures« opisali uspešno metodo kvantifikacije kravjega mleka v mešanicah ovčjega mleka s kravjim mlekom. Del magistrske naloge je bil zasnovan z namenom, da bi njihove rezultate ponovili, s tem potrdili uspešnost metode in jo poskušali prenesti v prakso. Uporabili smo enake začetne oligonukleotide, enako napravo PCR in enak časovno-temperaturni program (3.3.4). Njihovih rezultatov nismo uspeli ponoviti in po podrobnejšem pregledu dizajna začetnih oligonukleotidov smo naleteli na vrsto neustreznosti (2.3.1 in 4.7), ki lahko vplivajo na specifičnost in slabo učinkovitost PCR.

Poleg López-Calleja in sod. (2007b) so uspešno kvantifikacijo kravjega mleka v mešanicah z mlekom druge vrste živali potrdili tudi drugi avtorji (Mininni in sod., 2009; Dąbrowska in sod., 2010; Jürg in sod., 2013). Nasprotno pa Mayer in sod. (2012) trdijo, da je kvantifikacija kravjega mleka le mit. Metodo kvantifikacije potvorb mleka preko PCR detekcije DNA somatskih celic kritizirajo zaradi variabilnega števila somatskih celic v mleku. Podobno so dvome o kvantifikaciji izpostavili tudi Dąbrowska in sod. (2010). V svoji objavi so v diskusiji zapisali, da je iz njihovih rezultatov razviden pomemben vpliv vsebnosti somatskih celic v vzorcih. Trdijo, da 5 % dodatek kravjega mleka z 800 000 SC/mL privede do enake relativne kvantifikacije kravje DNA, kot 20 % dodatek kravjega mleka s 50 000 SC/mL. Podatki o številu somatskih celic v mleku krav, koz in ovc v Sloveniji kažejo na visoko nihanje znotraj vrste živali in med posameznimi živalmi (priloge A, B ter C). Kravje mleko, primerno za uživanje, ne sme vsebovati več kot 400 000 SC/mL (Pravilnik o veterinarskih ..., 2004). V primeru kozjega in ovčjega mleka pa zgornja meja ni določena in je naravno lahko zelo visoka, predvsem pri kozjem mleku tudi čez 5 milijonov SC/mL (Park in Haenlein, 2006). Visoko število somatskih celic so vsebovali tudi vzorci, ki smo jih uporabili v okviru magistrskega dela (4.1, preglednica 8). Metoda kvantifikacije kravjega mleka v mešanicah z mlekom drugih živali temelji na razmerju somatskih celic krave in vseh somatskih celic (krave in druge živali). V primeru, da je bilo ŠSC/mL kravjega mleka in ŠSC/mL potvorjenega mleka (približno) enako in da

so bili izpolnjeni ostali pogoji (dobra ekstrakcija, dober dizajn začetnih oligonukleotidov), bi bil določen odstotek kravjega mleka pravilen.

Preglednica 26: Teoretičen prikaz vpliva variabilnega števila somatskih celic v kravjem in kozjem mleku na odstotek kravjih somatskih celic v mešanicah kravjega in kozjega mleka

Meša-nica	Kravje mleko			Kozje mleko			Krave SC (%)
	SC/mL	V (mL)	Delež (%)	SC/mL	V (mL)	Delež (%)	
1	50 000	200	20	200 000	800	80	6,0
2	200 000			200 000			20,0
3	400 000			200 000			33,3
4	50 000			700 000			1,8
5	200 000			700 000			6,7
6	400 000			700 000			12,5
7	50 000			1 500 000			0,8
8	200 000			1 500 000			3,2
9	400 000			1 500 000			6,3
10	50 000	100	10	200 000	900	90	3,0
11	200 000			200 000			10,0
12	400 000			200 000			18,2
13	50 000			700 000			0,8
14	200 000			700 000			3,1
15	400 000			700 000			6,0
16	50 000			1 500 000			0,4
17	200 000			1 500 000			0,5
18	400 000			1 500 000			2,9
19	50 000	50	5	200 000	950	95	1,0
20	200 000			200 000			5,0
21	400 000			200 000			9,5
22	50 000			700 000			0,4
23	200 000			700 000			1,5
24	400 000			700 000			2,9
25	50 000			1 500 000			0,2
26	200 000			1 500 000			0,7
27	400 000			1 500 000			1,4

Za lažjo primerjavo možne napake, ki jo storimo pri kvantifikaciji kravjega mleka, smo za primer kozjega mleka pripravili preglednico 26. Izbrali smo po 3 realno možne vrednosti ŠSC/mL kravjega in kozjega mleka:

- kravje mleko: 50 000 SC/mL; 200 000 SC/mL; 400 000 SC/mL;
- kozje mleko: 200 000 SC/mL; 700 000 SC/mL; 1 500 000 SC/mL.

Za potvorbe kozjega mleka z 20 %, 10 % in 5 % kravjega mleka smo žeeli preveriti vpliv somatskih celic. Za vse možne kombinacije izbranih števil somatskih celic in odstotkov potvorbe smo izračunali končni delež kravjih somatskih celic v potvorjenem mleku. Delež kravjih somatskih celic v mešanici namreč predstavlja tudi delež kravje DNA v vzorcu in s tem direktno vpliva na kvantifikacijo kravjega mleka s PCR v realnem času. Enak odstotek kravje DNA v skupni sesalski DNA, kot je bil dejanski dodatek kravjega mleka v mešanici, dobimo samo, ko je število somatskih celic v kravjem mleku enako številu somatskih celic v kozjem mleku.

Iz preglednice 26 lahko vidimo, kako zelo lahko število somatskih celic v mleku vpliva na rezultate kvantifikacije. Kvantifikacija po metodi s standardno plazmidno DNA, ki so jo opisali López-Calleja in sod. (2007b), je lahko uspešna le, če potvorjeno mleko (npr. kozje) in mleko s katerim smo potvarjali (npr. kravje) vsebujeta enako ŠSC/mL. Do podobnih težav bi prišli pri kvantifikaciji odstotka kravjega mleka po metodi relativne kvantifikacije, ki jo sta jo opisala Livak in Schmittgen (2001), in tudi po metodi z umeritvenimi krivuljami pripravljenimi iz mešanic mleka. Metodi sta lahko uspešni le, če so preiskovani vzorci bili pripravljeni iz kozjega in kravjega mleka z enakimi števili somatskih celic, kot vzorci, s katerimi smo pripravili umeritveno krivuljo. V našem primeru je opazna nekolikšna razlika v napaki kvantifikacije med vzorci s tržnice Koseze in vzorci s Planine Mangart ob uporabi umeritvene krivulje pripravljene iz mleka s tržnice Koseze (4.8).

Prepričani smo, da bi bila napaka manjša in morda tudi sprejemljiva, če bi bila izolacija DNA iz mleka boljša in dizajn začetnih oligonukleotidov optimalen. Merjenje števila somatskih celic opravljam na mleku ene živali, v mlekarnah pa se dnevno zbere in premeša mleko različnih živali. To bi lahko povzročilo, da pri vzorcih mleka na tržišču ne bo prisotnih ekstremnih vrednosti števila somatskih celic, ki sedaj v teoriji (preglednica 26) in praksi (preglednica 25) otežujejo kvantifikacijo odstotka kravjega mleka.

#### 4.9 KONCENTRACIJA PROTEINOV

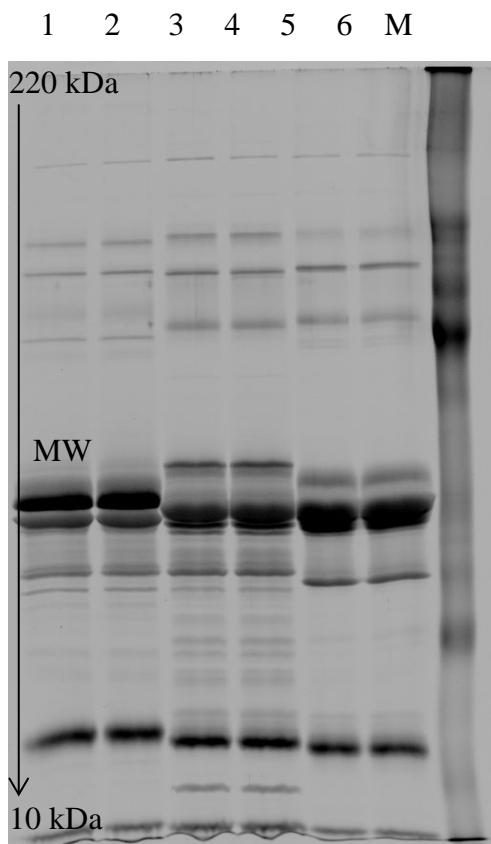
Koncentracijo proteinov smo določali po metodi po Bradfordu, ki je opisana v poglavju 3.3.10. Izkazalo se je, da je najustreznejša redčitev vzorcev mleka 20 kratna. Natančnejše koncentracije so prikazane v preglednici 27.

Preglednica 27: Koncentracije proteinov v 20 krat redčenih vzorcih mleka in v neredčenih vzorcih surovega mleka

Vzorec mleka	$c_{povp.} \text{ (g/L)} - 20 \times R$	$c_{povp.} \text{ (g/L)}$
Kravje mleko	0,71	14,2
Kozje mleko	0,65	13,0
Ovčje mleko	1,21	24,2

#### 4.10 SDS-PAGE ELEKTROFOREZA

Slika 34 prikazuje rezultate SDS-PAGE elektroforeze proteinov kravjega, kozjega in ovčjega mleka. S to metodo proteine razporedimo po molekulski masi. Na sliki 34 vidimo, da se pri kravjem, kozjem in ovčjem mleku pojavljajo različni proteini, vendar nismo mogli določiti takega proteina, ki bi se razločno pojavil samo pri vzorcu kravjega mleka. Sklepali smo, da bomo do tega lahko prišli s pomočjo 2-D elektroforeze, kjer poleg ločevanja po masi, proteine ločimo še po izoelektrični točki.



Slika 34: Proteinski profil kravjega, kozjega in ovčjega mleka (SDS-PAGE)

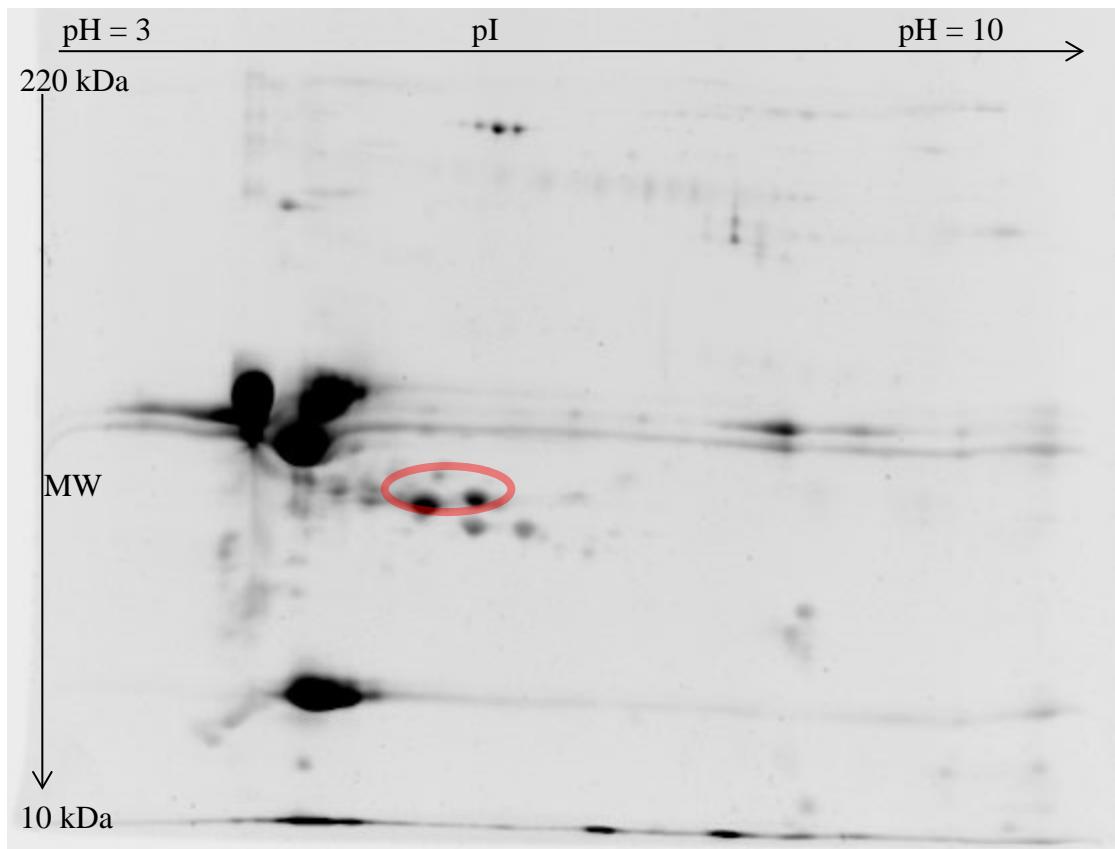
**Legenda:** 1: kravje mleko; 2: kravje mleko; 3: kozje mleko; 4: kozje mleko; 5: ovče mleko; 6: ovče mleko;  
M: raztopina proteinov znanih molekulskih mas od 10 do 220 kDa

