

# Využití metod molekulární biologie při zkoumání kvality potravin

Michaela Hlobilová

---

Bakalářská práce  
2007



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav potravinářského inženýrství

akademický rok 2006/2007

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	Michaela HLOBELOVÁ
Studijní program:	B 2901 Chemie a technologie potravin
Studijní obor:	Chemie a technologie potravin
Téma práce:	Využití metod molekulární biologie při sledování kvality potravin

### Zásady pro vypracování:

Bakalářskou práci zpracováte formou literárního referátu. Zaměřte se na následující problémy:

- Popište principy vybraných metod využívaných v molekulární biologii.
- Charakterizujte laboratorní postupy pro sledování kvality a jakosti potravin.
- Navrhnete metodu sledování kvality vybraných potravin a využijte metod molekulární biologie.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

**dle doporučení vedoucího bakalářské práce**

Vedoucí bakalářské práce:

**Mgr. Leona Čechová, Ph.D.**

Ústav potravinářského inženýrství a chemie

Datum zadání bakalářské práce:

**8. ledna 2007**

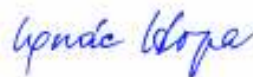
Termín odevzdání bakalářské práce:

**4. června 2007**

Ve Zlině dne 2. května 2007



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.  
*děkan*



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.  
*ředitel ústavu*

## **ABSTRAKT**

Tato bakalářská práce, zpracována rešeršní formou, poskytuje přehled o metodách molekulární biologie při zkoumání kvality potravin.

Hlavní část práce dokumentuje metodu PCR, další metody pro zkoumání kvality potravin a analýzu proteinů.

Další část je zaměřena na falzifikaci potravin. Jsou zde popsány nejčastěji falzifikované potraviny.

Poslední část se zabývá detekcí reziduí ve zpracovaných potravinách, kde se charakterizuje pojem alergen. Dále se zabývá potravinami, v nichž se detekují významné alergeny (arašídy, kravské mléko, mléčné výrobky, vejce) a metodami detekce těchto alergenů.

Klíčová slova: kvalita potravin, metody molekulární biologie, falzifikace, alergen, rezidua

## **ABSTRACT**

Abstrakt ve světovém jazyce

The bachelor thesis, elaborated as a review, provides an overview of the molecular-biology methods researching food quality.

The main part of this work documents the PCR methods and other methods researching food quality and an analysis of proteins.

Next part is concentrated on the falsification of foods. The most frequently falsificated foods are described there.

Last part of the work discusses common issues on detection of the allergenic residues on equipment and in processed foods. This part describes the foods where are major allergens (for example peanuts, cow's milk, milk products and eggs) detected. Several methods used to detect residues in foods are discussed, too.

Keywords: quality of foods, molecular-biology methods, falsification, alergen, residues

Úvodem této bakalářské práce bych ráda poděkovala všem, kteří mi poskytli potřebné informace k dané problematice, zejména své vedoucí bakalářské práce Mgr. Leoně Čechové, Ph.D., za cenné rady, připomínky a náměty, čímž mi pomohla při zpracování zadaného tématu.

Souhlasím s tím, že s výsledky mé práce může být naloženo podle uvážení vedoucího bakalářské práce a ředitele ústavu. V případě publikace budu uveden jako spoluautor.

Prohlašuji, že jsem na celé bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala.

Ve Zlíně, 15.5.2007

.....

podpis

# OBSAH

<b>ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>1 POJETÍ KVALITY.....</b>	<b>9</b>
1.1 Zajištění kvality.....	9
1.2 Kontrola kvality potravin .....	10
1.3 Hlediska kvality potravin .....	11
1.4 Symboly pro identifikaci kvality potravin.....	11
1.5 Kvalita potravin a EU.....	11
<b>2 MOLEKULÁRNÍ METODY.....</b>	<b>14</b>
2.1 Symboly pro identifikaci kvality potravin.....	14
<b>3 METODA PCR.....</b>	<b>15</b>
3.1 Historie PCR .....	15
3.2 Molekulárně-biologické pojetí PCR .....	16
3.2.1 DNA struktura.....	16
3.2.2 Replikace DNA .....	19
3.3 Princip PCR – amplifikace DNA .....	20
3.4 Modifikace PCR.....	23
3.4.1 RT PCR.....	23
3.4.2 REAL TIME RT-PCR.....	23
3.4.3 Long PCR.....	23
3.4.4 RACE PCR .....	24
3.4.5 Asymetrická PCR.....	24
3.4.6 Nested PCR .....	24
3.4.7 Multiplexová PCR.....	25
3.4.8 PSM.....	25
3.4.9 In situ-PCR.....	26
3.4.10 AS-PCR.....	26
3.5 Nevýhody PCR.....	27
3.5.1 Nejčastější zdroje kontaminací .....	27
3.5.2 Enzymatická pre-PCR - sterilizace .....	28
3.5.3 Fotometrická post-PCR - sterilizace .....	28

<b>4 DALŠÍ MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÉ METODY.....</b>	<b>29</b>
4.1 Metoda RFLP .....	29
4.2 Metoda FISH.....	29
4.3 Metoda NIR.....	30
4.4 Imunochemické metody .....	30
<b>5 ANALÝZA PROTEINŮ .....</b>	<b>33</b>
5.1 Metoda SDS-PAGE .....	34
5.2 Dvojměrná elektroforesa proteinů.....	35
5.3 Gelová permeační chromatografie .....	35
5.4 Hmotnostní spektrometrie.....	36
5.5 Kapalinová chromatografie - HPLC.....	36
<b>6 FALŠOVÁNÍ POTRAVIN.....</b>	<b>37</b>
6.1 Přibarvování potravin .....	37
6.2 Mléko .....	38
6.3 Mléčné výrobky.....	38
6.4 Ovocné nápoje, džusy .....	39
6.5 Olivový olej.....	39
<b>7 DETEKCE REZIDUÍ ALERGENŮ V POTRAVINÁCH .....</b>	<b>40</b>
7.1 Alergenicitá a potravinové alergy.....	40
7.2 Změna alergenicity při zpracování potravin.....	41
7.2.1 Arašidy .....	41
7.2.1.1 Metody detekce alergenů v arašidech.....	42
7.2.2 Kravské mléko, mléčné výrobky, vejce .....	43
7.2.2.1 Metody detekce alergenů v kravském mléce, mléčných výrobcích, vejci.....	44
7.2.3 Další významné potravinové alergy .....	46
7.3 Problematika alergenů v České republice .....	46
<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>47</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>48</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>52</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>53</b>
<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>54</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH .....</b>	<b>55</b>

## ÚVOD

Metody molekulární biologie umožňují analýzu biologicky významných molekul, zejména těch, které nesou a následně uskutečňují genetickou informaci – nukleových kyselin a bílkovin. Rozvoj těchto metod v posledních dvaceti letech umožnil detailní analýzu genetické informace a od ní odvozených vlastností u původců nemocí - patogenů i u jejich hostitelů – pacientů. Poznání molekulární podstaty vlastností patogenů a obranných nebo jiných reakcí lidského organismu umožnila následné praktické využití v klinické (například hematologické, onkologické nebo mikrobiologické) diagnostice, ale také v nových přístupech k léčbě a také při určování kvality potravin. Dnes nejužívanější metody v diagnostice a mikrobiologii jsou založeny na polymerázové řetězové reakci (PCR). Výhody metod založených na PCR spočívají především ve vysoké specifičnosti, citlivosti, možnosti standardizovaného přístrojového provedení s minimálním množstvím biologického materiálu potřebného k vyšetření. Ve svých důsledcích se tyto výhody projeví včasnými a přesnými výsledky [1].

V současné společnosti jsou potraviny většinou produkty zemědělské výroby, které jsou buď přímo konzumovatelné, nebo zpracované různými procesy (standardizace, konzervace, opracování apod.) do podoby jedlých produktů určených k výživě.

Rychlý ekonomický rozvoj, kterého bylo dosaženo ve 20. století v rozvinutých zemích, se odrazil ve zvýšeném životním standardu obyvatel. Tento standard se projevil zejména ve 2. polovině 20. století ve zvýšených požadavcích na kvalitu a nezávadnost potravin. Z toho důvodu byly empirické kontroly a metody “pokus – omyl” postupně nahrazovány systematickou kontrolou uplatňovanou ve všech stádiích výroby potravin. Následkem toho jsou vědci přizváni k účasti na produkci kvalitních a nezávadných potravin, protože pracují s potravinami k přímému použití nebo surovinami pro následnou výrobu potravin [2].



# 1 POJETÍ KVALITY

Pojem kvalita je relativní, liší se z pohledu každého člověka a závisí přímo nebo nepřímo na různých hodnotách, je interpretován různými způsoby v závislosti na úhlu pohledu. Proto byla různými výzkumníky definována různými způsoby.

Deming, zakladatel teorie Úplného řízení kvality (1986), definuje kvalitu jako “předvídatelný stupeň důvěryhodnosti produktu (služby), shodující se s jednotlivými specifikacemi a je přizpůsoben požadavkům trhu, s nejnižšími možnými výrobními náklady” [2].

Dalším výzkumníkem, který se zabýval kvalitou potravin byl Gardin. Hlavní výklady termínu kvalita podle Garvina jsou:

*A)* Pojetí kvality založené na produktu. Podle specifického přístupu je kvalita přesná a měřitelná. Zjistitelné rozdíly v kvalitě odpovídají rozdílům představovaným některými složkami (např. konzistence) nebo znaky (např. vhodnost pro průmyslové zpracování). Např. změna váhy zrna ovlivňuje možnost průmyslového zpracování, nebo obsah cukru v hroznech následně ovlivňuje kvalitu vyrobeného vína.

*B)* Pojetí kvality založené na kupujícím. V tomto pojetí je kvalita relativní a subjektivní. Je závislá na potřebách a preferencích zákazníka, např. vejce a drůbeží maso z organických farem nebo z klecových chovů.

*C)* Pojetí kvality založené na výrobě. V tomto případě splňuje kvalitní produkt dané ukazatele, např. minimální obsah tuku v mléce, minimální obsah cukru v cukrové řepě.

*D)* Pojetí kvality založené na nabídnuté hodnotě. Je vyjádřena kombinací spokojenosti kupujícího a ceny nabízené prodávajícím podle strategického plánování, např. rozdílnost ceny cukrové řepy podle obsahu cukru.

Mezinárodní organizace pro standardizaci (ISO 8402, 1986) uvádí, že: “Kvalita je souhrn vlastností výrobku nebo služby, který je schopen pokrýt jasně vyjádřené potřeby”.

Dnes je nejdůležitějším kritériem kvality výrobku plné uspokojení zákazníka. Jinými slovy, co plně uspokojuje zákazníka v rámci určitých limitů výrobních nákladů, je považováno za kvalitní. Správná kvalita uspokojuje předurčené požadavky. Tedy vynikající kvalita je “správná kvalita” s minimálními náklady pro kupujícího a pro výrobce [2].

## 1.1 Zajištění kvality

Zajištění kvality potravin je založeno na kontrolních systémech. Jako “Systém zajišťující kvalitu” je popsána organizační struktura a souhrn procedur, funkcí, pravidel, procesů

a prostředků požadovaných pro uspokojující řízení kvality (ISO 9000). Komplexně jsou to organizace, nezbytné prostředky a lidé potřební pro zajištění správného řízení kvality. Dosažení tohoto cíle předpokládá, že všechny specifikace a požadavky týkající se daného produktu (služby) jsou dostatečně známé a pochopitelné pro všechny, kdo budou takový systém zavádět [3].

Kontrola kvality byla do 20. století nedostatečná. Od 20. století se začaly zavádět organizované systémy kontroly kvality. Rozvoj těchto systémů byl velmi rychlý a procházel těmito fázemi:

1. fáze: Prohlídka. Tato kontrola je založena na jednoduché prohlídce a na dogmatu „Přijetí – odmítnutí“.

2. fáze: Kontrola kvality. V tomto případě je kontrola založena na prohlídce produktu po výrobě a na provedení odpovídajících nápravných opatření v případě snížení kvality od počátečních fází nebo specifikace produktu.

3. fáze: Zajištění kvality. Nedokonalosti jednoduché kontroly kvality jsou překonány přijetím systému zajištění kvality, založeném na modelech zajišťujících stabilní předběžné podmínky kvality, takže konečný produkt nebude mít sníženou kvalitu oproti specifikaci. V roce 1987 vydala Mezinárodní organizace pro standardizaci (ISO) modely řady ISO 9000, které stanovují přesné specifikace kvality pro výrobní postupy v různých průmyslových odvětvích.

4. fáze: Řízení všeobecné kvality. Detailní systém zaměřený na výrobu kvalitních produktů s nízkými náklady s plným využitím dostupných lidských zdrojů, zaváděním inovací, konstantním zlepšováním a širokou účastí všech zaměstnanců [3].

## 1.2 Kontrola kvality potravin

Kvalita a bezpečnost potravin se stala jednou z priorit, na kterou se Vláda ČR zaměřila před vstupem České republiky do Evropské unie. Usnesením vlády č. 1320 ze dne 10. prosince 2001 ke Strategii zajištění bezpečnosti potravin v ČR byly uloženy jednotlivým resortům úkoly tak, aby došlo v ČR k vybudování účinného systému.

Mezi instituce zabezpečující kvalitu a bezpečnost potravin patří dozorové orgány: Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI), Státní veterinární správa (SVS), Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ) a Orgány ochrany veřejného zdraví (OOVZ) [4].

Mezi další instituce pak patří: Česká obchodní inspekce (ČOI) a nevládní instituce - Koalice občanských spotřebitelských aktivit (KOSA), Sdružení obrany spotřebitelů (SOS) a Sdružení českých spotřebitelů (SČS) [5].

### 1.3 Hlediska kvality potravin

Kvalitu potravin je nutno posuzovat z různých hledisek tak, aby kontrolovaná potravina vyhovovala určitým požadavkům. Mezi tato hlediska patří:

- a) nutriční (výživová) hodnota – jedná o obsah látek významných pro výživu.
  - obsah bílkovin s vhodnou aminokyselinovou stavbou,
  - dieteticky významné polysacharidy (sacharidy, vláknina, pektiny),
  - tuky, enzymy, minerální látky, vitaminy apod.
- b) senzorická kvalita - kvalita posuzovaná senzory – tj. např. barva, velikost, tvar, vůně, chuť.
- c) technologická kvalita - zahrnuje vhodnost pro určité formy zpracování jak v průmyslu tak i v kuchyni. (loupatelnost, výtěžnost, barevná stálost, vhodnost k vaření, pečení, k různým formám konzervace, odolnost proti transportu, dobrá skladovatelnost).
- d) hygienická kvalita - představuje stupeň kontaminace (znečištění) produktů cizorodými i ostatními škodlivými látkami. Takovými látkami jsou např. těžké kovy, dusičnany, zbytky pesticidů, potravinářské přísady. Zvláště významnou složkou se stává mikrobiologická a mykotoxikologická kvalita.. Plísň některých rodů produkuje mykotoxiny (např. plíseň *Aspergillus flavus* produkuje aflatoxiny, které jsou hepatokarcinogenní).
- e) kvalita podle původu, podle způsobu výroby či zpracování, legislativy a označení - posuzuje se, jakým způsobem hospodaření byl produkt či surovina vyrobena, zda je označen podnik, ze kterého suroviny či produkty pocházejí [6].

### 1.4 Symboly pro identifikaci kvality potravin

Symboly pro identifikaci kvality potravin (příloha 1) byly vyvinuty v osmdesátých letech a následně připraveny k unifikaci ISO. Užívají se zejména na spotřebitelském balení potravin nebo v textových přehledech. Mohou sloužit k rozeznání kvalit, motivují ve vztahu ke spotřebě potravin. Ve formě oznámení se mohou užívat samostatně nebo ve čtvercové ta-

bulce. Ve formě výstrahy, příkazu a zákazu se užívají v odpovídajících nebarevných tabulkách. Do doby většího rozšíření je vhodné je používat společně s vysvětlujícím textem [7].

## 1.5 Kvalita potravin a EU

Bezpečnost potravin je klíčovým zájmem občanů v celé Evropě. Evropská unie proto klade velký důraz na kvalitu potravin. Stanovené normy musí dodržovat všechny členské státy. Potravinářské podniky, které nebudou schopny dodržet vysoké kvalitativní standardy EU, nebudou moci na společném trhu svoji produkci prodávat. Na druhé straně dávají tato přísná kritéria spotřebiteli záruku, že se na trhu bude setkávat pouze s takovými potravinami, které nebudou představovat pro lidský organismus žádná rizika [8].

V současné době je oblasti bezpečnosti a kvality věnována nadstandardní pozornost, což má několik důvodů. Značně se rozšířil okruh výrobců potravin a spektrum nabídky potravinářských výrobků, rovněž se využívá mnoho nových technologií. Zároveň s tímto vývojem postupuje i vědecké poznání odhalující rizika konzumace určitých druhů potravin. Velký důraz, který evropští spotřebitelé kladou na bezpečnost potravin, se odráží i v další skutečnosti EU - vnímá vysokou kvalitu potravin jako prvek odlišující její potravinářskou produkci od "zbytku světa" [8].

Na úrovni EU z tohoto důvodu funguje tzv. Rapid Alert System for Foodstuffs (RASFF - Systém rychlého varování pro potraviny). Členské státy Unie do tohoto systému povinně hlásí případy potravin zdravotně závadných, které byly zjištěny kontrolou v tržní síti a mohou se vyskytovat na společném trhu EU (nejde o výrobky, které se nevyvážejí a prodávají se na lokálním trhu). Česká republika se systémem RASFF již spolupracuje [8].

Oblast kontroly, bezpečnosti a kvality potravin je regulována celou řadou norem, vyhlášek a nařízení, přičemž základním současným trendem je na jedné straně současnou evropskou legislativu zjednodušit, na straně druhé zpřesnit a zpřísnit podmínky výroby potravin především z hlediska ochrany spotřebitele. Nový rámec pro evropskou potravinovou legislativu by měl poskytovat Evropský úřad pro bezpečnost potravin, jehož vznik schválila Rada Evropské unie ministrů zemědělství počátkem roku 2002. Hlavním úkolem úřadu je poskytovat vědecké podklady pro unijní legislativu a politiku s přímým nebo nepřímým dopadem na bezpečnost potravin a informovat veřejnost o případných rizicích. Základním cílem je pak vytvářet, udržet a rozvíjet důvěru evropského spotřebitele v evropské potraviny [8].

Ve všech státech EU funguje pro zajištění ochrany spotřebitele, ale i vzájemné důvěry mezi dodavateli a odběrateli, systém kontroly potravin, který vymezuje odpovědnost výrobce (a také distributora - prodejce) za jakost a zdravotní nezávadnost produktu uváděného do oběhu. Skutečnost, že v Evropské unii vznikly v nedávné době problémy v oblasti bezpečnosti potravin, může budít zdání, že bezpečnosti potravin není v Evropě věnována patřičná pozornost, avšak právě zjištění těchto problémů je důsledkem pečlivého monitoringu a kontroly zdravotní nezávadnosti potravinářských surovin [8].

Pozornost kontroly je zaměřena především na plnění ustanovení zákonů a jejich prováděcích vyhlášek jasně definujících, které požadavky musí potravinářský výrobek splnit před jeho uvedením do distribuce, tedy před jeho prodejem spotřebiteli. Z hlediska výrobců a dozoru státní správy je nejdůležitější HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points), což je systém kontroly a analýzy kritických bodů výroby potravin. Prakticky jde o vytipování bodů v technologickém procesu, ve kterých může vzniknout největší riziko porušení zdravotní či hygienické nezávadnosti nebo jakosti budoucího výrobku. Při aplikaci systému HACCP lze toto nebezpečí odhalit již během výroby určitého potravinářského produktu a bezprostředně je odstranit nápravnými opatřeními. Další významnou pomůckou pro výrobce jsou zásady správné výrobní praxe (v ČR zpracovávané jednotlivými svazy a společenstvy výrobců potravin), jejichž dodržování pomáhá snižovat na minimum riziko kontaminace či jiného poškození potravin [8].

## 2 METODY MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

Molekulární biologie je v současnosti snad nejprogresivněji se rozvíjející oblast vědy, které se využívá téměř ve všech spektrech chemického i biologického zkoumání.

Z historického hlediska patří molekulární, resp. molekulárně-genetické a biotechnologické metody v oblasti přírodních věd k nejmladším. Až do poloviny 60. let 20. století, kdy začaly být rutinně aplikovány postupy tzv. „biochemické genetiky“, nebylo až na výjimky možno studovat živé organismy hlouběji než na úrovni buněk, případně větších organel. Za zakladatele genetiky, předchůdkyně biomolekulárních věd, je považován moravský rodák Johann Gregor Mendel, který položil základy moderních genetických zákonů. Příběh slavné molekuly DNA začíná až tehdy, kdy se mladému švýcarskému vědci Friedrichu Miescherovi podařilo do té doby neznámou substanci z buněčného jádra izolovat [9].

Minulé století přineslo objevy zejména v oblasti struktury buňky a molekulární biologie, k čemuž přispěl i vynález elektronového mikroskopu. Přelomový okamžik v genetice i velkém množství jiných vědních disciplín nastal v roce 1952, kdy James Watson společně s F. H. C. Crickem objasnili strukturu molekuly DNA jako levotočivé šroubovice. Za tento objev roku 1962 obdrželi Nobelovu cenu [9].

### 2.1 Molekulární metody pro sledování potravin

Molekulární metody jsou jedním z důležitých nástrojů pro analýzu potravin a biologických substancí. Pro sledování kvality potravin byla vyvinuta celá řada přístrojů a metod měření, které byly již uplatněny v praxi nebo byly publikovány v odborných časopisech.

Mezi nejvýznamnější a nejpoužívanější metodu patří polymerázová řetězová reakce (PCR). Mezi další metody patří polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP), metoda fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) či metoda NIR.

Nevýznamnou část studie potravin zahrnuje i analýza proteinů. Jednou z nejpoužívanějších metod je SDS-PAGE.

### 3 METODA PCR

V posledních několika letech jsou do rutinní klinické praxe zaváděny molekulárně biologické metody. Jednou z nich je polymerázová řetězová reakce (PCR).

Polymerázová řetězová reakce je metodou enzymatického zmnožení specifických úseků DNA *in vitro*. Pomocí této metody lze na základě komplementarity bází obsažených v molekule nukleové kyseliny namnožit cílový úsek nukleové kyseliny. Přítomnost cílové nukleové kyseliny ve vyšetřovaném vzorku je dále prokazována různými postupy (elektroforesa s následnou vizualizací v UV světle nebo hybridizace se specifickými sondami nukleové kyseliny s následnou imunoenzymatickou vizualizací). Metoda je značně rychlá, má vysokou specifitu i citlivost průkazu (téměř 100 %). Ve srovnání s ostatními "klasickými" metodami zůstává problémem standardizace této metody [1].

PCR spočívá v cyklickém střídání tří jednoduchých fází, z nichž každá probíhá za určité teploty.

1. teplotní denaturace – rozpojení dvoušroubovice DNA na jednotlivé řetězce.
  2. připojení primerů (annealing) – navázání specifických primerů na odpovídající místo rozvinuté DNA.
  3. polymerace (syntéza) – za přítomnosti DNA polymerasy se syntetizuje úsek vymezený navázanými primery, zároveň dochází k dosyntetizování vlákna (vytvoření dvouřetězce).
- Vzniklé reakční produkty (amplikony) slouží v dalším cyklu jako matrice pro vznik nových kopií. Každý cyklus zdvojnásobí počet kopií původní DNA [10].
- Pomocí PCR je možné detekovat ty organismy, u kterých je alespoň částečně známá jejich sekvence, tzn., ke kterým lze zkonstruovat primery [10].

#### 3.1 Historie PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla vyvinuta vědeckými pracovníky biotechnologické firmy Cetus Corporation v USA v polovině 80. let 20. století. Objevitelem této metody byl v roce 1983 molekulární genetik Kary B. Mullis, který poprvé provedl mnohonásobnou *in vitro* replikaci ve zkumavce. V říjnu roku 1993 za objev PCR získal Nobelovu cenu za chemii. Jelikož DNA polymerasa nesnáší vysoké teploty, využil Mullis enzym izolovaný z bakterie *Thermus aquaticus* žijící v horkých pramenech. Výsledky testování takto získaného enzymu označovaného zkratkou Taq polymerasa, kterou vyizoloval Mullisův kolega D. Gelfland, předčily očekávání. Procedura se zrychlila,

zjednodušila a navíc se díky možnosti využití vyšších teplot při vazbě primerů, zvýšila i specifická metoda.

V roce 1989 poskytl Cetus švýcarské firmě Roche exklusivní celosvětové právo k obchodnímu využití PCR pro diagnostiku lidských nemocí. Pozdější práva získala farmaceutická společnost Hoffmann-La Roche.

O rostoucím významu PCR svědčí stoupající počet publikací věnovaných každoročně této metodě. Od několika v roce 1984 na přibližně 10 000 v roce 1994 až na 30 000 do roku 1998 [11].

## 3.2 Molekulárně-biologické pojetí PCR

Princip PCR je značně jednoduchý. Řídí se vzorem přirozené replikace genetického materiálu, která nastává kdykoliv se buňka dělí na dvě nové buňky. Genetická informace (u většiny organismů) je uložena v buňkách ve formě deoxyribonukleové kyseliny, DNA. Tato kyselina obsahuje informaci pro tvorbu proteinů, které mají v organismu velké množství funkcí. Savci nesou ve svých DNA informace pro syntézu 50 000 – 100 000 různých bílkovin [11].

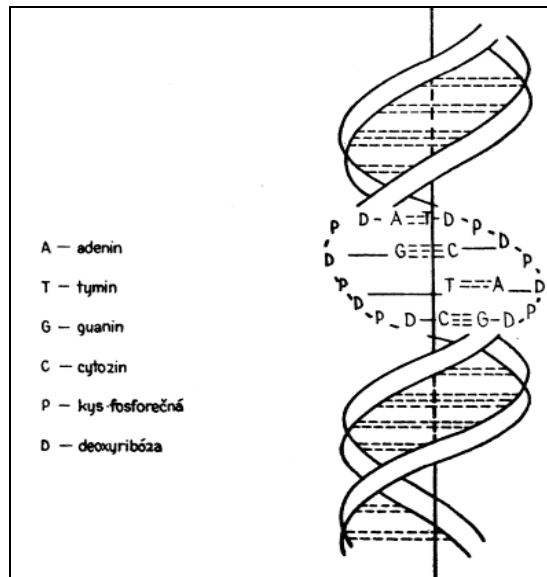
Proteiny – bílkoviny, slouží např. jako enzymy katalyzující různé biochemické reakce. Rovněž vytvářejí strukturální prvky v buňkách. Jsou odpovědné za přenos kyslíku v krvi a jako protilátky hrají klíčovou roli v obraně organismu proti nemocem [11].

### 3.2.1 DNA struktura

Geneticky aktivní hmotou buněk je deoxyribonukleová kyselina, označovaná DNA. Deoxyribonukleová kyselina je polymerní, tj. vysokomolekulární látka.

Molekula DNA má podobu vlákna o tloušťce 2 nm. Vlákno DNA je tvořeno dvěma polynukleotidovými řetězci (obr. 1), které jsou vzájemně ovinuty, molekula DNA má tedy podobu dvojité levotočivé šroubovice. V dvourozměrném schématu ji můžeme znázornit jako „žebřík“. Podoba dvojité šroubovice, kterou mají molekuly DNA, je dána tím, že molekuly dusíkatých bází jednoho a druhého řetězce jsou vzájemně spojeny vodíkovými můstky [12].