#### 4.11 2-D ELEKTROFOREZA

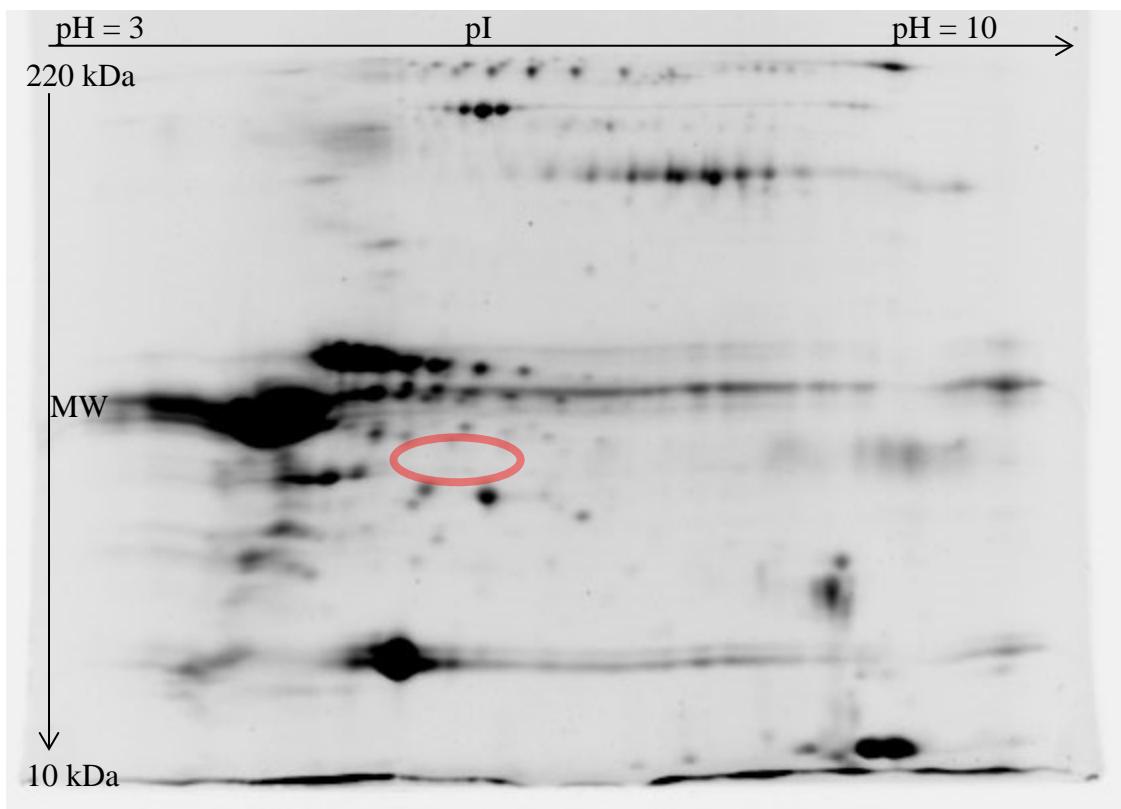
##### 4.11.1 2-D elektroforeza proteinov čistega mleka

2-D elektroforezo smo najprej izvedli na vzorcih proteinov čistega kravjega, kozjega in ovčjega mleka. Iskali smo tak protein, ki bi se pojavil pri kravjem mleku in hkrati ne bi bil prisoten pri ovčjem in kozjem mleku. Želeli smo, da bi bil tak protein v čim višji koncentraciji in bi ga tako lažje zaznali tudi v mešanicah mleka. Koncentracijo proteina lahko ocenimo glede na intenziteto in obširnost lise na sliki gela 2-D elektroforeze.

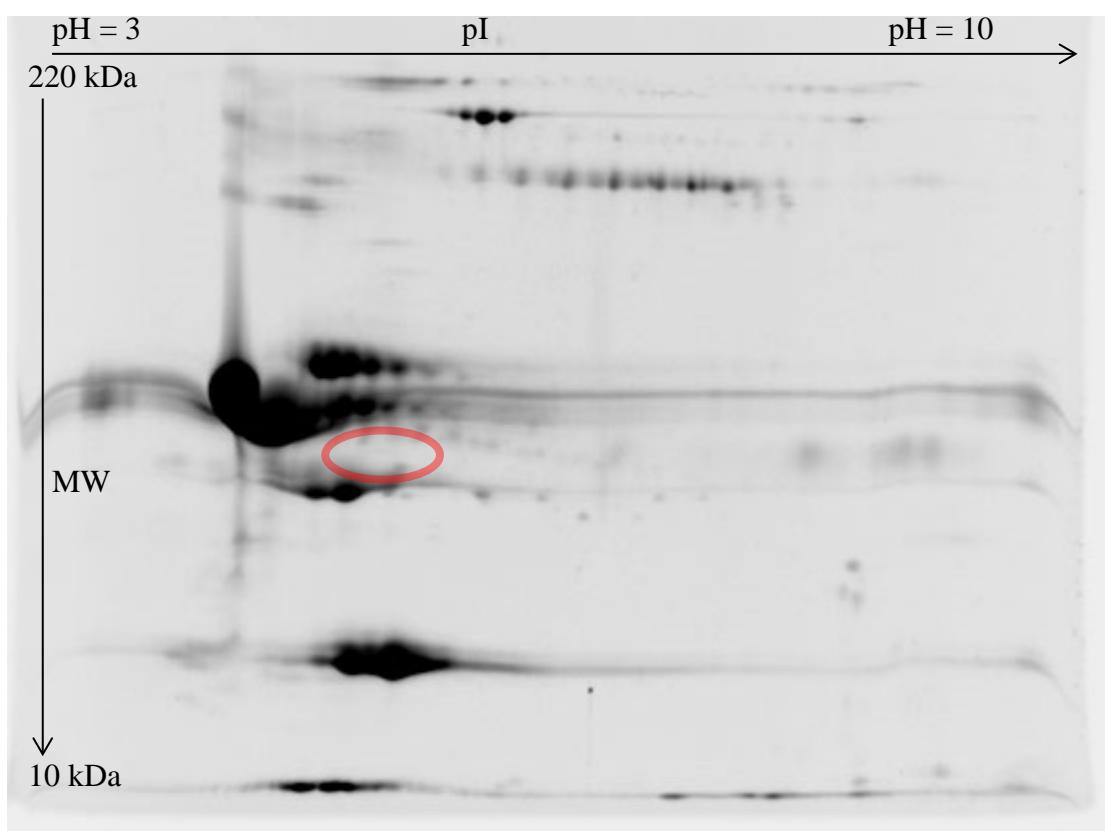
Analiza slik gelov 2-D elektroforeze je pokazala, da se pri kravjem mleku pojavita kar dve različni lisi, ki ustrezata zgoraj opisani zahtevi. Na sliki 35 sta obkroženi z rdečo barvo. Ravno tako je enaka označba uporabljena na slikah 36 in 37, ki prikazujeta 2-D elektroforezo čistega kozjega in ovčjega mleka. Vidimo, da se na enakem mestu ne pojavijo lise, kar kaže na specifičnost kravjih proteinov označenih na sliki 35.



Slika 35: Proteinski profil kravjega mleka z označenim mestom, kjer se pojavijo proteini, specifični za kravje mleko (2-D elektroforeza)



Slika 36: Proteinski profil kozjega mleka z označenim mestom, kjer se pojavijo proteini, specifični za kravje mleko (2-D elektroforeza, slika 35)



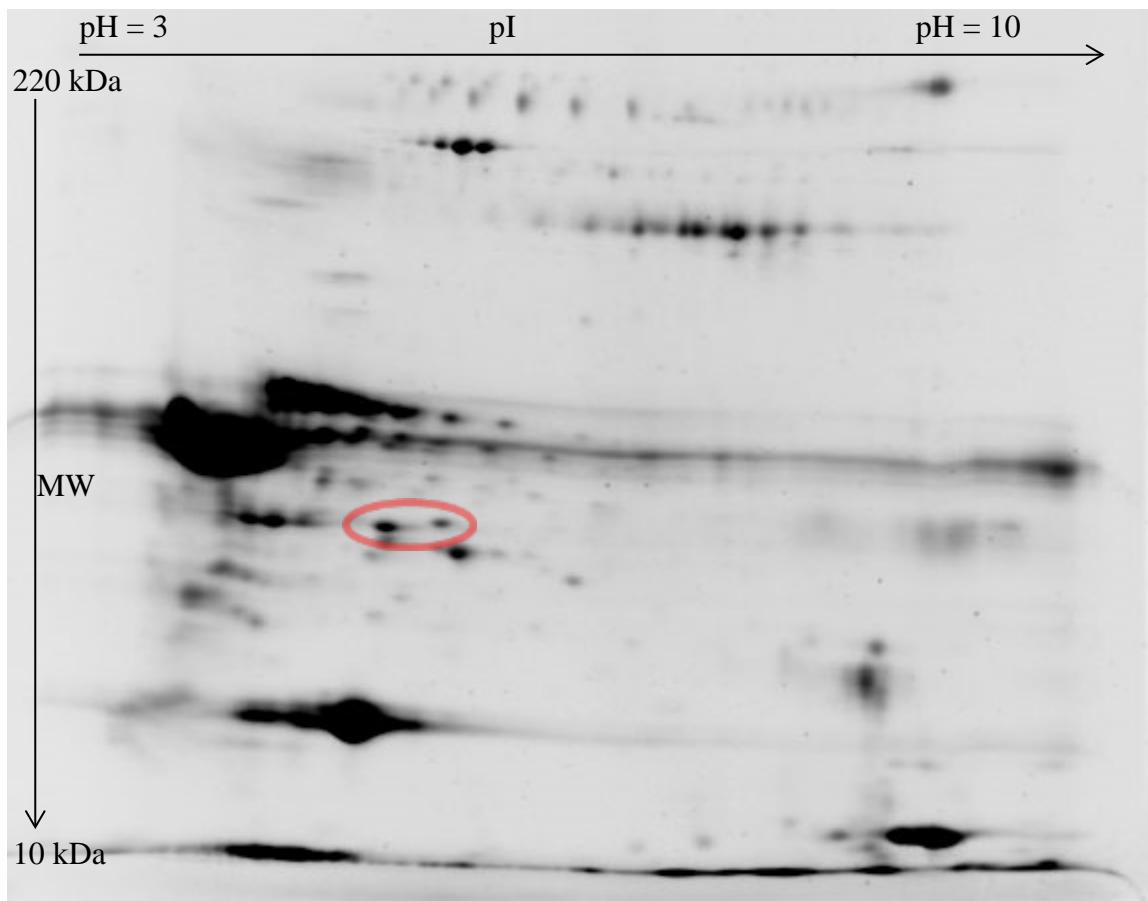
Slika 37: Proteinski profil ovčjega mleka z označenim mestom, kjer se pojavijo proteini, specifični za kravje mleko (2-D elektroforeza, slika 35)