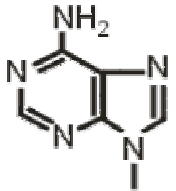
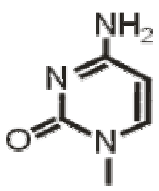


Obr. 1. Zjednodušené schéma dvoušroubovicové DNA

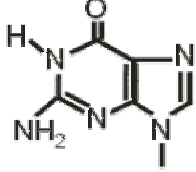
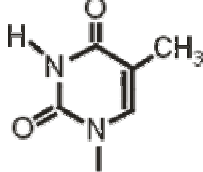
Základními stavebními jednotkami DNA jsou nukleotidy. Každá molekula nukleotidu má tyto složky:

1. pentosu: 2-deoxy-D-ribosu,
2. dusíkatou organickou bází: adenin, cytosin (tab. 1), guanin, thymin (tab. 2),
3. kyselinu fosforečnou.

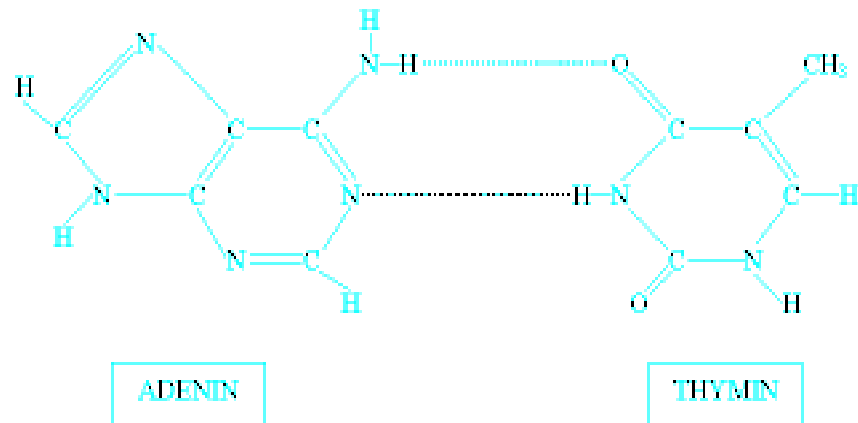
Tab. 1. Dusíkaté organické báze adenin a cytosin

název	vzorec	název	vzorec
adenin		cytosin	

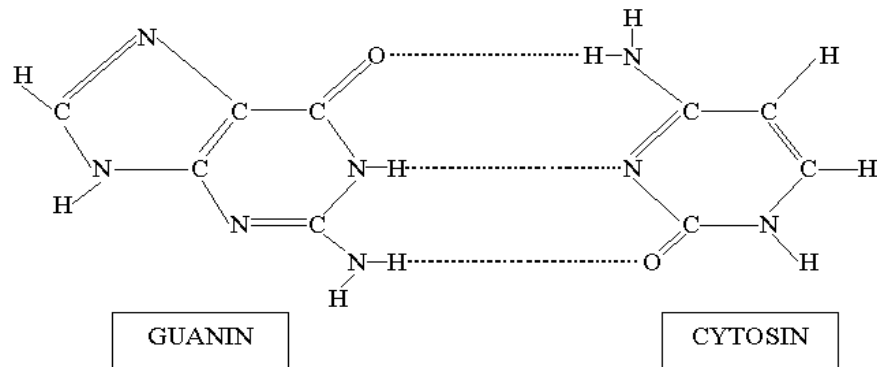
Tab. 2. Dusíkaté organické báze guanin a thymin

název	vzorec	název	vzorec
guanin		thymin	

Molekuly sacharidů a fosfátů jsou navzájem spojeny a vytvářejí “boční stěny” žebříku, zatímco příčky, stupně, vytvářejí 4 báze. Báze jsou párovány vodíkovými vazbami tak, že adenin se páruje s thyminem dvěma vodíkovými vazbami (obr. 2) a cytosin s guaninem třemi vodíkovými vazbami (obr. 3) [12].



Obr. 2. Párování N-bází adenin a thymin pomocí 2 vodíkových můstků

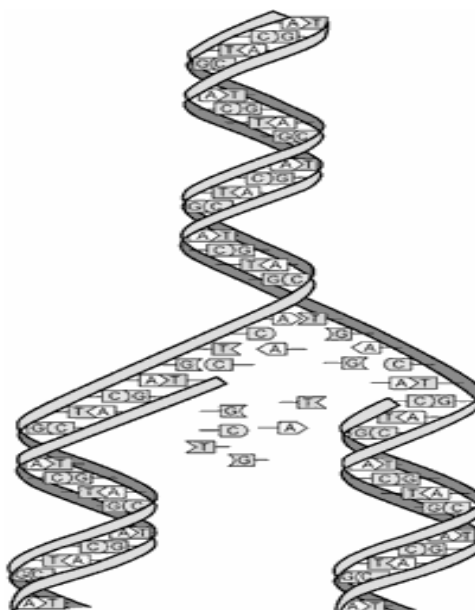


Obr. 3. Párování N-bází guanin a cytosin pomocí 3 vodíkových můstků

Dvě vlákna DNA proto nejsou zcela identická, ale komplementární. Sekvence bází např. adenin, thymin, cytosin, guanin, cytosin determinuje sekvenci thymin, adenin, guanin, cytosin, guanin na druhém, komplementárním vlákně. Každé vlákno, řetězec, má 3'-hydroxylový a 5'-fosfátový konec. V dvojšroubovici mají vlákna opačný směr, tj. jedno vlákno je orientováno z 3' na 5', druhé z konce 5' na 3' [12].

### 3.2.2 Replikace DNA

Při replikaci (obr. 4) vzniknou z jedné mateřské molekuly DNA dvě naprosto stejné DNA dceřiné (každá s jedním vláknem z původní DNA). Klíčovou roli při replikaci DNA mají enzymy (DNA polymerasy). Při své práci vždy postupují od konce 5' ke konci 3'. Aby DNA polymerasa mohla zahájit připojování nukleotidů nového vlákna DNA, musí být vodíkové můstky narušeny. Místa, kde tato narušení vzniknou jsou označovány jako replikační počátky. To molekule DNA umožňuje zreplikovat se. Poté, co jsou k předlohovým (templátovým) vláknům dosyntetizována vlákna nová, je replikace DNA dokončena. Replikace DNA je semikonzervativní děj, neboť v obou nově vzniklých DNA je jedno vlákno z původní dvojšroubovice [13].



Obr. 4. Schéma replikace DNA

### 3.3 Princip PCR – amplifikace DNA

Principem polymerázové řetězové reakce je mnohonásobná replikace molekuly DNA. Při PCR je tato replikace uměle navozena ve zkumavce (*in vitro*) a její průběh je kontrolován změnami teplot. Předpokladem pro tyto děje je zajištění optimálního prostředí pro reakci, včetně velmi přesné kontroly teploty v jejím průběhu, dodání potřebných stavebních nukleotidů pro vytvoření kopírované DNA a zejména dodání malých úseků DNA, tzv. primerů, které jsou schopny takovou reakci zahájit [1].

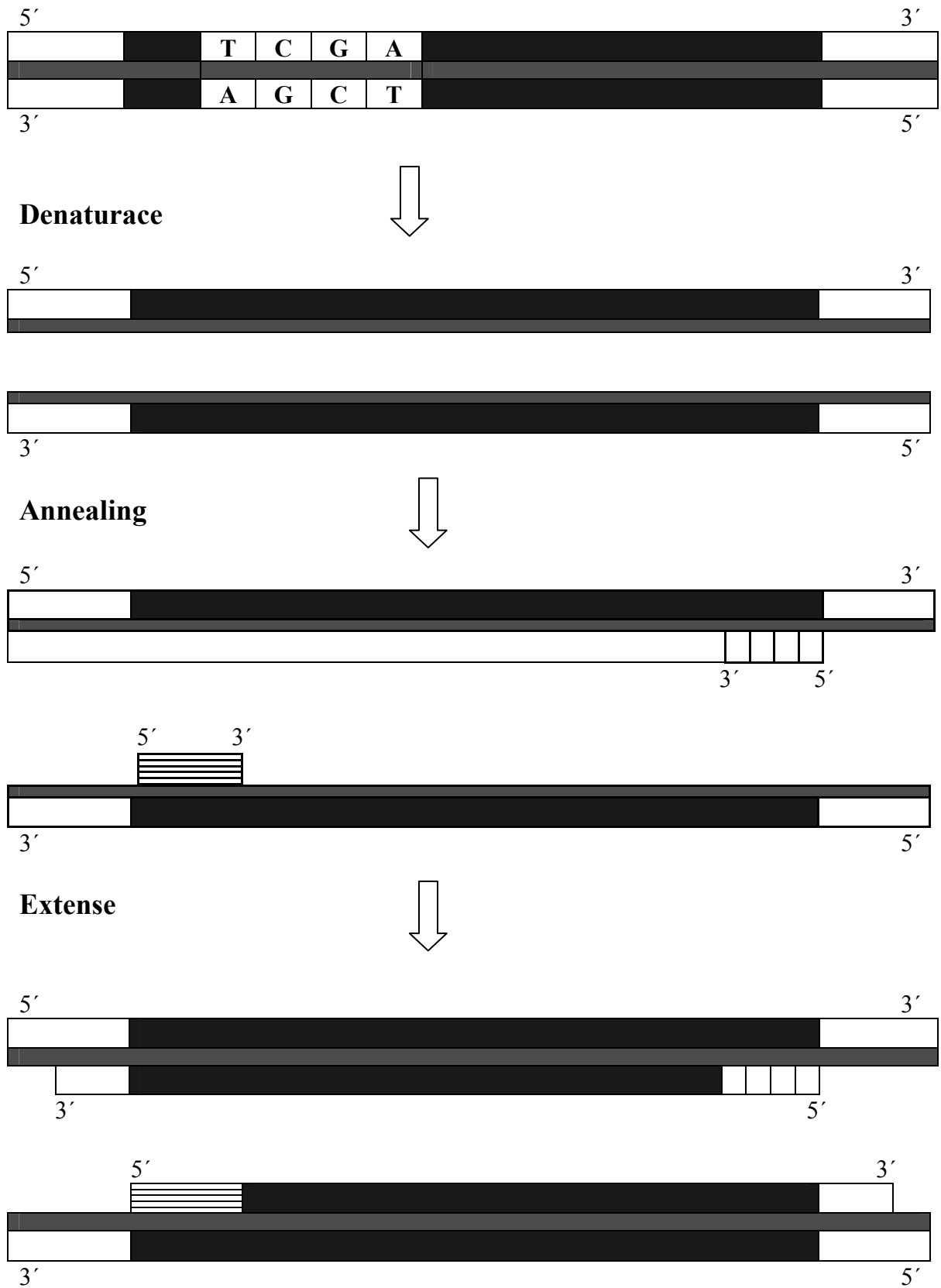
Primery jsou krátké jednovláknové úseky DNA (oligonukleotidy), které mají schopnost najít ve vyšetřované DNA přesně takový úsek, který jim chybí do jejich normální dvouvláknové struktury a doplňuje je do tvaru dvojité šroubovice – jsou k tomuto úseku tedy komplementární. K tomu však potřebují, aby cílová DNA byla rovněž jednovláknová. Tohoto stavu lze dosáhnout denaturací DNA po jejím zahřátí. Při teplotách okolo 94°C dvojitá šroubovice denaturuje na dvě komplementární vlákna a umožní tak nasednutí primerů. Vzhledem k tomu, že denaturací jednoho úseku DNA vzniknou dvě vlákna, je zapotřebí k jeho úspěšnému kopírování dva primery. Primery musí být dostatečně dlouhé na to, aby se v cílové DNA vyskytovaly vždy pouze jednou. Průměrná délka primerů, potřebná pro jejich jedinečnost, se nejčastěji pohybuje okolo 20-30 nukleotidů [1].

Poté, co oba primery „svůj“ úsek v cílové DNA naleznou a na zmíněném principu komplementarity se něj naváží (tzv. annealing), vytvoří strukturu, která umožní následné enzymatické kopírování obou vláken a vznik zmíněných dvou kopií příslušného úseku (tzv. extense, prodlužování vlákna). Podstatné je, že také annealing primerů a extense vznikajících vláken jsou v podmínkách PCR závislé na teplotě. Při nízkých teplotách se k sobě mohou nespecificky připojovat také vlákna primerů a cílové DNA, která jsou si pouze podobná a nikoli zcela komplementární. Taková reakce by byla zdrojem falešně pozitivních výsledků. Za příliš vysokých teplot annealingu naopak nedochází k navázání ani plněkomplementárních primerů a taková reakce dává falešně negativní výsledek. Pro každou PCR se proto pomocí speciálního počítačového programu určí anealingová teplota, zaručující její specifitu. Annealingové teploty různých PCR se nejčastěji pohybují mezi 55-65 °C [1].

K enzymatické syntéze nových vláken amplifikované DNA se využívá DNA polymeras, kterými jsou k témuž účelu vybaveny bakterie. Aby i tato fáze byla závislá na teplotě, a aby tato teplota byla odlišná od teplot denaturace a annealingu, používá se DNA polymerasa z bakterií žijících v horkých zřídlech, jejichž enzymy jsou nastaveny na teploty okolo 72°C. Nejběžnějším zdrojem takového enzymu je bakterie *Thermus aquaticus*, odtud Taq polymerasa. V jednom takovém cyklu tedy z každé původní molekuly DNA vzniknou replikací dvě identické kopie, které mohou sloužit jako templát další reakce, při které již vzniknou čtyři kopie, následně osm a jejich počet se v řetězové reakci zvyšuje geometrickou řadou. Lze si snadno představit, že když je počet takových cyklů dostatečně vysoký, například 30-35, je možné z jedné templátové molekuly získat velký počet kopií, který nám signalizuje přítomnost původně velmi malého množství DNA ve vzorku, ale který lze přitom snadno zjistit a následně dále analyzovat [1].

Metoda PCR je tedy třístupňový proces (obr. 5) opakovaný v několika cyklech.

PCR se provádí ve speciálním přístroji, tzv. termocykleru, který je schopen měnit teplotu reakčního prostředí velmi rychle (kolem 1 °C za 1 sekundu) a přitom velmi přesně. Nastavením specifických teplot denaturace, annealingu a extense se takto spustí jednotlivé fáze jednoho cyklu a jejich opakováním se spouští řetězová reakce. Toto zařízení opakuje stejný teplotní program (94 °C, 55 – 65 °C, 72 °C) znovu a znovu. Jeden cyklus trvá většinou méně než 3 minuty. Tímto způsobem lze za méně než dvě hodiny vytvořit miliardu kopií dané DNA sekvence [1].



Obr. 5. Tři stupně PCR

### 3.4 Modifikace PCR

#### 3.4.1 RT PCR (reverse transcriptase PCR, zpětná neboli reverzní PCR)

Analýza exprese genů na úrovni RNA má velký význam v základním lékařském, farmaceutickém a obecně biologicky orientovaném výzkumu. Určování přítomnosti RNA má rovněž vysokou vypovídací diagnostickou hodnotu. V současné době jsou tradiční metody identifikace přítomnosti mRNA nahrazovány metodou RT-PCR, která spočívá v reverzní transkripci RNA na komplementární DNA (cDNA) a následné amplifikaci cDNA fragmentu polymerázovou řetězcovou reakcí. Výhody této metody spočívají v rychlosti, snadnosti provedení a nezávislosti na použití radioaktivních látek [14].

#### 3.4.2 Real-time PCR (q-PCR)

Real-time PCR (quantitative PCR, q-PCR) je metoda umožňující přesnou kvantifikaci hledané cDNA sekvence ve vzorku. Využívá se zde několika možností detekce. Všechny jsou založeny na nárůstu fluorescence vlivem zvyšujícího se počtu nově syntetizovaných molekul DNA. Principiálně nejjednodušší je metoda využívající fluorescenčních barviv, která se interkalují mezi báze DNA (např. Sybr Green), narůstající fluorescence pak odpovídá vzrůstajícímu množství DNA ve vzorku. V současnosti je asi nejvíce rozšířená metoda využívající 5-exonukleasové aktivity DNA polymerasy. Klíčovým je zde použití oligonukleotidu – próby (nejčastěji TaqMan sonda), která se specificky váže na sekvenci mezi oběma primery. Sonda je na jednom svém konci označena fluorescenční látkou a na druhém konci zhasičem fluorochromu. Při syntéze komplementárních vláken hydrolyzuje DNA polymerasa TaqMan sondu, dojde k uvolnění fluorescenční látky a k nárůstu fluorescence, která je detekována a zaznamenána v reálném čase. Na základě standardizačních křivek lze přesně kvantifikovat množství hledané cDNA sekvence ve vzorku [14].

#### 3.4.3 Long PCR

S narůstající popularitou PCR rostou požadavky na přesnou amplifikaci dlouhých fragmentů DNA (tzv. „Long PCR“ nebo "LA PCR" - Long and Accurate). Taq DNA polymerasa, nejčastěji užívaný enzym pro PCR, je schopna amplifikovat fragmenty genomové DNA do velikosti přibližně 3 kb. Neschopnost amplifikovat delší fragmenty DNA pravděpodobně reflektuje skutečnost, že Taq DNA polymerasa nemá 3'→5' exonukleasovou aktivitu a pokud dojde k chybné inkorporaci nukleotidu, může dojít k ukončení amplifikace. Některé

DNA polymerasy, jako například Pfu, Deep Vent a Pwo mají 3'→5' exonukleasovou aktivitu, která snižuje o řád výskyt chyb v průběhu amplifikace. Tyto polymerasy však mají nízkou amplifikační účinnost a proto nejsou rovněž použitelné pro amplifikaci dlouhých fragmentů DNA [15].

LA DNA Polymerases Mix obsahuje směs polymeras, a proto umožňuje amplifikovat relativně dlouhé DNA fragmenty tím, že v sobě kombinuje vysoce procesivní DNA polymerasu Unis a další polymerasu s 3'→5' exonukleasovou aktivitou. Navíc, amplifikace se provádí za speciálních reakčních podmínek, které jsou optimalizované pro LA PCR; v případě analýzy savčího genomu lze tímto způsobem amplifikovat DNA fragmenty o velikosti až 20 kb a v případě lambda DNA a jiných méně komplexních DNA o velikosti až 40 kb. Za významnou lze považovat skutečnost, že ačkoliv se jedná o velice robustní amplifikační systém, frekvence chyb, ve srovnání s Taq DNA polymerasou, je přibližně 4 x nižší. Z tohoto důvodu lze doporučit LA DNA Polymerases Mix i pro běžnou PCR, zvláště pokud jiné amplifikační procedury selhávají, a při amplifikaci DNA fragmentů, které jsou určeny ke klonování [15].

#### **3.4.4 RACE PCR (rapid amplification of cDNA ends)**

RACE je metoda rychlé amplifikace cDNA konců pomocí PCR. Nejprve se syntetizuje cDNA reverzní transkripcí z mRNA. Je to metoda amplifikace cDNA, kdy syntéza probíhá směrem k 5' nebo 3' konci. Musí být známa část sekvence některého exonu. Amplifikace 5' konců vyžaduje purifikaci prvotní cDNA a ukončení řetězce terminální transferasou za vzniku druhého poly(A) konce. Kombinací se pak získá celá plnohodnotná cDNA [15].

#### **3.4.5 Asymetrická PCR**

Asymetrická PCR je modifikace PCR, která umožňuje preferenční syntézu jenom jednoho vlákna z duplexu DNA tím, že jeden z primerů je v nadbytku. Jako produkt PCR tak vzniká jednovláknová DNA vhodná např. pro sekvenování. Jinou modifikací je SSPR (single strand producing reaction), která je ještě specifitější. Tato metoda se také vhodně kombinuje s nested PCR [17].

#### **3.4.6 Nested PCR**

V PCR se může docílit zvýšení citlivosti pomocí hnízdového (nested nebo seminested) uspořádání. Typický postup hnízdové amplifikace zahrnuje první část (15 až 30 cyklů)



s jedním párem primerů a druhou část (15 až 30 cyklů) s využitím druhého páru primerů, komplementárních k místům ve vnitřní sekvenci primárního amplikonu. Mezi oběma částmi se PCR produkt přenáší do nové zkumavky. Tato technika má výhody i nevýhody. Její citlivost je značně vysoká. Často může být detekována jediná kopie cílové molekuly v reakční zkumavce bez použití hybridizace se značenou sondou.

Amplifikace v druhé části provedení slouží zároveň k ověření specifity produktu první části. Přenesením do nové zkumavky se vyřadí inhibitory, které mohou být ve vzorku přítomny. Byly popsány postupy hnízdové reakce bez otevřeného přenosu. Jsou nazývány jako „jednozkumavkové“ na rozdíl od výše popsaných „dvouzkumavkových“ [17].

Pro první reakci se použije první sada oligonukleotidů, v druhé, nested reakci se použijí oligonukleotidy, které jsou navrženy pro fragment získaný jako produkt první PCR. Tato oblíbená modifikace má řadu aplikací, některé vystačí se sadou pouhých tří primerů [17].

### 3.4.7 Multiplexová PCR

Významnou modifikací je multiplexová (mnohonásobná) PCR. Tato reakce je velmi výkonná metoda k testování bodových mutací v jedné amplifikační reakci.

V multiplexní PCR je použito více párů specifických primerů komplementárních k různým cílovým sekvencím v jedné amplifikační reakci. Současná amplifikace několika cílů najednou se provádí s několika záměry:

- mohou být sledovány změny v rozsáhlých oblastech DNA,
- mohou být sledovány různé segmenty cílového genomu,
- může být zahrnuta vnitřní kontrola amplifikovatelnosti vzorku,
- mohly by být vyvinuty cenově efektivní panely testů pro detekci více patogenů v jediném vzorku.

Nejsložitější je fáze přípravná, kdy je nutno vypracovat takové reakční podmínky (sekvence nukleotidů, koncentrace primerů, optimální teploty jednotlivých kroků cyklu atd.), aby amplifikační reakce pro každý testovaný úsek genomické DNA neprobíhala pouze v případě, že se jedná o mutaci v tom kterém příslušném místě. Pro každou reakci je zařazena pozitivní a negativní kontrola [17].

### 3.4.8 PSM (PCR – mediated site directed mutagenesis)

PSM je metodou, která umožňuje identifikaci specifických alel umělou změnou sekvence během PCR tak, že dojde k vytvoření nového nebo k zániku původního restrikčního místa

pro restriční endonukleasu. Metoda je založena na nepřesné hybridizaci sondy s genomickou DNA. Sekvence je modifikována tak, že jeden z primerů se v jednom nukleotidu liší a hybridizuje s templátem v blízkosti zkoumané mutace. Amplifikace oblasti s takto uměle vytvořenou mutací vede k inkorporaci záměny nukleotidu do výsledného produktu PCR. Po štěpení příslušným restričním enzymem a elektroforetické separaci se identifikují jednotlivé alely [17].

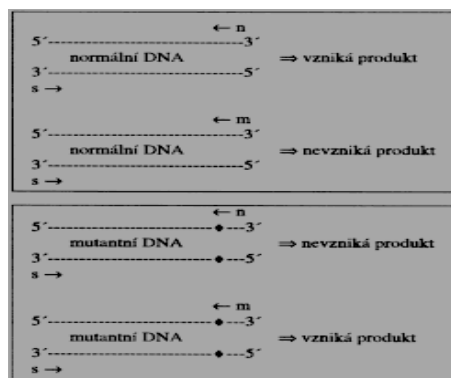
### 3.4.9 *In situ*-PCR

Tato metoda umožňuje amplifikovat specifické sekvence nukleových kyselin přímo v buňkách nebo v cytologických preparátech tkání a chromozomů. Produkty reakce lze vizualizovat specifickou sondou metodou hybridizace *in situ* nebo imunochemicky. Metoda má podobné uplatnění jako hybridizace *in situ*. Její citlivost je však mnohonásobně vyšší, neboť při ní dochází k amplifikaci cílových sekvencí. Lze jí proto identifikovat i sekvence vyskytující se v několika málo kopiích (např. mRNA vyskytující se v malém počtu kopií, provirové sekvence apod.) [18].

### 3.4.10 AS-PCR (alelově specifická PCR)

Pro detekci bodových mutací se často používají metody PCR, které využívají tzv. alelově specifické oligonukleotidy jako primery. Tyto metody prodělaly v posledních letech vývoj od hybridizačních technik, přes nested PCR až po metody, které vystačí s detekcí fragmentů v agarosovém gelu s ethidiumbromidem po elektroforetickém dělení. Alelově specifická hybridizace je časově náročná a vyžaduje hybridizaci s radioaktivně značenou sondou.

Na obrázku č. 6 je zaznamenán princip reakce AS-PCR, kde



Obr. 6. Princip reakce AS-PCR

s je společný primer, n normální primer a m je mutantní primer.

### 3.5 Nevýhody PCR

Největším problémem aplikace PCR technik je jejich "falešná" pozitivita zapříčiněná vlastní citlivostí těchto technik. Stačí jedna jediná molekula DNA, která znečistí zkumavku, ve které je umístěn zkoumaný vzorek nebo v němž se provádí analýza, a PCR ji zaregistruje jako falešně pozitivní signál [18].

#### 3.5.1 Nejčastější zdroje kontaminací

Mezi nejčastější zdroje kontaminací, které narušují analýzy metodami PCR jsou:

- kontaminace reagensů používaných pro PCR reakce, které již byly několikrát použity,
- akumulace produktů PCR reakcí (amplikonů) v laboratoři při opakovaných amplifikacích těchto cílových sekvencí,
- poměrně velké množství cílových molekul DNA nebo RNA přítomných ve vyšetřovaných vzorcích.

Kontaminace prostřednictvím jednotlivých amplikonů je nejčastější kontaminací. Každá zkumavka používaná pro PCR reakci obsahuje kolem  $10^{12}$  amplikonů, každá kapka aerosolu (6-10  $\mu$ l) může obsahovat více než  $10^5$  cílových sekvencí. K eliminaci těchto nežádoucích "kontaminací" jsou používány pre a post sterilizační postupy [18].

#### 3.5.2 Enzymatická pre-PCR-sterilizace

Pomocí enzymatické pre-PCR-sterilizace metody je nežádoucí nukleotid (např. v TTP) ve všech amplifikačních reakčních směsích nahrazen dUTP (U nahrazuje T, U je inkorporován do amplikonů). Amplikony jsou díky "nepřirozeným" nukleotidovým bázím rozpoznávány autentickými cílovými molekulami DNA. K této reakční směsi je pak přidán bakteriální enzym uracil-N-glukosylasa (UNG). Fyziologická role tohoto enzymu spočívá v eliminaci uracilových reziduí vznikajících při spontánní deaminaci cytosinů z fosfátových skupin. Během krátké inkubace před vlastní amplifikací, řetězce DNA obsahující uracil jsou enzymaticky degradovány. Tyto "roztrhané", nežádoucí řetězce jsou pak substrátem pro další amplifikaci. Samotná UNG je pak teplotně inaktivována při 95 °C. Protože přirozeně se vyskytující cílové molekuly DNA nesmí obsahovat velká kvanta uracilových reziduí, rozlišuje tato metoda mezi uracil obsahujícími amplikony přítomnými v reakčních směsích ještě z předcházejících amplifikací a mezi thymin obsahujícími molekulami DNA z mikro-

organismů v klinických materiálech. Tato pre-PCR-sterilizace tedy eliminuje dříve vzniklé, nežádoucí amplikony a umožňuje amplifikaci "živých", námi žádaných amplikonů [18].