#### 4.11.2 2-D elektroforeza proteinov iz mešanic mleka

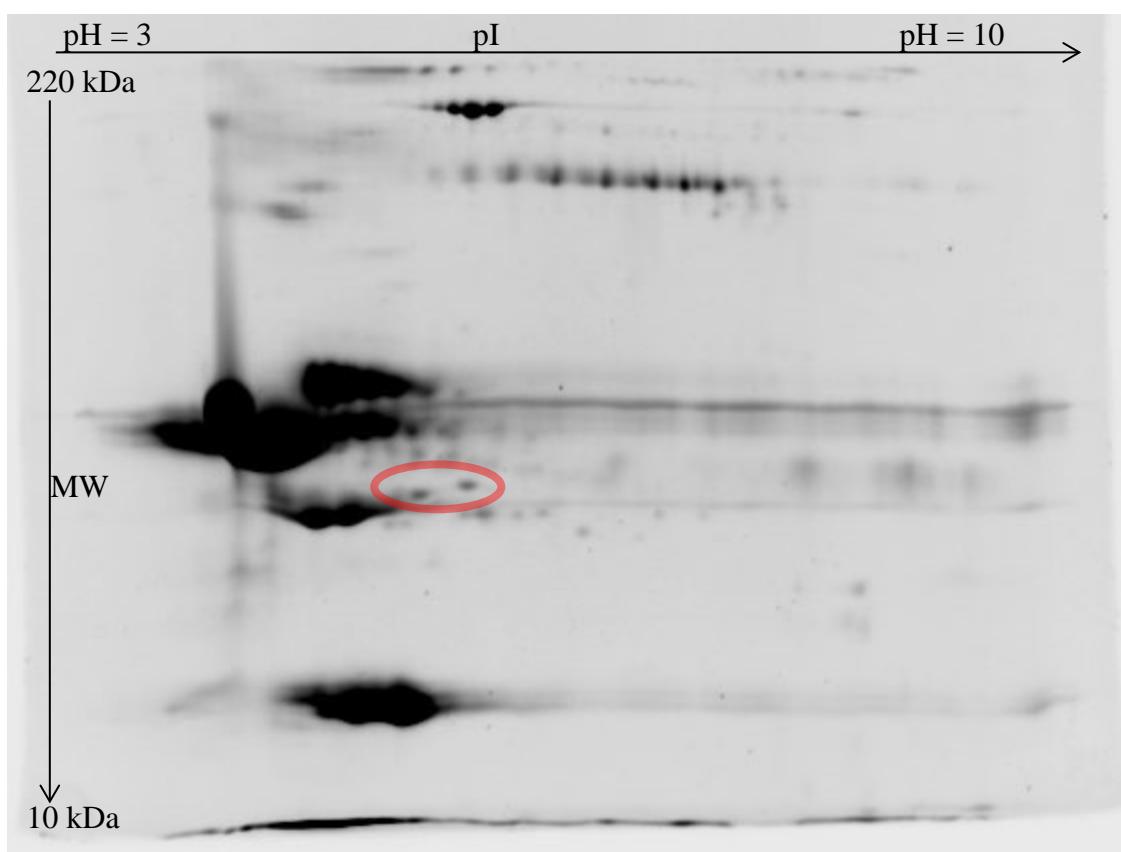
Izvedli smo 2-D elektroforezo proteinov iz mešanic kozjega mleka z 10 % kravjega mleka in ovčjega mleka z 10 % kravjega mleka.

Na sliki 38, ki prikazuje rezultate 2-D elektroforeze mešanice kozjega mleka z 10 % kravjega mleka, lahko vidimo, da se na označenem mestu pojavit dve lisi, ki ustreza lokaciji in obliki specifičnih kravjih proteinov, ki smo jih določili v poglavju 4.11.1. Opazimo lahko tudi, da sta lisi manj intenzivni, kar nakazuje, da se v mešanici mleka pojavljata v nižji koncentraciji. Ugotovitev drži, saj smo v mešanici imeli le 10 % kravjega mleka.

Do enakih opažanj lahko pridemo tudi z ogledom slike 2-D elektroforeze mešanica ovčjega mleka z 10 % kravjega mleka (slika 39). V primerjavi z 2-D elektroforezo mešanice kozjega mleka s kravjim mlekom, pa sta lisi manj intenzivni. Do razlike pride zaradi višje začetne koncentracije proteinov v ovčjem mleku.



Slika 38: Proteinski profil mešanice kozjega mleka s kravjim mlekom z označenim mestom, kjer se pojavijo proteini, specifični za kravje mleko (2-D elektroforeza)



Slika 39: Proteinski profil mešanice ovčjega mleka s kravjim mlekom z označenim mestom, kjer se pojavijo proteini, specifični za kravje mleko (2-D elektroforeza)

#### 4.12 ANALIZA SPECIFIČNIH PROTEINOV KRAVJEGA MLEKA

Proteine, ki smo jih določili kot specifične kravje, smo izrezali iz vseh treh gelov (100 % kravje mleko, 10 % kravjega mleka v kozjem mleku in 10 % kravjega mleka v ovčjem mleku) in poslali na identifikacijo. Na Oddelku za biologijo Univerze v Yorku so izvedli MALDI-MS/MS spektrometrijo in proteinske lise s pomočjo podatkovne zbirke NCBI identificirali (priloga F). V vseh vzorcih je bil identificiran prekurzor κ-kazeina (*Bos taurus*).

Kazeini so v primerjavi z serumskimi proteini mleka precej bolj odporni na temperaturo in ne denaturirajo pri temperaturah pasterizacije ali UHT obdelavi (Mayer in sod., 1997; De Block, 2013). Z 2-D elektroforezo smo analizirali le vzorce surovega mleka, a pričakujemo, da bi se kravji proteini, ki smo jih določili kot specifične, pojavili tudi pri toplotno obdelanem mleku. Proteini, ki smo jih določili za specifične, spadajo med kazeine.

V našem primeru detekcije kravjega mleka v mešanicah kozjega oziroma ovčjega mleka s kravjim mlekom je metoda delovala. Za detekcijo potvorb sirov pa je metoda le delno prenosljiva in potrebno bi bilo narediti dodatne analize, s katerimi bi potrdili ali ovrgli njen delovanje na vzorcih sirov. Določen specifičen kravji protein spada med kazeine in se pri izdelavi sira ne bo izločil kot sestavina sirotke. Vendar med zorenjem sirov poteka hitra razgradnja proteinov in peptidov (Park in Jin, 1998), ki bi otežila ali onemogočila določanje potvorb z 2-D elektroforezo. Do razgradnje  $\kappa$ -kazeina in s tem do otežitve določanja potvorb bi prišlo pri zelo zorjenih sirih, pri mladih, nezorjenih sirih pa bi bile take težave manjše.

Da bi dokončno potrdili primernost 2-D elektroforeze za določanje potvorb kozjega in ovčjega mleka s kravjim mlekom, je potrebno opraviti ponovite poskusa z drugimi viri mleka. Primerjava proteinskih slik 2-D elektroforeze vzorcev mleka drugih krav, koz in ovc z drugih geografskih območij je bistvena za nadaljnji razvoj metode. V kolikor bi bili naši rezultati ponovljivi z novimi vzorci, bi metoda bila primerna za določanje potvorb. Zaradi prevelikega obsega tega dela nismo opravili v okviru te naloge.

#### 4.13 BIOINFORMATSKA ANALIZA

$\kappa$ -kazein je sestavina mleka vseh sesalcev. Njegova funkcija je stabilizacija kazeinske micele, s čimer prepreči precipitacijo kazeinov v mleku. Ob dodatku sirišča pa razпадa na para- $\kappa$ -kazein in makropeptid. Znotraj  $\kappa$ -kazeina pa najdemo še manjše peptide, kot so kazoksin-C, kazoksin-6, kazoksin-A, kazoksin-B in kazoplatelin.  $\kappa$ -kazeini različnih sesalcev so si med seboj zelo podobni, delno se razlikujejo po aminokislinski sestavi in po posttranslacijskih spremembah. V nadaljevanju so primerjani  $\kappa$ -kazeini kravjega, kozjega in ovčjega mleka (UniProt, 2013).

Preglednica 28: Primerjava lastnosti  $\kappa$ -kazeinov kravjega, kozjega in ovčjega mleka (UniProt, 2013)

Parameter	$\kappa$ -kazein		
	Kravje mleko	Kozje mleko	Ovče mleko
Število aminokislin	169	171	171
Masa (kDa)	21,269	21,441	21,438
Teoretična izoelektrična točka (pH)	5,93	5,31	5,53
Posttranslacijske spremembe (št.)	15	4	4

K-kazeini kravjega mleka vsebujejo 169 aminokislin, to je 2 aminokislini manj kot  $\kappa$ -kazeini kozjega in ovčjega mleka (preglednica 28) (UniProt, 2013). Posledično je tudi njihova molekulska masa nekoliko nižja od molekulske mas  $\kappa$ -kazeinov kozjega in

ovčjega mleka. Vendar je razlika v molekulski masi vseeno premajhna in ni bilo mogoče opaziti razlike na proteinski sliki SDS-PAGE elektroforeze kravjega, kozjega in ovčjega mleka.

1	MMKSFFLVVTILALTLPLFLGA	EQNQE <b>QPIRC</b> EKDERFFSDKIAKYIPIQYVLSRYPYG	60	P02668	CASK_BOVIN
1	MMKSFFLVVTILALTLPLFLGA	EQNQE <b>QPIC</b> EKDERFFDDKIAKYIPIQYVLSRYPYG	60	P02670	CASK_CAPHI
1	MMKSFFLVVTILALTLPLFLGA	EQNQE <b>QRIC</b> EKDERFFDDKIAKYIPIQYVLSRYPYG	60	P02669	CASK_SHEEP
	*****	*****			
61	LNYQQQKPVALINNQFLPYPYYAKPAAVRSPAQILQWQVLNSNTVPAKS	QAQPPTTMARHP	120	P02668	CASK_BOVIN
61	LNYQQQRPVALINNQFLPYPYYAKPVAVRSPAQTLQWQVLPTVPAKSCDQPTTILARHP	120	P02670	CASK_CAPHI	
61	LNYQQQRPVALINNQFLPYPYYAKPVAVRSPAQTLQWQVLNAVPAKSCDQPTAMARHP	120	P02669	CASK_SHEEP	
	*****	*****			
121	HPHLSFMAIPPKKNQDKTEIP	INTIAS <b>GEP</b> T-- <b>IPT</b> TEAVEST <b>VATILED</b> SPEVIESPP	178	P02668	CASK_BOVIN
121	HPHLSFMAIPPKKDQDKTEVP	AIN <b>PAINT</b> IAS <b>AEP</b> TVHST <b>PT</b> TEAIVNTVDNPEASSESIASAS	180	P02670	CASK_CAPHI
121	HPHLSFMAIPPKKDQDKTEIP	AIN <b>PAINT</b> IAS <b>AEP</b> TVHST <b>PT</b> TEAVVNAVDNPEASSESIASAP	180	P02669	CASK_SHEEP
	*****	*****			
179	EINTVQ <b>V</b> ISTAV	190	P02668	CASK_BOVIN	
181	ETNTIAQ <b>V</b> ISTEV	192	P02670	CASK_CAPHI	
181	ETNTIAQ <b>V</b> ISTEV	192	P02669	CASK_SHEEP	
	*****	*			

Slika 40: Primerjava aminokislinske sekvene κ-kazeinov kravjega, kozjega in ovčjega mleka (UniProt)

**Legenda:** **P02668 / CASK\_BOVIN:** κ-kazein kravjega mleka; **P02670 / CASK\_CAPHI:** κ-kazein kozjega mleka; **P02669 / CASK\_SHEEP:** κ-kazein ovčjega mleka; \* : aminokslne so enake; . in : aminokislne so podobne; **presledek:** med aminokislinami je večja razlika; **modro obarvanje:** sprememba aminokislinskega ostanka; **modro obarvanje, povezano:** disulfidna vez; **rumeno obarvanje:** glikozilacija

Podobnost aminokislinskih zaporedij κ-kazeinov kravjega, kozjega in ovčjega mleka lahko razberemo s slike 40. V primeru, ko so aminokisline enake, je to v stolpcu označeno z zvezdico (\*). V primerih, da so bolj ali manj podobne, je to označeno s piko (.) ali dvopičjem (:). Relativna podobnost κ-kazeinov kravjega in kozjega mleka je 84,3 %, podobnost κ-kazeinov kravjega in ovčjega mleka pa je 84,4 %. Višja je podobnost κ-kazeinov kozjega in ovčjega mleka (95,8 %), razlika je le pri sedmih aminokislinah (UniProt, 2013).

Posttranslacijske spremembe κ-kazeina so obsežnejše pri κ-kazeinih kravjega mleka. V vseh treh primerih pride do enakih sprememb na aminokislinskih ostankih. V primeru kravjih κ-kazeinov pa se pojavijo tudi disulfidna vez in glikozilacije (UniProt, 2013).

Nekoliko različna aminokislinska sestava in obsežnejše posttranslacijske spremembe, ki se odvijajo pri proteinih kravjega mleka, so odgovorne za drugo pozicijo na gelu.

Teoretična izoelektrična točka κ-kazeinov kravjega mleka je pri pH 5,93, kozjega mleka 5,31 in ovčjega mleka 5,53. Vendar teoretična izoelektrična točka še ni direkten pokazatelj končne pozicije na gelu 2-D elektroforeze. Pomemben vpliv imajo tudi posttranslacijske

modifikacije, ki niso upoštevane v izračunu teoretične izoelektrične točke (Compute ... , 2013) in se v obsežnejšem merilu pojavijo pri kravjih  $\kappa$ -kazeinih (UniProt, 2013). 2-D elektroforezo proteinov kravjega, kozjega in ovčjega mleka smo pripravili tako, da smo jih najprej ločili po izoelektrični točki (horizontalno) in kasneje še po masi (vertikalno). SDS-PAGE elektroforeza nam je pokazala, da ločevanje po masi ni dovolj za določanje potvorb mleka (UniProt, 2013).