### 3.5.3 Fotometrická post-PCR-sterilizace

Fotometrická post-PCR-sterilizace využívá fotochemických vlastností psoralů, derivátů 4-amino-ethyl-4,5-dimethyl-isopsoralu (4-AMDMIP). Tato sloučenina je přidána do reakční směsi před vlastní amplifikací. Je termostabilní a neinterferuje ani s primery, ani s Taq DNA polymerasou. Po vlastní amplifikaci (avšak ještě před otevřením zkumavky) je amplifikační směs ozářena dlouhovlnným UV světlem, které fotochemicky aktivuje isopsoraly, avšak nijak nepoškozuje DNA. Aktivované psorální sloučeniny vytvářejí na amplifikovaných úsecích DNA cyklobutanové "složeniny" obsahující pyrimidinové zbytky, které brání Taq DNA polymerase v další amplifikaci. Efektivnost tohoto procesu je poměrně vysoká [18].

## 4 DALŠÍ MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÉ METODY

### 4.1 Metoda RFLP

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) je klasická metoda zjišťování genetického profilu, která se již dnes nepoužívá tak často, jako dříve, ale stále je to účinná metoda ke zjišťování určitých úseků DNA.

Tato metoda se skládá ze dvou kroků:

1. amplifikace konkrétního úseku DNA (například intergenových oblastí v chloroplastové DNA) pomocí dvojice známých primerů. Často se využívá primerů, které jsou komplementární k začátkům a koncům kódujících genů okolo nekódující intergenové oblasti. Tyto primery pak bývají využitelné u většiny rostlinných druhů.
2. restrikce (naštípání) namnoženého úseku pomocí restrikčních endonukleas, které specificky štěpí DNA. Například enzym EcoRI rozštěpí DNA vždy, pokud nalezne sekven-  
ci 3'-GAATTC-5'. Pokud je takovéto místo v našem studovaném úseku DNA právě jed-  
nou, uvidíme pak po elektroforese místo jednoho proužku dva. Pokud ale bylo místo změ-  
něno, např. mutací, k rozštěpení nedojde a proužek bude stále jeden. Pomocí této metody  
tedy hledáme polymorfismus v restrikčních místech nejružnějších endonukleas a následně  
ho interpretujeme jako příbuznost či nepříbuznost organismů [19].

### 4.2 Metoda FISH

Metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) lze lokalizovat cílové nukleotidové sek-  
vence přímo v buňkách (*in situ*). Metoda FISH je založena na schopnosti jednořetězcové  
DNA sondy (tzn. úseky DNA o známé sekvenci) vázat úseky cílové DNA fixované na mik-  
roskopickém skle. Jedná se o úseky DNA, které jsou označeny fluorescenčním barvivem  
a které jsou komplementární ke zkoumanému úseku DNA. Tím může být část chromoso-  
mu, gen nebo skupina genů [20].

Sondy jsou značeny přímo různými fluorochromy nebo nepřímo, např. biotinem či digoxi-  
geninem. U metody FISH se používají 3 typy sond:  $\alpha$ -satelitní sondy (centromerické, CEP),  
lokus-specifické sondy (LSI) a celochromosomové sondy (malovací, WCP).

Inkorporace fluorescenčně značených nukleotidů do DNA se obvykle provádí metodou  
nick translace, *in vitro* transkripce, „random primer“, nebo metodou polymerázové řetězo-  
vé reakce.

Za zvýšené teploty (kolem 75 °C) dochází k denaturaci, při které se vlákna sondy i zkoumané DNA rozvolní a po následném ochlazení se sonda hybridizuje na zkoumaný úsek DNA. Tím dojde k jeho označení, což se ve fluorescenčním mikroskopu projeví barevným hybridizačním signálem.

Této metody se používá k detekci genů na chromosomech hmyzu nebo chromosomech savců a rostlin, a dále k detekci specifických molekul RNA uvnitř buněk a tkání [21].

### 4.3 Metoda NIR

Blízká infračervená spektroskopie (Near Infrared Spectroscopy, NIR) je nedestruktivní moderní metoda chemické analýzy využívající interakce mezi dopadajícím zářením a vrstvou materiálu vzorku. Přestože při této metodě nejsou potřeba žádné chemikálie ani odborná obsluha, jsou získané výsledky analýz dostatečně přesné a srovnatelné s referenčními metodami [22].

Tato metoda je založena na interakcích elektromagnetického záření s hmotou, a to zejména takových, které jsou spojeny s výměnou energie mezi hmotou a zářením. Pokud látka absorbuje kvantum záření určitých vlnových délek, zvýší tím svoji vnitřní energii a pak jde o absorpční spektroskopii. V infračervené spektroskopii se tohoto procesu zúčastňuje celá molekula. Infračervená spektroskopie je tedy jednou z metod molekulové spektrometrie. Infračervená spektrální oblast je vymezena vlnovými délkami 700 nm až 1 000 nm.

Blízká infračervená spektrální oblast se nachází mezi viditelnou a střední infračervenou spektrální oblastí a je vymezena vlnovými délkami v rozsahu 1 100 až 2 500 nm [22].

Metoda vyžaduje analytickou kalibraci, kterou se rozumí závislost optických dat na obsahu stanovované složky. Je to řada numerických konstant pro jednotlivé vlnové délky, při kterých probíhá měření pro každou kombinaci analyzovaného produktu a parametru [23].

### 4.4 Imunochemické metody

Imunochemické metody jsou založeny na použití protilátek jako „specifických“ vazebných činidel. Pomocí imunochemických metod lze stanovit v původním biologickém materiálu celou řadu cizorodých látek (farmaka, toxické látky), látky tělu vlastní, látky infekčního původu nebo specifické protilátky vzniklé na nějaký imunologický podnět [24].

Imunochemická metoda, která vyžaduje pro kvantifikaci děje oddělení volného reaktantu od jeho vázané formy, se označuje jako heterogenní, naproti tomu metody, které tento krok nevyžadují se nazývají homogenní.

Imunochemické metody, které využívají jako značky enzymy, patří do souboru metod označovaných jako enzymové imunoanalýzy EIA (Enzyme Immunoassay). Existují dvě hlavní techniky, a to ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) a EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique) [24].

ELISA používá ke značkování komplexu antigen-protilátka enzymy. Pro správné provedení techniky ELISA je třeba splnit řadu předpokladů. Antigen nebo protilátka musí být navázán na povrch nerozpustného nosiče bez ztráty imunoreaktivity. Použité enzymy musí mít vysokou specifickou aktivitu, tj. přeměňují velká množství substrátu na detekovaný produkt. Enzymy musí být stabilní jak během reakce, tak i během jejich skladování. Aktivita enzymů, které jsou použity při značkování se nemůže přirozeně vyskytovat v analyzovaných biologických tekutinách. Většina ELISA metod jsou stanovení na pevné fázi, kde antigen nebo protilátka jsou adsorbovány na povrch pevného nosiče [24].

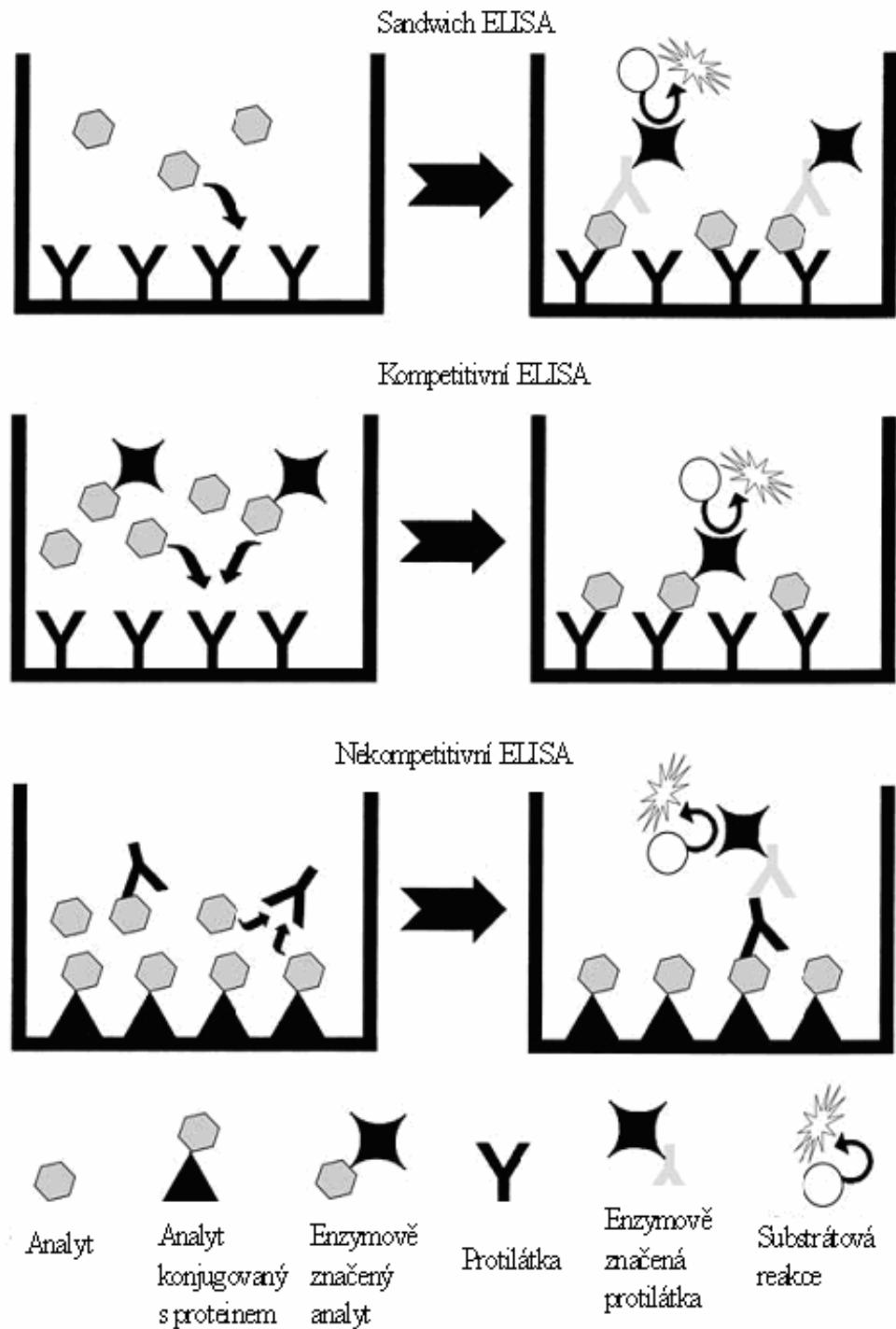
Při ELISA metodách se používá ke značení enzym peroxidasa a její substrát peroxid vodíku, který v přítomnosti chromogenu 1,2-diaminobenzenu dává měřitelný žluto-oranžový produkt. Dalším enzymem, který se využívá ke značení je  $\beta$ -D-galaktosidasa a její substrát *o*-nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid, který je přeměňován na měřitelný žlutý nitrofenolový produkt. Ke značení se také často používá alkalická fosfatasa a její substrát *p*-nitrofenylfosfát, který je přeměňován na nitrofenolát.

Zastavujícím činidlem peroxidasové reakce je 1M kyselina sírová, která zároveň stabilizuje konečný barevný produkt enzymové reakce. U souprav, které používají alkalickou fosfatasu se enzymová reakce zastavuje roztokem hydroxidu sodného [24].

K detekci antigenu se často používá technika ELISA využívající kompetitivní vazebnou reakci na pevné fázi. Kompetitivní metodu ELISA (obr. 7) je možné použít ke stanovení protilátek. V tomto případě soutěží neznačené protilátky v analyzovaném vzorku s určitou danou koncentrací značených protilátek o vazbu na omezené množství antigenu imobilizovaného na pevném povrchu.

Nekompetitivní ELISA (obr. 7), známá pod názvem sendvičová technika, je nejvíce používanou metodou ELISA pro stanovení antigenů, které mají nejméně dva různé antigenní determinanty. Základem stanovení jsou polystyrenové kuličky s adsorbovaným nadbytkem

specifické protilátky proti antigenu. Vhodným enzymem pro značení bývá alkalická fosfatasa [24].



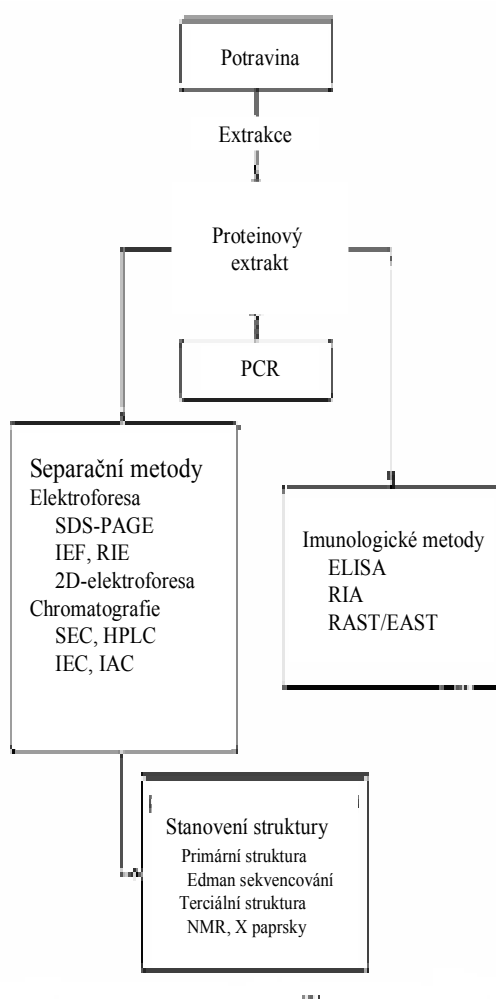
Obr. 7. Průběh Sandwich ELISA, kompetitivní ELISA, nekompetitivní ELISA



## 5 ANALÝZA PROTEINŮ

Současná analýza proteinů (obr. 8) je velmi významnou oblastí biomedicinského a biochemického výzkumu. Jelikož proteiny jsou jedny z nejdůležitějších součástí všech organismů, tkání i buněk, je velice důležité analyzovat jejich druh a množství ve zkoumaném vzorku. Výsledky těchto analýz nám dávají přesné informace o vyskytujících se proteinech, které se např. využívají při sledování kvality potravin.

Mezi nejvíce používané metody patří metody elektroforetické. Je to soubor separačních metod, které využívají k dělení látek jejich odlišnou pohyblivost ve stejnosměrném elektrickém poli. Mezi elektroforetické metody pro analýzu proteinů patří např. SDS-PAGE či dvojrozměrná elektroforesa. Využitelné jsou také metody analytické, např. gelová permeační chromatografie či hmotnostní spektrometrie [25].



Obr. 8. Schéma současné analýzy proteinů

## 5.1 Metoda SDS-PAGE

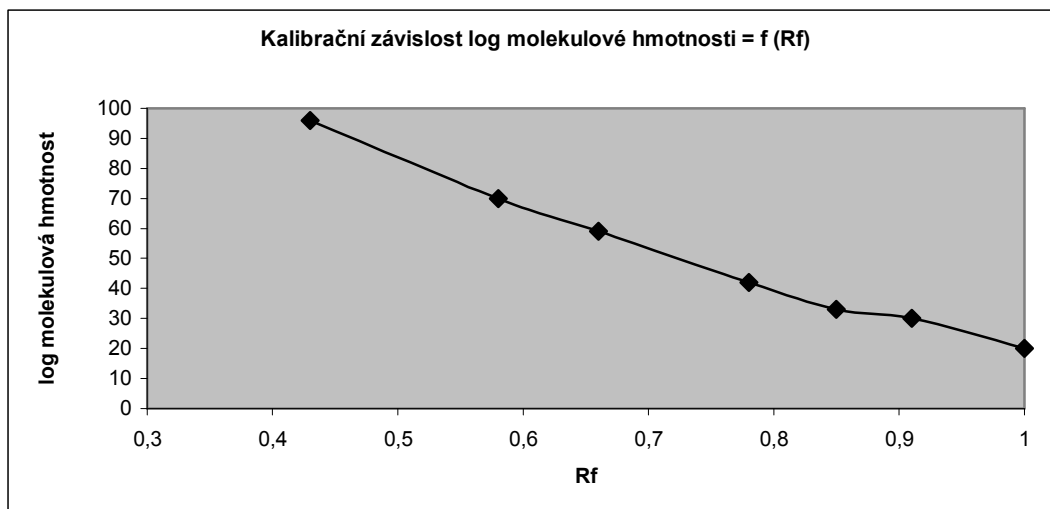
SDS-PAGE (elektroforesa v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného, z angl. sodium-dodecyl-sulphate-polyacrylamide-gel-electrophoresis) je jednoduchá, rychlá a reprodukovatelná metoda pro kvalifikovanou charakterizaci a srovnání proteinů. Tato metoda separuje proteiny na základě rozdílné relativní molekulové hmotnosti [25].

Proteiny se ve stejnoměrném elektrickém poli pohybují podle svého náboje. Je-li však protein v prostředí aniontového detergentu dodecylsulfátu sodného (SDS), získává protein záporný náboj a pohybuje se podle velikosti své molekuly. SDS se zde váže na proteinový řetězec v poměru 1,4 g SDS na 1,0 g proteinu, přičemž délka komplexu SDS – protein je úměrná jeho molekulové hmotnosti. Na základě srovnání relativních mobilit neznámého proteinu a standardů je pak možné určit její relativní molekulovou hmotnost [25].

Relativní mobilita proteinu se pak vyjadřuje:

$$\text{Relativní mobilita (Rf)} = \frac{\text{elektromigrační dráha neznámé bílkoviny}}{\text{celková délka elektroforesy}}$$

Vynesením logaritmu relativní molekulové hmotnosti proteinů známé molekulové hmotnosti proti jejich relativní pohyblivosti (mobilitě) získáme kalibrační přímku, z níž lze odečíst molekulovou hmotnost neznámého proteinu (obr. 9).



Obr. 9. Kalibrační závislost log molekulové hmotnosti proteinu na jeho relativní mobilitě

## 5.2 Dvojrozměrná elektroforesa proteinů

V současné době je dvojrozměrná elektroforesa proteinů metodou pro separaci proteinů. Tato metoda umožňuje rozlišení až 10000 proteinů. Podstatou metody je využití dvou odlišných fyzikálně chemických vlastností proteinů: nejdříve jsou proteiny rozděleny podle jejich izoelektrického bodu (pI), což je hodnota pH, při které je součet nábojů proteinu nulový. Toho lze docílit tak, že na proužek gelu, ve kterém je vytvořen gradient pH, je nanesen protein a aplikováno elektrické napětí. Proteiny pak migrují ke katodě či anodě dle svého celkového náboje až do chvíle, kdy pH místa v gelu odpovídá pI proteinu. Podle zvoleného rozsahu pH lze měnit škálu proteinů, které lze rozdělit, často se právě této vlastnosti využívá pro "zaostření" (zooming) na proteiny s pI v úzkém rozsahu pH. Po separaci v prvním rozměru je provedena běžná elektroforesa na polyakrylamidovém gelu (PAGE), kdy ovšem napětí je aplikováno kolmo vzhledem k původní orientaci elektrod. Proteiny poté migrují v druhém rozměru gelem čistě v závislosti na jejich velikosti. Po proběhnutí obou fází 2D elektroforesy je třeba proteiny vizualizovat některou z barvicích či značicích metod (chemických nebo radioaktivních) [26].

Metoda 2D elektroforesy má samozřejmě i své nevýhody - patří mezi ně omezená reprezentativnost vzorku (problematické jsou velmi zásadité proteiny, proteiny málo rozpustné ve vodné fázi a membránové proteiny), sensitivita (proteiny přítomné ve velmi nízkých koncentracích vyžadují speciální typy barvení), reproducibilita a ve srovnání s obdobnými technikami pro nukleové kyseliny špatná automatizovatelnost [26].

## 5.3 Gelová permeační chromatografie

Pomocí gelové chromatografie je možno separovat molekuly lišící se svým tvarem a velikostí. Mechanismus dělení na gelech je obdobou "molekulárního síta". K separaci látek dochází tehdy, když jejich molekuly jsou odlišných průměrů a mohou difundovat do kapalně fáze přítomné v pórech gelu a to, podle průměru molekuly, do rozdílné hloubky póru gelu. Menší molekuly difundují hlouběji, větší zůstávají při povrchu, největší, tedy ty, jejichž průměr je větší než průměr pórů gelu, nepronikají do pórů vůbec. Nejmenší molekuly vykonají tedy nejdelší dráhu při průchodu kolonou a eluují se s nejvyšším elučním časem, zatímco největší molekuly se pohybují kolonou nejrychleji [27].

## 5.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektroskopie je fyzikálně-chemická metoda pro určování hmotnosti molekul a jejich částí. Hmotnostní spektrometr je iontově optické zařízení, které ze směsi molekul a iontů separuje nabitě částice podle jejich efektivní hmotnosti  $m/z$  ( $m$  je hmotnost,  $z$  je náboj) a umožňuje je stanovit. Dále poskytuje údaje o relativním zastoupení iontů stejné hmotnosti v celkovém množství iontů ve směsi. Záznam molekulárních a fragmentových iontů je charakteristický pro danou látku a dává cenné informace o její struktuře a na jeho základě lze většinou strukturu látky odvodit nebo potvrdit. Hmotnostní spektrometrie je metoda citlivá a umožňuje analyzovat látky v množství kolem  $10^{-9}$  g [28].

## 5.5 Kapalinová chromatografie – HPLC

Mezi metodami kapalinové chromatografie zaujímá významné místo technika HPLC. Zkratka je odvozena od dvou přípustných názvů této techniky a to „high performance liquid chromatography“ (vysokoúčinná kapalinová chromatografie) nebo „high pressure liquid chromatography“ (vysokotlaká kapalinová chromatografie). Mobilní fází je v tomto případě kapalina. Stacionární fází je proteinový film zakotvený na povrchu nosiče nebo pevný adsorbent [29].

V metodě HPLC je dostupná řada různých detektorů, které se liší principem funkce, konstrukcí, selektivitou, citlivostí, mezí detekce a lineárním dynamickým rozsahem. Metoda HPLC využívá tyto typy detektorů: spektrofotometrický detektor (UV-VIS), fluorescenční detektor, hmotnostní spektrometr, refraktometrický detektor a další. Volba detektoru opět závisí na konkrétní aplikaci. Často používaným detektorem je detektor spektrofotometrický (UV-VIS) a fluorescenční. Podmínkou použití těchto detektorů je, aby daný analyt absorboval záření určité vlnové délky (UV-VIS detekce) anebo aby emitoval fluorescenční záření (fluorescenční detekce).

Výsledkem HPLC analýzy je chromatogram. Pokud je analyzovaná směs dobře rozdělena, pak každé složce směsi odpovídá jeden pík. Poloha píku uváděná pomocí retenčního času (určeno podle polohy vrcholu) určuje, o jakou látku se jedná (kvalitativní analýza), plocha píku (nebo jeho výška) určuje koncentraci látky ve směsi (kvantitativní analýza) [29].

## 6 FALŠOVÁNÍ POTRAVIN

Slovo falzifikace pochází z latinského výrazu falzum, což lze přeložit do českého jazyka buď jako padělek, nebo jako podvrh, anebo jako napodobenina. Falzifikace, jinak falšování, je tedy česky padělání či napodobování [30].

Zákon o potravinách č. 110/1997 Sb., který nabyl účinnosti v září 1997, pojem "falšovaná potravin" či "falšování" přímo nedefinuje. § 10 tohoto zákona však uvádí, že do oběhu je zakázáno uvádět potraviny jiné než zdravotně nezávadné, klamavě označené, s prošlým datem použitelnosti a potraviny neznámého původu. Zákon se při použití termínu "klamavě označené" odkazuje na zákon č. 634/1992 Sb., o ochraně spotřebitele, v němž je definována podstata klamání (§ 8 odst. 1). Nikdo nesmí uvádět nepravdivé, nedoložené, neúplné, nepřesné, nejasné, dvojsmyslné nebo přehnané údaje anebo zamlčet údaje o skutečných vlastnostech výrobků nebo služeb či úrovni nákupních podmínek. Aby šlo o klamání, předpokládá se, že ten, kdo se takového jednání dopouští, si je vědom klamavého charakteru či nedostatečnosti informace poskytované spotřebiteli [30].

Z hlediska falšování patří mezi kritické komodity luxusní potraviny (lihoviny, víno, koření) a potraviny prodávané ve velkém množství (masné a mléčné výrobky, tuky a oleje, káva a kakao, ovocné šťávy, zmrzliny, vaječný koňak, vaječné těstoviny, koření, kečupy, džemy, oleje, med, ale také doplňky stravy, které se vydávají za léčivé přípravky). Mezi hlavní způsoby falšování patří náhrada nákladné suroviny za levnou, použití jiné než deklarované technologie, výrobek nemá předepsané složení, maskování nedodržení receptury, nesprávné uvedení místa původu (hlavně u vína) a zneužití známé značky [30].

### 6.1 Přibarvování poživatin

Přibarvování poživatin má své opodstatnění nejen z hlediska estetického. Důvodů pro přidávání barviv je více, např. znovu získat barevný vzhled potraviny, který se během výrobního procesu změnil, zajistit uniformitu výrobku ve všech šaržích, zvýšit spotřebitelskou atraktivnost výrobku, aj.

Pro přibarvování se používají přírodní i syntetická barviva. Přírodní barviva jsou nejčastěji rostlinného původu. Nejdůležitějšími skupinami rostlinných barviv jsou karotenoidy, flavonoidy, anthrachinony, betalainy a pyrrolová barviva. Rostlinné pigmenty se používají jako zdravotně nezávadná barviva nejen v potravinářství, ale i ve farmaceutickém průmyslu a kosmetice [31].

Syntetických barviv je produkován velký počet. Jde o barevné sloučeniny, které se syntetizují z velkého množství polotovarů, založených na produktech zpracování ropy a dehtu. Podle chemické povahy se člení na azobarviva, fenylmethanová barviva, nitrobarviva, pyrazonová, xanthenová, antrachinonová, chinolinová a indigoidní barviva.

Potravinářská barviva musí splňovat určité požadavky. Nesmí nepříznivě ovlivnit ostatní organoleptické vlastnosti přibarvené potraviny, zejména chuť a vůni. Musí mít vysokou barevnou mohutnost a být dobře rozpustná ve vodě. Nesmí docházet k interakcím s jinými složkami potravin. Barvivo musí být stálé vůči změnám pH, oxidačně redukčním vlivům, vůči světlu, teplu a u pevných potravin i vůči vlhkosti. V neposlední řadě musí být i ekonomicky dostupné a přijatelné [31].

## 6.2 Mléko

I mléko (kozí, ovčí) je jednou z potravin, která podléhá falzifikaci. Často bývá kravské mléko zaměňováno za kozí nebo ovčí, jelikož kravské mléko lze zakoupit v nižších cenových relacích [32].

## 6.3 Mléčné výrobky

Tradiční mléčné výrobky se vyrábějí z mléka a jakýkoliv nedeklarovaný přídavek nemléčných bílkovin je zakázán. Vzhledem k tomu, že se konzumace sóji považuje z výživového i zdravotního hlediska za prospěšnou, byla vyvinuta řada nových výrobků, do kterých se přidává sójová bílkovina. Sójové bílkoviny jsou ve srovnání s mléčnými bílkovinami podstatně levnější. Díky tomuto je použití sójové bílkoviny k náhradě mléčné bílkoviny velmi atraktivní z hlediska konečné ceny mléčných výrobků. Sója patří mezi alergenní přísady a její použití ve výrobcích musí být podle směrnice EU č. 2000/13/ES o značení potravin uvedeno na etiketě výrobku.

Stanovení sójové bílkoviny v mléčných výrobcích není jednoduché, zvláště tehdy, pokud jsou rostlinné bílkoviny použity v malých množstvích. Podmínky výroby potravin modifikují strukturu sójových bílkovin a to ztěžuje jejich stanovení.