Ravno razlika v izoelektrični točki  $\kappa$ -kazeinov kravjega mleka in različne posttranslacijske spremembe so omogočile, da so se na sliki 2-D elektroforeze pojavili na drugem mestu, kot  $\kappa$ -kazeini kozjega in ovčjega mleka. Posledično smo jih določili kot specifične za kravje mleko.

## 5 SKLEPI

Namen magistrskega dela je bil določiti potvorbe kozjega in ovčjega mleka s kravjim mlekom. Potvorbe smo določali na nivoju DNA preko somatskih celic mleka in na nivoju proteinov.

Določanje potvorb na nivoju DNA:

- Izbrana metoda izolacije DNA je bil komercialni komplet NucleoSpin Food.
- Optimalne koncentracije reagentov za določanje kravjega mleka s PCR v realnem času so:
  - i. za začetne oligonukleotide, specifične za kravo 300 nM BOS-F in 900 nM BOS-R ,
  - ii. za začetne oligonukleotide, specifične za sesalce 600 nM MAN-F in 900 nM MAN-R,
  - iii. za sondno 50 nM BOS-P ali MAN-P.
- Specifičnost PCR v realnem času za določanje kravjega mleka v mešanicah kozjega ali ovčjega mleka s kravjim mlekom z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za kravo, z nespecifično metodo določanja pomnožkov je 87,5 %, s specifično metodo določanja pomnožkov pa 100 %.
- Teoretična občutljivost PCR v realnem času z nespecifično in specifično metodo določanja pomnožkov je bila za kravo in sesalce 0,605 pg/µL, praktična občutljivost pa 0,5 %.
- Kvantifikacija odstotka kravjega mleka v mešanicah kozjega ali ovčjega mleka s kravjim mlekom je težavna zaradi:
  - i. učinkovitosti izolacije DNA iz mleka,
  - ii. prisotnosti inhibitorjev v izolirani DNA,
  - iii. neoptimalnega dizajna začetnih oligonukleotidov BOS in MAN,
  - iv. slabe specifičnosti PCR;
  - v. variabilnega števila somatskih celic v mleku.
- PCR v realnem času s sistemoma BOS in MAN za določanje potvorb kozjega ali ovčjega mleka s kravjim se lahko uspešno uporabi kot kvalitativna metoda. Spodnja meja občutljivosti je 0,5 % kravjega mleka.

Določanje potvorb na nivoju proteinov:

- Potvorb kozjega in ovčjega mleka s kravjim mlekom ne moremo določiti s pomočjo SDS-PAGE elektroforeze, saj je ločevanje proteinov po masi premalo, da opazimo razlike.
- Z uvedbo dodatnega ločevanja po izoelektrični točki, lahko na slikah 2-D elektroforeze opazimo specifične proteine, ki se pojavitjo samo pri kravjem mleku.

- Pri mešanicah kozjega mleka z 10 % kravjega mleka in ovčjega mleka z 10 % kravjega mleka, lahko na sliki 2-D elektroforeze jasno vidimo proteine, ki se pojavijo samo pri kravjem mleku, preko njih določimo potvorbe kozjega in ovčjega mleka.
- Razlika v izoelektrični točki  $\kappa$ -kazeinov kravjega mleka in različne posttranslacijske spremembe so omogočile, da so se na sliki 2-D elektroforeze pojavili na drugem mestu, kot  $\kappa$ -kazeini kozjega in ovčjega mleka. Posledično smo jih določili kot specifične za kravje mleko.
- Z 2-D elektroforezo je možna kvalitativna detekcija kravjega mleka, kvantitativna detekcija ni mogoča.

## 6 POVZETEK

Namen magistrskega dela je bil določiti in poskusiti kvantificirati potvorbe kozjega in ovčjega mleka s kravjim mlekom. Izbrali smo dva pristopa, določanje potvorb na ravni DNA s PCR v realnem času in določanje potvorb na ravni proteinov z elektroforezo in analizo proteinskih slik.

Uredba sveta (ES) št. 1234/2007 z dne 22. oktobra 2007 o vzpostavitvi skupne ureditve kmetijskih trgov in o posebnih določbah za nekatere kmetijske proizvode („Uredba o enotni SUT“) četrtem odstavku dela II, priloge XII določa, da mora biti mleko, v kolikor ni kravje, označeno s pridevnikom, ki se nanaša na vrsto oz. izvor mleka.

Splošno razširjeno mnenje je, da lahko osebam z alergijo na kravje mleko kot alternativo ponudimo manj ali nealergeno kozje ali ovče mleko (Roncada in sod., 2002; Haenlein, 2004; Bidat, 2010; Ribeiro A. C. in Ribeiro S. D. A., 2010). Tej praksi nekatere študije nasprotujejo in izpostavljajo alergenost kozjega mleka (Bellioni-Businco in sod., 1999; Sicherer, 2001).

Določanje potvorb kozjega, ovčjega ali bivoličjega mleka in sirov s kravjim mlekom je urejeno na nivoju EU. Izoelektrično fokusiranje je referenčna metoda za odkrivanje kravjega mleka in kazeina v sirih iz ovčjega mleka, kozjega mleka, bivoličjega mleka ali v mešanicah ovčjega, kozjega in bivoličjega mleka (Commission ... 273/2008/EC). Metoda je zapletena in težavna za izvedbo. Regulativa dovoljuje uporabo drugih metod za detekcijo potvorb. V strokovnih objavah zasledimo vrsto pristopov. Izpostavljeni so najpogostejši in najzanimivejši:

- a. ločevanje proteinov z različnimi metodami (Mayer in sod., 1997; Czerwenka in sod., 2010; Pesic in sod, 2011; Mayer in sod, 2012),
- b. preko detekcije maščobnih kislin (Iverson in Sheppard, 1989),
- c. z encimsko imunskimi testi (Antalašić, 2006; Hurley in sod., 2006; López-Calleja in sod., 2007a),
- d. s PCR in PCR v realnem času (Plath in sod, 1997; Bania in sod., 2001; López-Calleja in sod., 2004; López-Calleja in sod., 2005; López-Calleja in sod., 2007a; López-Calleja in sod., 2007b; López-Calleja in sod., 2007c; Branciari in sod., 2000),
- e. z elektronskim jezikom (Dias in sod., 2009).

Določanje potvorb kozjega ali ovčjega mleka s kravjim mlekom s PCR in PCR v realnem času temelji na določanju DNA krave iz kravjih somatskih celicah, ki so prisotne v mešanici. Metoda, ki smo jo uporabili in razvijali v magistrskem delu, je temeljila na objavah López-Calleja in sodelavcev (2004, 2005, 2007a, 2007b). Uporabili smo začetne

oligonukleotide, specifične za kravo (BOS), in začetne oligonukleotide, specifične za sesalce (MAN) (López-Calleja in sod., 2007b). Pričakovali smo, da bomo s primerjavo vrednosti  $C_t$  lahko izračunali odstotek kravjega mleka v mešanici.

Preizkusili smo 12 metod izolacije DNA iz mleka in se na podlagi rezultatov o koncentraciji ter čistosti DNA, rezultatov PCR v realnem času, cenovne dostopnosti in časa ekstrakcije odločili za uporabo komercialnega kompleta NucleoSpin Food. Odločili smo se, da bomo preizkusili tako PCR v realnem času z nespecifično metodo detekcije pomnožkov, kot PCR v realnem času s specifično metodo detekcije pomnožkov. PCR smo izvajali v reakcijski mešanici volumna 25  $\mu\text{L}$ , ki je vključevala 2,5  $\mu\text{L}$  izolirane DNA. Optimizirali smo koncentracije začetnih oligonukleotidov, specifičnih za kravo (BOS-F = 300 nM, BOS-R = 900 nM), in za sesalce (MAN-F = 600 nM, MAN-R = 900 nM) ter koncentracijo sonde (BOS-P ali MAN-P = 50 nM).

Specifičnost PCR v realnem času za določanje kravjega mleka v mešanicah kozjega ali ovčjega mleka s kravjim mlekom, z začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za kravo, pri nespecifični metodi določanja pomnožkov, je 87,5 %, pri specifični metodi določanja pomnožkov pa 100 %. S pomočjo standardne DNA krave smo določili teoretično občutljivost PCR v realnem času, ki je znašala 0,000605 ng/ $\mu\text{L}$  kravje DNA ali 0,0015 ng kravje DNA v reakcijski mešanici. Praktično občutljivost PCR v realnem času smo določili tako, da smo pripravili mešanice kozjega in ovčjega mleka z znanimi odstotki kravjega mleka, izolirali skupno DNA in jo pomnožili s PCR v realnem času. Kravje mleko smo pravilno določili v vseh primerih, meja detekcije je bila 0,5 % kravjega mleka. Pričakujemo, da je realna meja lahko nižja, vendar pa pri tako nizkih odstotkih ne moramo več govoriti o namernih potvorbah temveč o kontaminaciji (Jürg in sod., 2013).

Potvorbe kozjega in ovčjega mleka s kravjim mlekom lahko s PCR v realnem času določamo kvalitativno, torej lahko potvorno potrdimo ali ovržemo. Pri kvantitativnem določanju potvorb pa naletimo na težave, ki jih povzročajo predvsem variabilno število somatskih celic, inhibitorji v izolirani DNA in neidealen dizajn začetnih oligonukleotidov. Različne metode kvantifikacije odstotka kravjega mleka preko vrednosti  $C_t$  dajo netočne rezultate. Predlagamo, da se PCR v realnem času za določanje potvorb kozjega ali ovčjega mleka s kravjem uporabi kot kvalitativna metoda. Z optimizacijo izolacije DNA in izbiro idealnejših začetnih oligonukleotidov bi lahko napako omilili in metodo uporabili kot (semi-)kvantitativno.

Potvorbe kozjega in ovčjega mleka s kravjim mlekom smo določali tudi s proteomskim pristopom. Iz čistega mleka in iz mešanic mleka smo s komercialnim kompletom 2-D clean up izolirali in očistili proteine. S tako pripravljenimi proteini smo izvedli elektroforezo. Najprej smo se odločili za izvedbo preprostejše SDS-PAGE elektroforeze. Vizualni ogled slike gela SDS-PAGE elektroforeze je pokazal, da ločevanje proteinov mleka po masi ne zadostuje za ugotavljanje potvorb kozjega in ovčjega mleka s kravjim mlekom.

Boljše ločevanje omogoča 2-D elektroforeza. Izvedli smo jo tako, da smo pred SDS-PAGE elektroforezo uvedli dodatno ločevanje, izoelektrično fokusiranje. S slik gelov 2-D elektroforeze smo določili mesto, kjer se pojavijo lise proteinov samo, ko je v vzorcu prisotno kravje mleko. Pri vzorcih čistega kozjega in ovčjega mleka na tem mestu ne določimo proteinov. Specifične kravje proteine smo iz gela izrezali in za nas so jih na Univerzi v Yorku identificirali z MALDI-MS/MS spektrometrijo. Gre za prekurzorje κ-kazeina, ki je prisoten tudi v mleku nekaterih drugih živali, tudi koz in ovc. Zaradi obsežnejših posttranslacijskih sprememb κ-kazeina kravjega mleka se na proteinski sliki 2-D elektroforeze pojavi na specifičnem mestu.

2-D elektroforeza omogoča kvalitativno določanje potvorb kozjega in ovčjega mleka s kravjim mlekom. Meja detekcije je bila 10 % kravjega mleka, nižjih vrednosti nismo določali.

## 7 VIRI

Applied Biosystems. 2012. Amplification efficiency of TaqMan® gene expression assays.

Foster City, Life Technologies Corporation: 6 str.

[http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_marketing/documents/generaldocuments/cms\\_040377.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_040377.pdf) (10. mar. 2013)

Applied Biosystems. 2005. Real-time PCR systems: Applied Biosystems 7900HT fast real-time PCR system and 7300/7500 real-time PCR systems: chemistry guide. Foster City, Applied Biosystems: 138 str.

Antalašić M. 2006. Učinkovitost uporabe hitre imunoencimske metode (E.L.I.S.A.) za odkrivanje potvorb ovčjega mleka s kravjim mlekom. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 46 str.