Ke stanovení sójových bílkovin v mléčných výrobcích byly vyvinuty a používají se různé analytické metody: imunologické, elektroforetické a chromatografické. Ve Španělsku vyvinuli novou rychlou metodu stanovení přídavku sójových bílkovin do vybraných mléčných výrobků pomocí perfuzní chromatografie s reverzními fázemi [33].

## 6.4 Ovocné nápoje, džusy

Falšování tzv. 100% ovocných šťáv obecně zahrnuje přidavky vody, cukru, silic, kyselin, barviv a dalších levnějších surovin náhradou za dražší přírodní ovocnou šťávu. Je snaha tím zamaskovat nižší podíl ovocné složky. Falšování u této komodity zahrnuje také vydávání levnějších surovin za dražší z vyhlášených oblastí či vybraných odrůd.

Největší objem ovocných nápojů činí produkty z citrusů, zejména pomerančů. Proto také nejvíce případů falšování je spojeno s pomerančovými nápoji.

Při kontrolách se lze také setkat s pomerančovými šťávami, vyráběnými z koncentrátu, které byly více naředěny vodou. Také se však vyskytly pomerančové šťávy, u nichž došlo ke zjevnému falšování - byly nejen více naředěny vodou, ale také doplněny cukrem, kyselinami, barvivy a dalšími látkami s cílem zamaskovat nižší podíl ovocné složky [33].

## 6.5 Olivový olej

Se vzrůstající oblibou olivového oleje dochází stále častěji k jeho falšování. Britští výzkumníci vyvíjejí DNA techniku, která by byla vhodná pro použití v průmyslu a pro kontrolní orgány k detekování a kvantifikaci falšování olivového oleje olejem z lískových ořechů. Podobnost chemického složení těchto dvou olejů neumožňuje s dostatečnou přesností s pomocí analytických metod pro rostlinné oleje falšování olivového olej prokázat. CCFRA (Společnost pro výzkum potravin v Campden-Chorleywoodu) s podporou Úřadu pro potravinové standardy (FSA) proto zkoumala možnost použít pro detekci falšování metody DNA. Byla vypracována metoda DNA pro zjišťování nerafinovaného lískového oleje v panenském olivovém oleji, resp. rafinovaného lískového oleje v rafinovaném olivovém oleji. Poměrně jednoduchý systém využívá ke kvalitativnímu stanovení kapilární elektroforesu. Rovněž byl vypracován postup pro kvantitativní měření, kterým lze stanovit množství DNA lískových ořechů a potenciálně i množství lískového oleje přítomného ve vzorku olivového oleje [34].

## 7 DETEKCE REZIDUÍ ALERGENŮ VE ZPRACOVANÝCH POTRAVINÁCH

V posledním desetiletí dochází v rozvinutých průmyslových státech k nárůstu potravinových alergií se závažnými klinickými projevy. Tyto nejzávažnější reakce jsou v centru pozornosti nejen lékařů kliniků, ale také výzkumníků a odborníků, kteří se zaměřují na bezpečnost potravin produkovaných potravinářským průmyslem. Potvrzuje se, že zpracování potravin v potravinářském průmyslu, zavádění nových zpracovatelských technologií a způsob domácí přípravy pokrmu ovlivňuje alergenicitu potravin. Může jít o jeden z faktorů, který se podílí na nárůstu potravinových alergií [35].

Konkrétní příklady ukazují, že neexistuje žádné všeobecně platné pravidlo ovlivnění alergenicity pro jednotlivé zpracovatelské postupy, které by bylo možné vztáhnout na všechny druhy potravin. Vysoká teplota může vést v jednom případě ke ztrátě alergenicity, v druhém případě ke vzniku nových alergenů, tzv. neoalergenů. Stejně tak je pro alergenicitu důležité, jak jsou alergeny v potravine odolné vůči extrémnímu prostředí (pH, enzymy) v trávicím traktu [35].

### 7.1 Alergenicity a potravinové alergeny

Pojem "alergenicity" zahrnuje jednak schopnost určité potravin nebo složky potravin senzibilizovat jedince a jednak vyvolat alergickou odpověď u jedince již senzibilizovaného. Základní imunoreaktivní strukturou, která je schopna senzibilizace a následné provokace alergické reakce je alergen. Potravinové alergeny jsou většinou glykoproteiny s různými fyzikálně chemickými vlastnostmi. Teoreticky se každá bílkovina může stát alergenem. Ve skutečnosti se alergenicity jednotlivých bílkovin, potažmo potravin, velmi odlišuje. Je známo, že nejzávažnější alergické reakce jsou na potravinové alergeny s vysokou odolností vůči tepelnému zpracování, vůči enzymatické proteolýze a změnám pH, tedy vůči trávení. V úvahu je třeba vzít skutečnost, že každá potravina obsahuje více alergenů. Přitom jen málo potravin má v současné době definovanou skladbu alergenů, jejich strukturu a vlastnosti. Jedinec, který je alergický na danou potravinu, je většinou senzibilizován vůči více alergenům současně a spektrum zapojených alergenů se liší u jednotlivých jedinců či u určité definované populace alergické na danou potravinu (např. populace pylových alergií). Je však známo, že některé alergeny senzibilizují více než 50 % jedinců alergických na danou potravinu (jde o tzv. hlavní alergeny) a některé se uplatňují méně často [35].



## 7.2 Změna alergenicity při zpracování potravin

Potravinové alergeny mohou během tepelného i netepelného zpracování v potravinářském průmyslu, během skladování a během úpravy potravin doma podléhat změnám, které mohou vést ke změně alergenicity. Změna může být ve smyslu redukce alergenicity v důsledku inaktivace a destrukce alergenu nebo mohou ve zpracované potravíně vznikat nové alergeny. Neplatí žádná všeobecně platná pravidla pro všechny potraviny a pro určitý zpracovatelský postup. Tyto změny jsou velmi komplexní a nejsou snadno předvídatelné. Vliv technologií na odstranění nebo snížení množství alergenů je spojen s odstraněním či narušením aktivních míst alergenních proteinů, které se nazývají epitopy. Obecně lze využít tři základní postupy: odstranění epitopů (např. loupáním broskví se podstatně sníží obsah některých alergenů), narušení epitopů (např. tepelný záhřev nebo enzymatické štěpení vyvolá změnu epitopu tak, že se sníží alergenní potenciál) a konečně tzv. maskování epitopů (např. zablokování epitopů navázáním jiné látky) [35].

Pozornost se zaměřuje zvláště na potraviny, které se ukázaly nejrizikovější z pohledu alergenního potenciálu. Směrnice Evropské komise (2003/13/EC), která se týká označování potravin, zahrnuje seznam potravin, které nejčastěji senzibilizují a vyvolávají nejzávažnější alergické reakce. Přítomnost těchto potravin je nutné označit na obalu bez ohledu na jejich množství. Na seznamu jsou uvedeny vedle jediné přídatné látky (oxid siřičitý a siřičitany) tyto potraviny: obiloviny obsahující gluten, koryši, vejce, ryby, arašídů, sójové boby, mléko, ořechy, celer, hořčičná a sezamová semena [35].

### 7.2.1 Arašídů

Arašídů jsou v rozvinutých, průmyslových státech nejvýznamnějším rizikem pro potravinové alergie. Přecitlivělost na ně narůstá a jsou nejčastější příčinou úmrtí po požití alergickým jedincem [35].

Hlavní alergeny arašídů patří k zásobním proteinům semen, které se vyznačují odolností vůči tepelnému zpracování a vlivem tepelného podnětu nedochází k redukci jejich alergenicity. Navíc jde o alergeny odolné vůči enzymatické štěpení v trávicím traktu [35].

Výsledky studií s arašídů jsou v kontrastu s účinkem pražení na alergenitu lískového ořechu, kdy dochází k významné redukci alergenicity. Alergenita arašídů při pražení vzrůstá. Za tento jev je zodpovědný vznik neoalergenů při Maillardově reakci. Při pražení se také zvyšuje odolnost vůči degradaci trávicími enzymy. Zajímavé je, že tepelné působení při

nižších teplotách (100 °C, 120 °C) alergenicitu arašídů neovlivnilo. To zřejmě vysvětluje, proč výskyt alergie na arašídů závisí na dietních zvycích a na způsobu úpravy arašídů v různých oblastech. V oblastech, kde jsou arašídů velmi často v jídelníčku (Afrika), ale jsou upravovány vařením, není alergie na arašídů častá, na rozdíl od zemí západní Evropy a USA, kde se konzumují arašídů pražené [35].

### **7.2.1.1 Metody detekce alergenů v arašíděch**

Metody, které byly aplikovány v průběhu posledních let, dokáží detekovat alergenová rezidua v potravinách. Mezi tyto metody patří: radioalergen sorbentová inhibice (RAST), imunoforesa (RIE), enzymová metoda (ELISA) a polymerázová řetězová reakce (PCR).

a) imunoforesa (RIE) – imunoforesa byla využita např. pro zjištění arašídových proteinů ve vegetariánském sekaném mase. Detekční meze této metody byly přibližně 30 ppm. Po několika letech rozvíjení metody jsou detekční meze již 10 ppm. Metoda byla optimalizována pro detekci burských ořechů v čokoládě s dosažením výtěžku 85-100 %. S uspokojivými výsledky byla metoda aplikována již asi pro 20 druhů potravin. Jediná nevýhoda metody je, že množství séra, které se užívá v gelech, musí být optimalizované. Tato optimalizace se odvíjí od množství alergenu ve vzorku, což není předem nikdy známo. Byly provedeny analýzy 11 komerčně prodávaných čokolád, které neměly obsahovat žádné stopy ořechů. Avšak 4 z nich burské ořechy obsahovaly v množství 0,0006-1,5 %, což tato metoda bezpečně odhalila [32].

b) radioalergen sorbentová inhibice (RAST) – RAST byla poprvé využita pro zjištění přítomnosti arašídového másla ve slunečnici máselné. Arašídové máslo bylo detekováno v rozsahu 0,3-3,3 % (3 000-33 000 ppm) v šesti z osmi vzorků slunečnice máselné. Standardní protein byl extrahován ze syrových neosolených arašídů. Výtěžek této metody je 31-94 % a detekční meze jsou minimálně 10 ppm. Alergeny se mohou také objevit v rostlinném oleji, ve kterém se arašídů zpracovávají ke konzumaci. Tento aspekt nebyl doposud blíže studován [32].

c) IgE – imunoblotting – IgE – imunoblotting analyzuje proteiny z arašídů v potravinách. Jako standardy byly použity také pražené arašídů. Detekční meze metody jsou 50 ppm. Bylo zjištěno, že 19 z 46 komerčních potravinářských výrobků, které neměly obsahovat stopy arašídů, obsahovaly 0,05-1 % (500 ppm – 10 000 ppm). I tuto metodu je tedy možné použít v klinické a výzkumné analýze. Nevýhodou této metody je, že je potřeba specifické sérum člověka, který je alergický na arašídů. Lidské sérum vyžaduje citlivou manipulaci,

aby se předešlo vniknutí séra do prostředí potravinářského průmyslu. Jelikož intenzita alergie u jednotlivých zkoumaných jedinců se značně mění s časem, stává se normalizace metody velmi obtížnou [32].

d) ELISA – při metodě ELISA se využívá monoklonálních protilátek oproti analyzovaným proteinům v arašidech. Jako detektor byla využita protilátka z králíčího těla. Králíčí protilátka byla vystavena extraktu z pražených burských ořechů. Metoda detekovala asi 40 ppm ořechů. Metodou ELISA byla analyzována také vanilková zmrzlina, která byla posypána nasucho praženými arašídovými ořechy v množství od 0,01 % do 5,0 %. U 6/7 pacientů se projevila alergická reakce na pokožce. Vzorky byly také analyzovány metodou RAST použitím lidského séra alergických jedinců. Výsledky byly obdobné.

Také talíř, který byl pokryt ořechy, byl analyzován metodou ELISA a bylo zjištěno, že stopy burských ořechů zůstávají na talíři po dobu i 24 měsíců.

Metoda byla vyvinuta především pro cukrovinkové produkty a některé druhy potravinových přísad, kromě koření.

Přestože existuje několik metod pro identifikaci alergenů v arašidech, je potřeba ucelené metody, jelikož existuje spousta druhů arašídů a velká různorodost zpracování vzorků [32].

### 7.2.2 Kravské mléko, mléčné výrobky, vejce

Kravské mléko je příčinou potravinových alergií vázaných zvláště pro dětský věk. Hlavními alergeny kravského mléka jsou kaseiny obsažené v mléčné sraženině a  $\alpha$ -laktalbumin a  $\beta$ -laktoglobulin obsažené v syrovátce. Další alergeny, které se uplatňují méně často, jsou alergeny syrovátky: imunoglobuliny a bovinní sérový albumin. U 82 % jedinců alergických na kravské mléko byla zjištěna přecitlivělost na  $\beta$ -laktoglobulin, u 43 % na  $\alpha$ -laktalbumin a u 18 % na bovinní sérový albumin. Tak jako u jiných potravin platí i u jedinců alergických na kravské mléko, že jsou většinou přecitlivělí na několik alergenů současně. Odolný vůči tepelnému působení je  $\alpha$ -laktalbumin a kasein,  $\beta$ -laktoglobulin a sérový albumin patří k termolabilním alergenům [35].

Alergeny kravského mléka se liší také citlivostí vůči trávicím proteolytickým enzymům. V laboratorních pokusech byla prokázána vysoká stabilita  $\beta$ -laktoglobulinu vůči působení pepsinu při pH 1,2 (napodobuje prostředí v žaludku) v kontrastu s kaseiny, které byly kompletně hydrolyzovány po 2 minutách a  $\alpha$ -laktalbuminem, který byl degradován po 30 sekundách. Sérový albumin je tepelně labilní, ale odolný vůči enzymům [35].

Při výrobě sýrů se uplatňuje řada výrobních postupů, které mohou vyvolat změnu proteinů, navíc dochází k oddělení syrovátkové frakce. Alergenní potenciál sýrů nebyl přesněji zhodnocen, ale je známo, že řada jedinců alergických na kravské mléko má alergickou reakci i po požití sýrů.