Babnik D., Jenko J., Prepar T., Verbič J., Ovsenek M. 2010. Dejavniki, ki vplivajo na zmrzliščno točko kravjega mleka. V: Zbornik predavanj. 19. Mednarodno znanstveno posvetovanje o prehrani domačih živali »Zadravčevi-Erjavčevi dnevi«, Radenci, 11-12 nov. 2010. Čeh T., Kapun S., Verbič J., Salobir J., Kramberger B., Steingass H., Steinwidder A., Špur M. (ur.). Murska Sobota, Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije, Kmetijsko gozdarski zavod: 237-249

Bania J., Ugorski M., Polanowski A., Adamczyk E. 2001. Application of polymerase chain reaction for detection of goats' milk adulteration by milk of cow. Journal of Dairy Research, 68: 333-336

Barle K., Jamnik P., Gruden K. 2008. Proučevanje interakcije rastlina-patogen-škodljivec z metodami proteomike. V: Proteomika. Posvetovanje pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost. Ljubljana 31. jan.-1. feb. 2008. Raspor P., Jamnik P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 53-59

Bartlett J. M. S, Stirling D. 2003. A short history of the polymerase chain reaction. V: PCR protocols. Bartlett J. M. S, Stirling D. (eds.). 2<sup>nd</sup> ed. Totowa, Humana Press: 1-4

Baza podatkov »drobnica«. 2013. Somatske celice pri drobnici, razpored po letih. Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: baza podatkov

- Bellioni-Businco B., Paganelli R., Lucenti P., Giampietro P. G., Perborn H., Businco L. 1999. Allergenicity of goat's milk in children with cow's milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103, 6: 1191-1194
- Bickley J., Short J. K., McDowell D. G., Parkes H. C. 1996. Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Letters in Applied Microbiology*, 22: 153-158
- Bidat E. 2010. L'allergie au lait de chèvre ou de brebis. *Revue Française d'Allergologie*, 50: 128–131
- Bonaiti C., Parayre S., Irlinger F. 2006. Novel extraction strategy of ribosomal RNA and genomic DNA from cheese for PCR-based investigations. *International Journal of Food Microbiology*, 107: 171-179
- Bramanti E., Sortino C., Onor M., Beni F., Raspi G. 2003. Separation and determination of denatured  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins by hydrophobic interaction chromatography in cows', ewes' and goats' milk, milk mixtures and cheeses. *Journal of Chromatography A*, 944: 59-74
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 1-2: 248-254
- Branciari R., Nijman I. J., Plas M. E., Di Antonio E., Lenstra J. A. 2000. Species origin of milk in Italian mozzarella and Greek feta cheese. *Journal of Food Protection*, 63, 3: 408-411
- Chianese L., Laezza P., Smaldone L. A., Stingo C., Del Giovine L., Addeo F. 1990. Evaluation of bovine milk in the buffalo mozzarella cheese by two-dimensional electrophoresis. *Scienze e Tecnica Lattiero-Casearia*, 41: 315-326
- Colak H., Aidin A., Nazli B., Ergun O. 2006. Detection of presence of cow's milk in sheep's cheeses by immunochromatography. *Food Control*, 17: 905–908
- Commission regulation (EC) No 273/2008 of the European Parliament and the Council of 5 March 2008 in laying down detailed rules for the application of Council Regulation (EC) No 1255/1999 as regards methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products. *Official Journal of European Union*, 51, L88: 115 str.

Compute pI / MW Tool. 2013. Lausanne, ExPASy, SIB Bioinformatics Resource Portal:  
3 str.

[http://web.expasy.org/compute\\_pi/pi\\_tool-doc.html](http://web.expasy.org/compute_pi/pi_tool-doc.html) (6. dec. 2013)

Czerwenka C., Müller L., Linder W. 2010. Detection of the adulteration of water buffalo milk and mozzarella with cow's milk by liquid chromatography-mass spectrometry analysis of  $\beta$ -lactoglobulin variants. Food Chemistry, 112: 901-908

d' Angelo F., Santillo A., Sevi A., Albenzio M. 2007. Technical note: A simple salting-out method for DNA extraction from milk somatic cells: investigation into the goat CSN1S1 gene. Journal of Dairy Science, 90: 3550-3552

Dąbrowska A., Wałecka E., Bania J., Źelzako M., Szołtysik M., Chrzanowska J. 2010. Quality of UHT goat's milk in Poland evaluated by real-time PCR. Small Ruminant Research, 94: 32-37

De Block J. 2013. Heath stability of caseins. Melle, ILVO.  
[jan.deblock@ilvo.vlaanderen.be](mailto:jan.deblock@ilvo.vlaanderen.be) (osebni vir, 16. apr. 2013)

De S., Brahma B., Polley S., Mukherjee A., Banerjee D., Gohaina M., Singh K. P., Singh R., Datta T.K., Goswami S.L. 2011. Simplex and duplex PCR assays for species specific identification of cattle and buffalo milk and cheese. Food Control, 22: 690-696

Demeke T., Jenkins G. R. 2010. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 396: 1977-1990

Dias L. A., Peres A. M., Veloso A. C. A., Reis F. S., Vilas-Boas M., Machado A. A. S. C. 2009. An electronic tongue taste evaluation: Identification of goat milk adulteration with bovine milk. Sensors and Actuators, B 136: 209-217

El-Agamy E. L. 2007. The challenge of cow milk protein allergy. Small Ruminant Research, 68: 64-72

Fairchild A., Margie D., Lee D. V. M., Maurer J. J. 2006. PCR basics. V: PCR methods in foods. Maurer J. (ed.). New York, Springer Science+Business Media: 1-24

Fonovič M. 2008. Proteomika – veda ali tehnologija. V: Proteomika. Posvetovanje pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost. Ljubljana 31. jan.-1. feb. 2008. Raspor P., Jamnik P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-9

Fox P. F., McSweeney P. L. H. 1998. Dairy chemistry and biochemistry. London, Blackie Academic & Professional: 478 str.

Gonçalves J., Pereira F., Amorim A., Van Asch B. 2012. New method for the simultaneous identification of cow, sheep, goat and water buffalo in dairy products by analysis of short species-specific mitochondrial DNA targets. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60: 10480-10485

Gorjanc G., Kompan D. 2007a. Pasme koz v Sloveniji. Nova Gorica, Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije-Kmetijsko gozdarski Zavod Nova Gorica: 1 str.  
[http://www.drobnica.si/index.php?option=com\\_content&view=article&id=175:pasme-koz-v-sloveniji&catid=37:cat\\_prispevki\\_prispevki&Itemid=169](http://www.drobnica.si/index.php?option=com_content&view=article&id=175:pasme-koz-v-sloveniji&catid=37:cat_prispevki_prispevki&Itemid=169) (15. mar. 2013)

Gorjanc G., Kompan D. 2007b. Pasme ovc v Sloveniji. Nova Gorica, Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije-Kmetijsko gozdarski Zavod Nova Gorica: 1 str.  
[http://www.drobnica.si/index.php?option=com\\_content&view=article&id=288:pasme-ovc-v-sloveniji&catid=37:cat\\_prispevki\\_prispevki&Itemid=187](http://www.drobnica.si/index.php?option=com_content&view=article&id=288:pasme-ovc-v-sloveniji&catid=37:cat_prispevki_prispevki&Itemid=187) (15. mar. 2013)

Gorjanc G., Kompan D. 2008a. Kozje mleko. Nova Gorica, Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije-Kmetijsko gozdarski Zavod Nova Gorica: 1 str.  
[http://www.drobnica.si/index.php?option=com\\_content&view=article&id=197&Itemid=166](http://www.drobnica.si/index.php?option=com_content&view=article&id=197&Itemid=166) (6. mar. 2013)

Gorjanc G., Kompan D. 2008b. Ovče mleko. Nova Gorica, Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije-Kmetijsko gozdarski Zavod Nova Gorica: 1 str.  
[http://www.drobnica.si/index.php?option=com\\_content&view=article&id=198&Itemid=167](http://www.drobnica.si/index.php?option=com_content&view=article&id=198&Itemid=167) (6. mar. 2013)

Görg A., Postel W., Baumer M., Weiss W. 1992. Two-dimensional poliacrylamide gel electrophoresis, with immobilized pH gradient in the first dimension, of barley seed proteins: Discrimination of cultivars with different malting grades. Electrophoresis, 13: 192-203

Groetch M. 2008. Diets and nutrition. V: Food allergy: Adverse reactions to foods and food additives. 4<sup>th</sup> ed. Metcalfe D. D., Sampson H. A., Simon R. A. (eds.). Malden, Blackwell Publishing: 482-497

Haenlein G. F. W. 2004. Goat milk in human nutrition. Small Ruminant Research, 51: 155-163

Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. 1993. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology, 11: 1026-1030

Hurley I. P., Coleman R. C., Elyse Ireland H., Williams J. H. H. 2006. Use of sandwich IgG ELISA for the detection and quantification of adulteration of milk and soft cheese. International Dairy Journal, 16: 805-812

Iverson J. L., Sheppard A. J. 1989. Detection of adulteration in cow, goat, and sheep cheeses utilizing gas-liquid chromatographic fatty acid data. Journal of Dairy Science, 72, 7: 1707-1712

Jamnik P. 2012. Umeritvena krivulja za določanje koncentracije proteinov po Bradfordu. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo. polona.jamnik@bf.uni-lj.si (osebni vir, 9. mar. 2012)

Jamnik P., Raspor P. 2008. Proteomika v prehrani. V: Proteomika. Posvetovanje pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost. Ljubljana 31. jan.-1. feb. 2008. Raspor P., Jamnik P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 45-51

Jandal J. M. 1996. Comparative aspects of goat and sheep milk. Small Ruminant Research, 22: 177-185

Jeretina J. 2011. Število somatskih celic v mleku kot pokazatelj zdravstvenega stanja mlečne žleze. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za živinorejo: 40 str.  
[http://www.govedo.si/files/cpzgss/knjiznica/seminarji/somatske\\_celice\\_2011.pdf](http://www.govedo.si/files/cpzgss/knjiznica/seminarji/somatske_celice_2011.pdf)  
(1. jun. 2013)

Jeretina J. 2012. Somatske celice v mleku kot pokazatelj zdravstvenega stanja molznic. Govedorejec, glasilo za razvoj govedoreje, 20: 7-9

Jeretina J. 2013. Somatske celice – govedo. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije  
janez.jeretina@kis.si (osebni vir, 31. maj 2013)

Jürg R., Weibel S., Jürg R., Eugster A., Beck K., Köppel R. 2013. Interlaboratory validation of two multiplex quantitative real-time PCR methods to determine species DNA of cow, sheep and goat as a measure of milk proportions in cheese. European Food Research and Technology, 236: 217–227

Kaj so potvorbe živil in vloga laboratoriјev pri ugotavljanju potvorb. 2010. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano: 2 str.  
[http://www.arhiv.mkgp.gov.si/fileadmin/mkgp.gov.si/pageuploads/Aktualno/Obvestila\\_potrosnikom/Splet\\_\\_potvorbe\\_in\\_vloga\\_laboratoriјev\\_.doc](http://www.arhiv.mkgp.gov.si/fileadmin/mkgp.gov.si/pageuploads/Aktualno/Obvestila_potrosnikom/Splet__potvorbe_in_vloga_laboratoriјev_.doc) (20. feb. 2013)

Kaltenboeck B., Wang C. 2005. Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics. Advances in Clinical Chemistry, 40: 219-259

Kim H.-H. Y., Jimenez-Flores R. 1994. Comparison of milk proteins using preparative isoelectric focusing followed by polyacrylamide gel electrophoresis. Journal of Dairy Science, 77, 8: 2177-2190

Klančnik A., Kovač M., Toplak N., Piskernik S., Jeršek B. 2012. PCR in food analysis. V: Polymerase chain reaction. Hernandez-Rodriguez P., Ramirez Gomez A. P. (eds.). Rijeka, InTech: 195-220

Komel R., Kastelic D., Rajčević U., Kočevar N. 2008. Proteomika v medicinskih raziskavah in diagnostiki. V: Proteomika. Posvetovanje pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost. Ljubljana 31. jan.-1. feb. 2008. Raspor P., Jamnik P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 33-44

Kompan D. 2013. Somatske celice – drobnica. Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko. [drago.kompan@bf.uni-lj.si](mailto:drago.kompan@bf.uni-lj.si) (osebni vir, 22. mar. 2013)

Križaj I. 2008. Metode za analizo proteoma. V: Proteomika. Posvetovanje pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost. Ljubljana 31. jan.-1. feb. 2008. Raspor P., Jamnik P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 19-31

Lászity R., Petró-Turza M., Földesi T. 2004. Food quality and standards: History of food quality standards. V: Encyclopedia of life support systems (EOLSS). Oxford, Eolss Publishers: 16 str.

[http://www.eolss.net/ebooklib/ViewEbookDetail\\_1.aspx?catid=10&fileid=E5-08](http://www.eolss.net/ebooklib/ViewEbookDetail_1.aspx?catid=10&fileid=E5-08)  
(marec 2013)

Lindmark-Måansson H., Timgren A., Aldén G., Paulsson M. 2005. Two-dimensional gel electrophoresis and peptides in bovine milk. International Dairy Journal, 15: 111-121

Livak K. J., Schmittgen T. J. 2001. eAnalysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{\Delta\Delta Ct}$  method. Methods, 25: 402-408

López-Calleja I., González I., Fajardo V., Rodríguez M. A., Hernández P. E., García T., Martín R. 2004. Rapid detection of cows' milk in sheep's and goats' milk by a species-specific polymerase chain reaction technique. Journal of Dairy Science, 87: 2839-2845

López-Calleja I., González I., Fajardo V., Martín I., Hernández P. E., García T., Martín R. 2005. Application of polymerase chain reaction to detect adulteration of sheep's milk with goats' milk. Journal of Dairy Science, 88: 3115-3120

López-Calleja I., González I., Fajardo V., Martín I., Hernández P. E., García T., Martín R. 2007a. Application of an indirect ELISA and PCR technique for detection of cows' milk in sheep's and goats' milk cheeses. International Dairy Journal, 17: 87-93

López-Calleja I., González I., Fajardo V., Martín I., Hernández P. E., García T., Martín R. 2007b. Real-time TaqMan PCR for quantitative detection of cows' milk in ewes' milk mixtures. International Dairy Journal, 17: 729-736

López-Calleja I., González I., Fajardo V., Martín I., Hernández P. E., García T., Martín R. 2007c. Quantitative detection of goats' milk in sheep's milk by real-time PCR. Food Control, 18: 1466-1473

Luebbehusen H. 2006. The significance of the 260/230 ratio in determining nucleic acid purity. Huston, Baylor College of Medicine: 2 str.  
<http://www.bcm.edu/mcfweb/?PMID=3100> (27 maj 2013)

Mafra I., Ferreira I. M. P. L. V. O., Faria M. A., Oliveira B. P. P. 2004. A novel approach to the quantification of bovine milk in ovine cheeses using a duplex polymerase chain reaction method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4943-4947

Mafra I., Roxo Á., Ferreira I. M. P. L. V. O., Oliveira M. B. P. P. 2007. A duplex polymerase chain reaction for the quantitative detection of cows' milk in goats' milk cheese. *International Dairy Journal*, 17: 1132-1138

Manso M. A., Léonil J., Jan G., Gagnaire V. 2005. Application of proteomics to the characterisation of mil kand dairy products. *International Dairy Journal*, 15: 845-855

Matijašec J., Podkrajšek S. 2013. Poročilo o preskusu. Domžale, Inštitut za mlekarstvo in probiotike: 1 str.

Maurer J. J. 2003. The mythology of PCR: A warning to the wise. V: PCR methods in foods. Maurer J. J. (eds.). New York, Springer Science+Business Media: 27-40

Mayer H. K., Heidler D., Rockenbauer C. 1997. Determination of the percentages of cows', ewes' and goats' milk in cheese by isoelectric focusing and cation-exchange HPLC of  $\gamma$ - and para- $\kappa$ -caseins. *International Dairy Journal*, 7: 619-628

Mayer H. K., Bürger J., Kaar N. 2012. Quantification of cow's milk percentage in dairy products – a myth? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403: 3031-3040

Mininni A. N., Pelizzari C., Cardazzo B., Carraro L., Balzan S., Novelli E. 2009. Evaluation of real-time PCR assays for detection and quantification of fraudulent addition of bovine milk to caprine and ovine milk for cheese manufacture. *International Dairy Journal*, 19: 617-623

Moneret-Vautrin D. A., Renaudin J. M., Sergeant P., Morisset M., Parisot L., Beaudouin E. 2012. La présence frauduleuse de lait de vache dans les fromages de chèvre et de brebis présente un risque pour les sujets allergiques au lait de vache. Évaluation préliminaire. *Revue Française d'Allergologie*, 52: 81-85

Murphy M. A., Shariflou M. R., Moran C. 2002. High quality genomic DNA extraction from large milk samples. *Journal of Dairy Research*, 69: 645-649

NCBI. 2013. Bos taurus partial 12s rRNA gene: GenBank: AJ849533.1. Bethesda, National Center for Biotechnology Information: 1 str.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AJ849533> (marec 2013)

O'Donnell R., Holland J. W., Deeth H. C., Alewood P. 2004. Milk proteomics. International Dairy Journal, 14: 1013-1023

O'Farrel P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. Journal of Biological Chemistry, 25, 250: 4007-4021

Park Y. W., Jin Y. K. 1998. Proteolytic patterns of Caciotta and Monterey Jack hard goat milk cheeses as evaluated by SDS-PAGE and densitometric analyses. Small Ruminant Research, 28: 263–272

Park Y. W., Haenlein G. F. W. 2006. Handbook of milk of non-bovine mammals. Iowa, Blackwell Publishing Ltd: 449 str.

Park Y. W., Júarez M., Ramons M., Haenlein G. F. W. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. Small Ruminant Research, 68: 88–113

Parkin T. B., Chester S. T., Robinson J. A. 1990. Calculating confidence intervals for the mean of a lognormally distributed variable. Soil Science Society of America Journal, 54: 321-326

Plath A., Krause I., Einspainer R. 1997. Species identification in dairy products by three different DNA-based techniques. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung, 205: 437-441

Pesic M., Barac M., Vrvic M., Ristic N., Macej O., Stanojevic S. 2011. Qualitative and quantitative analysis of bovine milk adulteration in caprine and ovine milks using native-PAGE. Food Chemistry, 125: 1443-1449

Poročilo o stanju kmetijstva, živilstva, gozdarstva in ribištva v letu 2011; Pregled po kmetijskih trgih. 2012. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo in okolje, Kmetijski inštitut Slovenije: 140 str.

[http://www.mko.gov.si/fileadmin/mko.gov.si/pageuploads/podrocja/ZP\\_2011\\_trgi\\_28.6.12.pdf](http://www.mko.gov.si/fileadmin/mko.gov.si/pageuploads/podrocja/ZP_2011_trgi_28.6.12.pdf) (12. mar. 2013)

Powell H. A., Gooding C. M., Garrett S. D., Lund B. M., McKee R. A. 1994. Proteinase inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction. Letters in Applied Microbiology, 18: 59-61

Pravilnik o kakovosti mleka, mlečnih izdelkov, siril in čistih cepiv. 1993. Uradni list Republike Slovenije, 3, 21: 1089-1085

Pravilnik o veterinarskih pogojih za proizvodnjo in dajanje na trg surovega mleka, toplotno obdelanega mleka in mlečnih izdelkov. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 28: 3183-3197

Psifidi A., Dovas C. I., Banos G. 2010. A comparison of six methods for genomic DNA extraction suitable for PCR-based genotyping applications using ovine milk samples. Molecular and Cellular Probes, 24: 93-98

RASFF. 2000a. Undeclared milk ingredient (cow milk casein) in goat milk powder. 2000.101. Brussels, Rapid Alert System for Food and Feed: 1 str.  
[https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/index.cfm?event=notificationDetail&NOTIF\\_REFERENCE=2000.101](https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/index.cfm?event=notificationDetail&NOTIF_REFERENCE=2000.101) (7. feb. 2013)

RASFF. 2000b. Undeclared milk ingredient (cow milk casein) in goat milk powder. 2000.128. Brussels, Rapid Alert System for Food and Feed: 1 str.  
[https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/index.cfm?event=notificationDetail&NOTIF\\_REFERENCE=2000.128](https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/index.cfm?event=notificationDetail&NOTIF_REFERENCE=2000.128) (7. feb. 2013)

RASFF. 2005. Allergic reaction caused by special milk for children allergic to cow's milk from Spain. 2005.ALB. Brussels, Rapid Alert System for Food and Feed: 1 str.  
[https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/index.cfm?event=notificationDetail&NOTIF\\_REFERENCE=2005.ALB](https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/index.cfm?event=notificationDetail&NOTIF_REFERENCE=2005.ALB) (7. feb. 2013)

RASFF. 2009. Presence of cow's milk (between 2 and 10 %) in sheep's cheese from France. 2009.0300. Brussels, Rapid Alert System for Food and Feed: 1 str.  
[https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/index.cfm?event=notificationDetail&NOTIF\\_REFERENCE=2009.0300](https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/index.cfm?event=notificationDetail&NOTIF_REFERENCE=2009.0300) (7. feb. 2013)

Ribeiro A. C., Ribeiro S. D. A. 2010. Specialty products made from goat milk. Small Ruminant Research, 89: 225-233

Rodrigues N. P. A., Givisiez P. E. N., Queroga R. C. E. E., Azevedo P. S., Gebreyes W. A., Oliviera C. J. B. 2012. Milk adulteration: Detection of bovine milk in bulk goat milk produced by smallholders in northeastern Brazil by a duplex PCR assay. *Journal of Dairy Science*, 95: 2749-2752

Rogelj I. 1996. Lastnosti kozjega in ovčjega mleka in njihov vpliv na predelavo. V: Možnost razvoja reje drobnice v Sloveniji: zbornik. Pogačnik M., Kompan D., Cvirm M. (ur.). Slovenj Gradec, Kmetijska založba: 145-150

Roncada P., Gaviraghi A., Liberatori S., Canas B., Bini L., Greppi G. F. 2002. Identification of caseins in goat milk. *Proteomics*, 2, 6: 723-726

Roncada P., Piras C., Soggiu A., Turk R., Urbani A., Bonizzi L. 2012. Farm animal milk proteomics. *Journal of Proteomics*, 75: 4259-4274

Shi Q., Jackowski G. 1998. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. V: Gel electrophoresis of proteins. A practical approach. Hames B. D. (ed.). Oxford, Oxford University Press: 1-52

Sicherer S. H. 2001. Clinical implications of cross-reactive food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108, 6: 881-890

Stănciu N., Râpeanu G. 2012. Identification of adulterated sheep and goat cheeses marketed in Romania by immunocromatographic assay. *Food and Agricultural Immunology*, 21, 2: 157-164

Stele A. 2013. »Podatki o tržnih cenah kozjega in ovčjega mleka.« Ljubljana, Statistični urad Republike Slovenije. ales.stele@gov.si (osebni vir, 12. mar. 2013)

Šalehar A., Čepon M., Kompan D., Holcman A., Habe F., Terčič D. 2003. Seznam in opis slovenskih lokalnih pasem (avtohtone, tradicionalne) domačih živali ter število plemenic: podatki za izvajanje ukrepa II/5 slovenskega kmetijskega okoljskega programa: II. dopolnjeno gradivo. Rodica, Biotehniška Fakulteta, Oddelek za zootehniko: 48 str.

<http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/Publikacije-zootehnika/LokalnePasme.pdf>  
(15. mar. 2013)

Špajzer Šraj P. 2013. »Podatki o tržnih cenah kozjega in ovčjega mleka.« Ljubljana, Statistični urad Republike Slovenije. polona.spajzer-sraj@gov.si (osebni vir, 13. mar. 2013)

Toplak N. 2013. »Določanje standardne temperature taljenja pomnožkov«. Ljubljana, Omega d.o.o. omega@omega.si (osebni vir, 15. feb. 2013)

Tuomi J. M., Voorbraak F., Jones D. L., Ruijter J. M. 2010. Bias in the  $C_q$  value observed with hydrolysis probe based quantitative PCR can be corrected with the estimated PCR efficiency value. Methods, 50: 313-322

Understanding and measuring variations in DNA sample quality. 2011. Oxford, Gene Technology (23. avg. 2011): 7 str.

[http://www.ogt.co.uk/resources/literature/483\\_understanding\\_and\\_measuring\\_variations\\_in\\_dna\\_sample\\_quality](http://www.ogt.co.uk/resources/literature/483_understanding_and_measuring_variations_in_dna_sample_quality) (31. avg. 2012)

UniProt. 2013. Sequence alignment (Kappa-casein: Bovine, Goat, Sheep). Hinxton, UniProt: database

<http://www.uniprot.org/align/2013073040RMGCE2NQ> (22. Jul. 2013)

Uredba sveta (ES) št. 1234/2007 z dne 22. oktobra 2007 o vzpostavitvi skupne ureditve kmetijskih trgov in o posebnih določbah za nekatere kmetijske proizvode („Uredba o enotni SUT“). 2007. Uradni list Evropske unije, 50, L299: 1-149

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, L31: 1-37

Van Hee A. 2013. Primer and probe design. Melle, ILVO. ann.vanhee@ilvo.vlaanderen.be (osebni vir: 08. 03. 2013)

Verdi R. J., Barbano D. M., Dellavalle M. E., Senyk G. F. 1987. Variability in true protein, casein, nonprotein nitrogen, and proteolysis in high and low somatic cell milks. Journal of Dairy Science, 70, 2: 230-242

Veselko Vinko T. 2012. Nova tehnologija odkrivanja bakterijskih povzročiteljev mastitisa. Govedorejec, glasilo za razvoj govedoreje, 20: 5-6

Zakon o kmetijstvu. 2008. Uradni list Republike Slovenije, 18, 45: 4965-4993

Wilson I. G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Applied and Environmental Microbiology, 63: 3741-3751

Wood R. A., Sicherer S. H., Vickery B. P., Jones S. M., Liu A. H., Fleischer D. M., Henning A. K., Mayer L., Burks A. W., Grishin A., Stablein D., Sampson H. A. 2012. The natural history of milk allergy in an observational cohort. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 131: 805-812

Yang J. 2012. Interpreting coefficients in regression with log-transformed variables. Ithaca, Cornell Statistical Consulting Unit: 4 str.

<http://www.cscu.cornell.edu/news/statnews/stnews83.pdf> (31. maj 2013)

## **ZAHVALA**

Iskrena hvala mentorici prof. dr. Barbari Jeršek. Tekom nastajanja te magistrske naloge vam je uspelo tudi name prenesti del vašega entuziazma do raziskovalnega dela. Hvala za »brce v rit« v trenutkih, ko mi je usihal in hvala, da ste verjeli vame in v moje ideje, ko ga ni primanjkovalo.

Prof. dr. Poloni Jamnik hvala za somentorstvo, vodenje v proteomskem laboratoriju, strokovno pomoč in spodbudne besede. Hvala tudi doc. dr. Andreji Čanžek Majhenič za hitro recenzijo naloge in Lini Burkan Makivić za hiter pregled.

Hvala sošolcem za lepih 6 let in zaposlenim na Katedri za Biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, da ste mi popestrili opravljanje raziskovalnega dela.

Velika zahvala gre mami in očetu, da sta mi s finančno in moralno podporo omogočila brezskrben študij. Oči, hvala, da si pokazal vejicam in pikam, kje jim je mesto!

Sebastian, hvala za vse »brainstorming« diskusije tekom študija in nastajanja te naloge, naj jih bo še mnogo. Hvala tudi noni, babici, dedku in našim za vso podporo ter Saši za začetno (s)po(d)budo. Hvala Martina in Maruša, ker obstajata in mi s svojim nasmehom polepšata vsak dan. Emil, hvala za vso twojo toplino.

Hvala Planini Mangart za vzorce kozjega in ovčje mleka – dokazano brez kravjega ...

## PRILOGE

Priloga A: Število somatskih celic (x1000) v kravjem mleku med leti 2001 in 2012 (Jeretina, 2013)

<b>leto</b>	<b>razred</b>	<b>&lt;100.000</b>	<b>100.001 - 200.000</b>	<b>200.001 - 400.000</b>	<b>&gt;400.000</b>	<b>skupaj</b>
<b>2001</b>	n	122876	61143	54448	139675	378142
	%	32	16	14	37	100
	povprečno ŠSC/mL	54	145	285	1238	430
	standardna deviacija	61	29	57	1013	482
	modus ŠSC/mL	27	105	208	411	411
<b>2002</b>	n	139675	68586	60762	82069	351092
	%	40	20	17	23	100
	povprečno ŠSC/mL	51	145	285	1253	410
	standardna deviacija	45	29	57	1046	555
	modus ŠSC/mL	30	105	208	403	30
<b>2003</b>	n	144926	72165	62705	86067	365863
	%	40	20	17	24	100
	povprečno ŠSC/mL	51	145	284	1270	438
	standardna deviacija	44	29	57	1067	563
	modus ŠSC/mL	21	103	203	404	21
<b>2004</b>	n	160740	79015	68168	91596	238779
	%	67	33	29	38	100
	povprečno ŠSC/mL	51	145	19	1242	439
	standardna deviacija	40	29	57	1024	588
	modus ŠSC/mL	27	103	207	410	27
<b>2005</b>	n	169793	81744	70139	97609	419285
	%	40	19	17	23	100
	povprečno ŠSC/mL	50	145	284	1267	436
	standardna deviacija	39	29	57	1057	562
	modus ŠSC/mL	21	108	201	409	21
<b>2006</b>	n	174062	82292	71315	99623	427292
	%	41	19	17	23	100
	povprečno ŠSC/mL	50	145	285	1276	439
	standardna deviacija	40	29	57	1065	566
	modus ŠSC/mL	21	103	204	410	21

Se nadaljuje ...

... nadaljevanje: Priloga A: Število somatskih celic (x1000) v kravjem mleku med leti 2001 in 2012 (Jeretina, 2013)

<b>leto</b>	<b>razred</b>	<b>&lt;100.000</b>	<b>100.001 - 200.000</b>	<b>200.001 - 400.000</b>	<b>&gt;400.000</b>	<b>skupaj</b>
<b>2007</b>	n	310650	141204	117022	156252	725128
	%	43	19	16	22	100
	povprečno ŠSC/mL	49	145	284	1262	435
	standardna deviacija	40	29	57	1056	560
	modus ŠSC/mL	21	104	201	402	21
<b>2008</b>	n	312106	145694	120957	162601	741358
	%	42	20	16	22	100
	povprečno ŠSC/mL	50	145	284	1286	441
	standardna deviacija	41	29	57	1095	571
	modus ŠSC/mL	21	103	201	404	21
<b>2009</b>	n	307035	145667	122759	168661	744122
	%	41	20	16	23	100
	povprečno ŠSC/mL	50	145	284	1331	452
	standardna deviacija	37	29	57	1168	593
	modus ŠSC/mL	21	103	201	407	21
<b>2010</b>	n	319250	144266	118963	160888	743367
	%	43	19	16	22	100
	povprečno ŠSC/mL	50	144	283	1307	446
	standardna deviacija	39	29	57	1128	582
	modus ŠSC/mL	21	103	201	404	21
<b>2011</b>	n	324583	141638	116074	157730	740025
	%	44	19	16	21	100
	povprečno ŠSC/mL	49	144	284	1324	450
	standardna deviacija	40	29	57	1161	590
	modus ŠSC/mL	21	29	57	1161	21
<b>2012</b>	n	332069	139597	113082	151814	736562
	%	45	19	15	21	100
	povprečno ŠSC/mL	49	144	283	1314	448
	standardna deviacija	39	29	57	1136	586
	modus ŠSC/mL	21	103	201	404	21
<b>skupaj</b>	n	2817765	1303011	1096394	1488138	<b>6705308</b>
	%	42	19	16	22	<b>100</b>
	povprečno ŠSC/mL	50	145	284	1281	<b>440</b>
	standardna deviacija	1	0	1	32	<b>498</b>
	modus ŠSC/mL	21	103	201	404	<b>21</b>

Priloga B: Število somatskih celic (x1000) v kozjem mleku med leti 2001 in 2012 (Baza podatkov »drobnica«, 2013)

<b>leto</b>	<b>razred</b>	<b>&lt;100.000</b>	<b>100.001 - 200.000</b>	<b>200.001 - 400.000</b>	<b>&gt;400.000</b>	<b>skupaj</b>
<b>2001</b>	n	199	276	467	1867	2809
	%	0,071	0,098	0,166	0,665	1
	povprečno ŠSC/mL	69	148	297	1905	1444
	standardna deviacija	35	30	57	1904	2821
	modus ŠSC/mL	49	140	281	674	137
<b>2002</b>	n	98	207	351	1564	2220
	%	0,044	0,093	0,158	0,705	1
	povprečno ŠSC/mL	70	145	293	2058	1688
	standardna deviacija	72	29	57	2078	3327
	modus ŠSC/mL	24	137	277	717	156
<b>2003</b>	n	141	130	154	492	917
	%	0,154	0,142	0,168	0,537	1
	povprečno ŠSC/mL	60	145	292	1732	1063
	standardna deviacija	25	32	62	1784	2463
	modus ŠSC/mL	47	135	273	586	66
<b>2004</b>	n	94	119	149	550	912
	%	0,103	0,13	0,163	0,603	1
	povprečno ŠSC/mL	67	144	285	1938	1312
	standardna deviacija	29	29	54	2055	2896
	modus ŠSC/mL	52	135	270	626	92
<b>2005</b>	n	123	143	203	719	1188
	%	0,104	0,12	0,171	0,605	1
	povprečno ŠSC/mL	68	146	291	1806	1253
	standardna deviacija	26	30	59	1735	2574
	modus ŠSC/mL	56	137	273	677	105
<b>2006</b>	n	120	191	313	1016	1640
	%	0,073	0,116	0,191	0,62	1
	povprečno ŠSC/mL	70	147	299	1877	1329
	standardna deviacija	35	29	61	1905	2573
	modus ŠSC/mL	50	139	282	649	129

Se nadaljuje ...

... nadaljevanje: Priloga B: Število somatskih celic (x1000) v kozjem mleku med leti 2001 in 2012 (Baza podatkov »drobnica«, 2013)

<b>leto</b>	<b>razred</b>	<b>&lt;100.000</b>	<b>100.001 - 200.000</b>	<b>200.001 - 400.000</b>	<b>&gt;400.000</b>	<b>skupaj</b>
<b>2007</b>	n	52	84	162	697	995
	%	0,052	0,084	0,163	0,701	1
	povprečno ŠSC/mL	67	148	291	2215	1738
	standardna deviacija	35	30	59	2382	3550
	modus ŠSC/mL	46	139	274	699	148
<b>2008</b>	n	101	137	239	1046	1523
	%	0,066	0,09	0,157	0,687	1
	povprečno ŠSC/mL	58	147	299	1923	1541
	standardna deviacija	38	29	60	1888	3170
	modus ŠSC/mL	34	139	282	698	129
<b>2009</b>	n	98	161	252	963	1474
	%	0,066	0,109	0,171	0,653	1
	povprečno ŠSC/mL	72	153	294	1898	1342
	standardna deviacija	60	30	59	2026	2742
	modus ŠSC/mL	32	144	277	607	114
<b>2010</b>	n	63	86	118	292	559
	%	0,113	0,154	0,211	0,522	1
	povprečno ŠSC/mL	70	145	291	1722	916
	standardna deviacija	32	28	60	1703	1802
	modus ŠSC/mL	52	137	274	619	85
<b>2011</b>	n	58	78	89	221	446
	%	0,13	0,175	0,2	0,496	1
	povprečno ŠSC/mL	68	148	284	1354	762
	standardna deviacija	26	32	58	1186	1322
	modus ŠSC/mL	56	138	268	577	95
<b>2012</b>	n	20	54	88	252	414
	%	0,048	0,13	0,213	0,609	1
	povprečno ŠSC/mL	76	148	296	1760	1153
	standardna deviacija	20	30	60	1694	1949
	modus ŠSC/mL	69	140	279	659	152
<b>skupaj</b>	n	1167	1666	2585	9679	15097
	%	0,077	0,11	0,171	0,641	1
	povprečno ŠSC/mL	67	147	294	1913	1396
	standardna deviacija	39	30	59	1943	2865
	modus ŠSC/mL	44	139	277	661	117

Priloga C: Število somatskih celic (x1000) v ovčjem mleku med leti 2001 in 2012 (Baza podatkov »drobnica«, 2013)

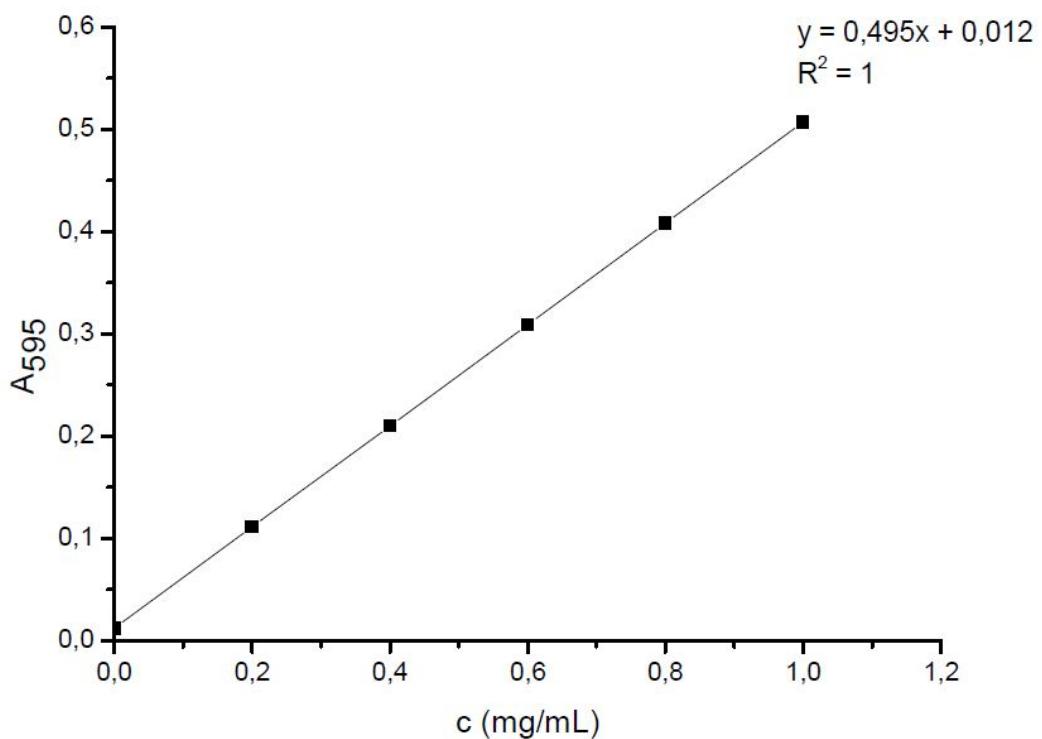
<b>leto</b>	<b>razred</b>	<b>&lt;100.000</b>	<b>100.001 - 200.000</b>	<b>200.001 - 400.000</b>	<b>&gt;400.000</b>	<b>skupaj</b>
<b>2001</b>	n	1880	901	659	2219	5659
	%	33,2	15,9	11,6	39,2	100,0
	povprečno ŠSC/mL	56	139	286	2540	1070
	standardna deviacija	23	28	56	2752	2090
	modus ŠSC/mL	42	110	242	406	42
<b>2002</b>	n	2218	1079	854	2381	6532
	%	34	17	13	37	100
	povprečno ŠSC/mL	59	141	289	2482	986
	standardna deviacija	22	28	58	2642	1958
	modus ŠSC/mL	50	102	241	461	50
<b>2003</b>	n	1714	779	599	1608	4700
	%	37	17	13	34	100
	povprečno ŠSC/mL	56	140	281	2731	1014
	standardna deviacija	21	29	56	2979	2139
	modus ŠSC/mL	38	104	268	447	38
<b>2004</b>	n	1567	624	498	1427	4116
	%	38	15	12	35	100
	povprečno ŠSC/mL	55	140	284	2934	1094
	standardna deviacija	22	28	56	3132	2281
	modus ŠSC/mL	42	101	204	500	42
<b>2005</b>	n	1566	586	486	1466	4104
	%	38	14	12	36	100
	povprečno ŠSC/mL	55	139	283	3349	1271
	standardna deviacija	22	28	58	3367	2541
	modus ŠSC/mL	37	109	202	434	37
<b>2006</b>	n	2080	697	532	1755	5064
	%	41	14	11	35	100
	povprečno ŠSC/mL	51	140	285	2440	916
	standardna deviacija	24	28	58	2422	1809
	modus ŠSC/mL	41	110	206	403	41

Se nadaljuje ...

... nadaljevanje: Priloga C: Število somatskih celic (x1000) v ovčjem mleku med leti 2001 in 2012 (Baza podatkov »drobnica«, 2013)

<b>leto</b>	<b>razred</b>	<b>&lt;100.000</b>	<b>100.001 - 200.000</b>	<b>200.001 - 400.000</b>	<b>&gt;400.000</b>	<b>skupaj</b>
<b>2007</b>	n	1885	812	541	1770	5008
	%	38%	16%	11%	35%	100%
	povprečno ŠSC/mL	55	142	286	2965	1122
	standardna deviacija	22	28	57	3032	2261
	modus ŠSC/mL	46	103	225	408	46
<b>2008</b>	n	2129	862	607	1684	5282
	%	40	16	12	32	100
	povprečno ŠSC/mL	55	141	284	2974	1026
	standardna deviacija	23	28	57	3235	2263
	modus ŠSC/mL	34	109	246	415	34
<b>2009</b>	n	2129	778	531	1411	4849
	%	44	16	11	29	100
	povprečno ŠSC/mL	56	138	285	2930	931
	standardna deviacija	21	28	59	3137	2124
	modus ŠSC/mL	46	103	286	400	46
<b>2010</b>	n	2073	708	499	1244	4524
	%	46	16	11	28	100
	povprečno ŠSC/mL	51	140	284	2449	750
	standardna deviacija	24	28	59	2543	1697
	modus ŠSC/mL	49	106	205	465	49
<b>2011</b>	n	1798	669	412	1179	4058
	%	44	17	10	29	100
	povprečno ŠSC/mL	55	141	282	2829	898
	standardna deviacija	23	29	56	3106	2082
	modus ŠSC/mL	51	119	250	593	51
<b>2012</b>	n	1580	1449	823	1755	5607
	%	28	26	15	31	100
	povprečno ŠSC/mL	67	140	285	2932	1015
	standardna deviacija	21	27	57	3159	2192
	modus ŠSC/mL	78	101	293	413	78
<b>skupaj</b>	n	22619	9944	7041	19899	<b>59503</b>
	%	38	17	12	33	100
	povprečno ŠSC/mL	56	140	285	2776	<b>1007</b>
	standardna deviacija	23	28	57	2963	<b>2125</b>
	modus ŠSC/mL	46	101	241	406	<b>46</b>

Priloga D: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije proteinov po Bradfordu (Jamnik, 2012)



Priloga E: Izvid določanja somatskih celic v vzorcih mleka (Matijašec in Podkrajšek, 2013).

UNIVERZA V LJUBLJANI  
UNIVERSITY OF LJUBLJANA

Biotehniška fakulteta  
Biotechnical Faculty

ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO  
ZOOTECHNICAL DEPARTMENT

Institut za mlekarstvo in probiotike  
Groblje 3, SI-1230 Domžale,  
tel.: + 386 1 320 39 11, fax: + 386 1 721 40 74



Biotehniška fakulteta  
Katedra za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost  
živil  
Doc. dr. Barbara Jeršek

Št.: Z-00393/13 - 12-JM  
Datum: 4.3.2013

Jamnikarjeva 101  
1000 Ljubljana

#### POROČILO O PRESKUSU

Vzorec:	Surovo mleko		
Laboratorijska oznaka:	2441/6		
Naročnik:	Doc. dr. Barbara Jeršek, BF, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana		
Vzorec odvzel:	Naročnik		
Vrsta določitve (metoda):	Število somatskih celic (ISO 13366-2/IDF 148-2:2006)		
Datum odvzema:	/	Datum sprejema:	1.3.2013
			Analizirano do: 1.3.2013

Rezultat se nanaša izključno na prinešeni vzorec!  
Poročilo se ne sme reproducirati, razen v celoti!

Oznaka vzorca	Število somatskih celic/ml
2441/6-1	2 772 000
2441/6-2	923 000
2441/6-3	NP
2441/6-4	NP
2441/6-5	NP
2441/6-6	2 236 000

Opomba: NP – vzorci niso bili analizirani zaradi pojava kosmičenja mleka.

Poročilo pripravila:  
Jadranka Matijašec



Vodja laboratorija:  
Stanka Podkrajšek, univ.dipl.inž.

Priloga F: Rezultati MALDI-TOF-TOF sprekrometrije lis 2-D elektroforeze

## MASCOT SEARCH RESULTS

User : tf2012  
Email :  
Search title : Ultraflex\_ProteinID  
MS data file : 13229323905421442.mgf  
Database residues) : NCBIInr 20101130 (12348165 sequences; 4221604734  
Taxonomy : Mammalia (mammals) (1314044 sequences)  
Timestamp : 8 Nov 2012 at 11:06:41 GMT  
Enzyme : Trypsin  
Fixed modifications : Carbamidomethyl (C)  
Variable modifications : Oxidation (M)  
Mass values : Monoisotopic  
Protein Mass : Unrestricted  
Peptide Mass Tolerance : ± 100 ppm  
Fragment Mass Tolerance: ± 0.5 Da  
Max Missed Cleavages : 1  
Instrument type : MALDI-TOF-TOF  
Number of queries : 10  
Protein hits : [gi|162811](#) kappa-casein precursor [Bos taurus]

### Select Summary Report

<input type="button" value="Submit"/>	<input type="button" value="Select Summary (protein hits)"/>	<input type="button" value="Help"/>
	Significance threshold p< <input type="text" value="0.05"/>	Max. number of hits <input type="text" value="AUTC"/>
Standard scoring <input checked="" type="radio"/> MudPIT	Ions score or expect cut-off <input type="text" value="0.05"/>	Show subsets <input type="checkbox" value="0"/>
Show pop-ups <input checked="" type="radio"/> Suppress pop-ups <input type="radio"/>		Require bold red <input checked="" type="checkbox"/>

   All queries    Unassigned    Below homology  
threshold    Below identity threshold

1. [gi|162811](#)   Mass: 21326   Score: 270   Matches: 3(3)   Sequences:  
3(3)  
kappa-casein precursor [Bos taurus]

Quer	Observe	Mr(expt	Mr(calc	ppm	Misscor	Expec	Ran	Uniq	Peptide
y	d	)	)	s	e	t	k	ue	
1	1251.74	1250.74	1250.70	32.1	0	55	0.004	1	U K.YIPIQYVLSR.Y
	98	25	23			2			
7	1624.87	1623.86	1623.83	19.5	0	77	2.9e-	1	U R.HPHPHLSFMAIPPP
	33	60	44			05			
9	1980.09	1979.08	1979.08	-	0.350	138	1.7e-	1	U R.SPAQILQWQVLSN
	06	33	40			11			

**Proteins matching the same set of peptides:**

<a href="#">gi 226020</a>	<b>Mass:</b> 21254	<b>Score:</b> 270	<b>Matches:</b> 3(3)	<b>Sequences:</b> 3(3)
kappa casein				
<a href="#">gi 4887004</a>	<b>Mass:</b> 17963	<b>Score:</b> 270	<b>Matches:</b> 3(3)	<b>Sequences:</b> 3(3)
kappa-casein precursor [Bos taurus]				
<a href="#">gi 7528205</a>	<b>Mass:</b> 18013	<b>Score:</b> 270	<b>Matches:</b> 3(3)	<b>Sequences:</b> 3(3)
kappa-casein [Bos grunniens]				
<a href="#">gi 8099320</a>	<b>Mass:</b> 17982	<b>Score:</b> 270	<b>Matches:</b> 3(3)	<b>Sequences:</b> 3(3)
kappa-casein [Bos indicus x Bos taurus]				
<a href="#">gi 8099322</a>	<b>Mass:</b> 17994	<b>Score:</b> 270	<b>Matches:</b> 3(3)	<b>Sequences:</b> 3(3)
kappa-casein precursor [Bos taurus]				
<a href="#">gi 22552661</a>	<b>Mass:</b> 18322	<b>Score:</b> 270	<b>Matches:</b> 3(3)	<b>Sequences:</b> 3(3)
kappa-casein long form [Bos grunniens]				
<a href="#">gi 22552663</a>	<b>Mass:</b> 17938	<b>Score:</b> 270	<b>Matches:</b> 3(3)	<b>Sequences:</b> 3(3)
kappa-casein short form [Bos grunniens]				
<a href="#">gi 27881412</a>	<b>Mass:</b> 21370	<b>Score:</b> 270	<b>Matches:</b> 3(3)	<b>Sequences:</b> 3(3)
kappa-casein precursor [Bos taurus]				
<a href="#">gi 36988716</a>	<b>Mass:</b> 21338	<b>Score:</b> 270	<b>Matches:</b> 3(3)	<b>Sequences:</b> 3(3)
kappa casein [Bos taurus]				
<a href="#">gi 125489161</a>	<b>Mass:</b> 17950	<b>Score:</b> 270	<b>Matches:</b> 3(3)	<b>Sequences:</b> 3(3)
kappa casein [Bos taurus]				
<a href="#">gi 156144998</a>	<b>Mass:</b> 17954	<b>Score:</b> 270	<b>Matches:</b> 3(3)	<b>Sequences:</b> 3(3)
kappa-casein [Bos grunniens]				
<a href="#">gi 166078544</a>	<b>Mass:</b> 19676	<b>Score:</b> 270	<b>Matches:</b> 3(3)	<b>Sequences:</b> 3(3)
kappa-casein [Bos indicus]				
<a href="#">gi 166078546</a>	<b>Mass:</b> 19619	<b>Score:</b> 270	<b>Matches:</b> 3(3)	<b>Sequences:</b> 3(3)
kappa-casein [Bos indicus]				
<a href="#">gi 193089919</a>	<b>Mass:</b> 17994	<b>Score:</b> 270	<b>Matches:</b> 3(3)	<b>Sequences:</b> 3(3)
kappa casein [Bos indicus]				
<a href="#">gi 296486476</a>	<b>Mass:</b> 18246	<b>Score:</b> 270	<b>Matches:</b> 3(3)	<b>Sequences:</b> 3(3)
casein kappa precursor [Bos taurus]				