Jsou hlášeny alergické reakce na řadu pekařských výrobků, čokoládu, uzeninu, do kterých byla přidána mléčná bílkovina. I zde zůstala zachována alergenita, přestože bílkoviny prošly různými zpracovatelskými technikami [35].

K významným zdrojům alergenů patří vejce. Vaječný bílek má silnější alergizující účinek než vaječný žloutek. Hlavními alergeny vaječného bílku jsou ovomukoid, který je relativně rezistentní vůči teplu a trávicím enzymům a ovalbumin, ovotransferin a lysozym, které jsou relativně citlivé vůči těmto vlivům. Vzhledem k tomu, že dominantním alergenem u jedinců alergických na vejce je termostabilní ovomukoid, většina alergických jedinců reaguje i na tepelně upravené vejce [35].

Množství alergenů v mléku či vejcích, které mohou vyvolat alergickou reakci, není doposud známo, protože je závislé na citlivosti pacientů a specifiku alergenu. Potravinové přísady mohou být nepříznivě obohaceny o alergeny z důvodu daného výrobního postupu a technologie zpracování. Tepelné zpracování může snížit, ale také zvýšit množství alergenů v potravine. Proto identifikační technologie pro určení alergenu by měly být 1-10 ppm, to je 1-10 mg/kg. Nejvíce komerčně využívané metody detekce zahrnují tyto limity detekce. Metody detekce musí být rychlé, citlivé a ekonomické a musí zajišťovat ochranu alergických spotřebitelů a kvalitu potravin [36].

#### **7.2.2.1 Metody detekce alergenů v kravském mléce, mléčných výrobcích, vejci**

Následující identifikační metody jsou zpravidla použitelné pro detekci alergenů v kravském mléce, mléčných výrobcích i vejci.

a) Difúzní gelové metody – difúzní gelové metody jsou levné a snadno proveditelné, ale nejsou příliš citlivé, zvláště v tepelně zpracovaných potravinářských výrobcích, proto jsou tyto metody nahrazeny imunoenzymatickými metodami (např. RIE). Výsledky prokázaly, že vaječný albumin a ovomukoid jsou silné alergeny, konalbumin (ovotransferin) střední alergen, zatímco lysozym velmi slabý alergen [32].

Kvalita detekce se odvíjí od alergenu, ale výsledky jsou vždy v mg na 100 g potravinového vzorku. Tato detekce není obecně moc citlivá, ale limity detekce pro rezidua jsou

1-10 ppm. RIE metoda je časově náročná a vyžaduje specializované pracovníky, ELISA je více použitelná pro potravinářský průmysl než RIE nebo CRIE [32].

b) RAST a EAST inhibice - RAST a EAST inhibice jsou založené na navázání specifického IgE na nepohyblivou molekulu alergenu. Jsou využívány pro detekci vaječných a mléčných alergenů. Detekční mez pro  $\alpha$ -laktoalbuminy je 1 ppm. Tyto metody jsou vhodnější pro klinické lékařství než pro potravinářský průmysl.

Metody RAST a EAST jsou využívány ke kvantitativnímu stanovení alergenu z extraktu. Jestliže se stanovuje aktivita diagnostikovaného alergenu z extraktu, citlivé leukocyty nebo žírné buňky odrážejí přítomnost molekuly alergenu buněčnou změnou a nakonec granulací. Granulace je kvantifikovaná měřením biogenních aminů (histaminu, serotoninu) nebo enzymů uvolněnými buňkami. V dnešní době, je použití lidských bazofilních leukocytů nebo žírných buněk omezena jen pro diagnostické nebo výzkumné účely [32].

c) Bodová kapková metoda - bodová kapková metoda detekuje vaječné a mléčné proteiny v tepelně zpracovaných masitých produktech [32].

d) Elektroforetické metody - principem elektroforetických metod je pohyb vzorku v elektrickém poli a následná imunodetekce použitím alergického lidského séra nebo živočišné protilátky. Tyto metody jsou schopny oddělit a detekovat proteiny v syrových nebo mírně vařených potravinářských produktech, ale jejich použití není dost účinné pro vařené nebo sterilizované produkty, protože denaturace a shlukování molekul ruší stanovení [32].

e) ELISA - ELISA je metoda pro detekci mléčných proteinů i žloutkových proteinů. Specifická protilátka je IgG. Dostupně ELISA metody jsou obecně založené na detekci kaseinu a  $\alpha$ -laktoglobulinů, zatímco komerční ELISA metody jsou založené na detekci vaječného albuminu a ovomukoidu.

Podmínky detekce zpracovaných potravinářských produktů závisí na různých parametrech: obsah tuků, intenzita tepelného zpracování, původ proteinů atd. Proto jsou limity detekce odlišné podle typu vzorku. Metoda ELISA je kvantitativní metoda [32].

f) DNA metody - i DNA metody, kam můžeme zařadit polymerázovou řetězovou reakci, mohou odhalit potravinové alergeny. Ale v praxi se moc nevyužívá pro detekci vaječných nebo mléčných alergenů, mohly by dát falešné pozitivní odpovědi [32].

Komerční kvantitativní testy, které jsou již na trhu, jsou více časově náročné než jakostní metody. Tyto testy se používají zvláště pro ochranu alergického spotřebitele. Nevýhodou je méně citlivé stanovení v důsledku denaturace či shlukování proteinů vlivem technologického zpracování a dalších vlivů (lipidy, Maillardovy reakce, atd.).

Poslední vývoj slibuje technologii pro rychlou a multiparametrickou analýzu pro detekci alergenů v potravinových výrobcích [32].

### 7.2.3 Další významné potravinové alergen

Mezi další významné potravinové alergen, které mohou působit negativně na citlivé jedince patří: ořechy (lískové, vlašské), sója, celer, obilí, maso, ryby a ostatní vodní živočichové [35].

## 7.3 Problematika alergenů v České republice

Již od roku 1998 platí v České republice pro výrobce povinnost zavést a udržovat systém HACCP. Požadavky na tento systém se během té doby změnily jen mírně. Díky národním vyhláškám a Evropským nařízením byla postupně působnost systému rozšířena na všechny provozovatele potravinářských podniků, tedy včetně distributorů, prodejců nebo provozoven veřejného stravování [37].

V souvislosti s novými předpisy, které se dotýkají označování alergenů v potravinách se stává standardem všech provozovatelů potravinářských podniků žádat po svých dodavatelích prohlášení, že jejich výrobky neobsahují některé alergen. Vzhledem k tomu, že obsah alergenů je v současné době považován za významné chemické nebezpečí, doporučuje se prohlášení o obsahu alergenů nebrat lehkovážně. V Evropě již proběhly první kauzy v souvislosti s přítomností alergenů bílkovin v potravinách, které způsobily konzumentům tzv. anafylaktický šok [37].

Vstupem do Evropské unie se pro výrobce potravin v České republice stalo závazným nařízením EK 178/2002, které s účinností od ledna 2005 v článku 18 definuje požadavky na sledovatelnost potravin. Stejně tak i normy GFSI a ISO 22 000 požadují po potravinářských podnicích, aby zavedly systém sledovatelnosti. Rozsah požadavků legislativy a norem se liší a to nejen ve formální rovině, ale i ve svých důsledcích [37].

## ZÁVĚR

Kvalita potravin je pro spotřebitele velmi významná, především z hlediska jeho bezpečnosti a ochrany zdraví. Proto výrobci potravin, vědci či potravinoví odborníci analyzují potraviny, aby odhalili přítomné alergenů, popřípadě aby alergiím předcházeli. Mezi nejvýznamnější alergenů patří mléko, vejce, ořechy, ryby, obiloviny obsahující gluten.

S kvalitou potravin je spjata i jejich falzifikace. Z hlediska falšování patří mezi kritické komodity luxusní potraviny (lihoviny, víno, koření) a potraviny prodávané ve velkém množství (masné a mléčné výrobky, tuky a oleje, vaječné těstoviny, koření, kečupy, ale také doplňky stravy, které se vydávají za léčivé přípravky). Potraviny jsou falzifikovány levnějšími nebo lépe dostupnými surovinami, čímž je klamán spotřebitel nejen z hlediska složení potravin, ale ve svém důsledku i v jejich ceně.

Nepovolené potravinové přísady či alergenů se analyzují metodami na různých principech (imunochemické, analytické, chromatografické, imunoforetické), přičemž v současnosti se nejvíce rozvíjí a uplatňují DNA metody. Ale ani DNA metody nebudou konečným článkem. S výskytem nových typů alergií a vynalézavostí výrobců, kteří se snaží vyrábět své výrobky s co nejnižšími náklady s využitím falzifikace potravin, budou se rozvíjet i metody detekce tak, aby byl spotřebitel maximálně chráněn.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] Laboratoře imunodiagnostiky, biochemie a molekulární biologie, Molekulární biologie - úvod do metod molekulární biologie [online]. [cit. 2006-08-12]. Dostupný z WWW: <http://www.imalab.cz/ilClankyList.aspx?intRubrKis=447>
- [2] EU organizace da Vinci Youth Fram: Kvalita a nezávadnost potravinářských a zemědělských produktů [online]. [cit. 2006-10-10]. Dostupný z WWW: [http://www.ibr.si/javno/youth\\_farm/cz/quality-food.html](http://www.ibr.si/javno/youth_farm/cz/quality-food.html)
- [3] PETR, J., HÚSKA, J., Speciální produkce rostlinná I, učební text, agronomická fakulta, ČZU v Praze, Praha 1997.
- [4] ZÁKON č. 110/1997 Sb., O potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, ze dne 24. dubna 1997.
- [5] Informační centrum bezpečnosti potravin ÚZPI, Systém zajištění bezpečnosti (zdravotní nezávadnosti) potravin v ČR [online]. [cit. 2006-08-15]. Dostupný z WWW: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/default.asp?ch=66&typ=5>
- [6] PETR, J., DLOUHÝ, J., Ekologické zemědělství, vydavatelství Brázda, 1992.
- [7] Institut informačního designu, Mezinárodní grafická komunikace – symboly pro identifikaci kvality potravin [online]. [cit. 2006-08-15]. Dostupný z WWW: [http://www.institut-informacniho-designu.cz/mez-graf-komunikace/cz/symboly-pro-identifikaci\\_kvalit\\_potravin.html](http://www.institut-informacniho-designu.cz/mez-graf-komunikace/cz/symboly-pro-identifikaci_kvalit_potravin.html)
- [8] Ministerstvo zemědělství ČR, Nezávadné a kvalitní potravin [online]. [cit. 2007-04-13]. Dostupný z WWW: <http://www.businessinfo.cz/cz/clanek/kvalita-jakost/nezavadne-a-kvalitnipotravin/1000513/10380/>



- [9] ŠIMÍČEK, M., Molekulární metody, 3'POL, leden 2005, s. 12-13.
- [10] HOUF, K., VANDAMME, P., Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and identification of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowli*, FEMS Microbiology, Letters, 2000, s. 89- 94.
- [11] SCHWAGELE, F., Polymerase Chain Reaction – PCR – Möglichkeiten und Grenzen der Anwendung in der Lebensmittelanalytik, Roche magazine, 40, Mitteilungsblatt der BAFF, 1998.
- [12] ROSYPAL, S., Úvod do molekulární biologie, I. díl, Brno, 1996.
- [13] CHARGAFF, E., DAVIDSON, J. N., The Nucleic Acids, Chemistry and Biology, Academic Press, New York, 1995 (2. svazek).
- [14] Real-time RT PCR (kvantitativní PCR v reálném čase) [online]. [cit. 2006-12-11]. Dostupný z WWW: <http://www.lem-olomouc.cz/real-time.htm>
- [15] GRIFFITHS, A. J. F., MILLER, J. H., SUZUKI, D. T., LEWONTIN, R. C., GELBART, W. M., An introduction to genetic analysis, W. H. Freeman and Company, USA, 1996 (6. vydání).
- [16] ROSYPAL, S., Úvod do molekulární biologie III, Brno, 1997, s.746.
- [17] OLD, R. W., PRIMROSE, S. B., Principles of gene manipulation, Blackwell Science, Oxford, 1994 (5. vydání).
- [18] Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, PCR – polymerázová řetězová reakce [online]. [cit. 2006-09-10]. Dostupný z WWW: <http://www.zuova.cz/informace/nrlpab07.php>

- [19] Wikipedia otevřená encyklopedie, Genetická daktyloskopie – RFLP [online]. [cit. 2007-01-31]. Dostupný z WWW:  
[http://cs.wikipedia.org/wiki/Genetick%C3%A1\\_daktyloskopie](http://cs.wikipedia.org/wiki/Genetick%C3%A1_daktyloskopie)
- [20] CEP Chromosome Enumeration DNA Fish Probe, Application Manual, Vysis, 2001.
- [21] MITELMEN, F., KERGER, S., An International System For Human Cytogenetic Nomenclature, Besel, 1995.
- [22] ČIŽMÁR, D.: NIR, K analýze obilovin a pícein, Národní referenční laboratoř, časopis Zemědělec, 1998.
- [23] Biopro O. K. Servis, NIR spektrometrie [online]. [cit. 2007-12-01]. Dostupný z WWW:  
<http://www.biopro.cz/pristroje/podlepouziti/nirspektroskopie?MySorceSessio=f14a7bc647304b6096294480d58ea20>
- [24] ZAJONCOVÁ, L., Imunochemické metody [online]. [cit. 2007-12-03]. Dostupný z WWW: [http://www.biochemie.upol.cz/stranky/vyuka/bc/IMUNOCHEMICKÉ METODY.pdf](http://www.biochemie.upol.cz/stranky/vyuka/bc/IMUNOCHEMICKÉ_METODY.pdf)
- [25] ČECHOVÁ, L., Ekofyziologie borrelií, Dizertační práce, Masarykova univerzita, Brno, 2004.
- [26] GARFINKEL, M. D., RUDEN, D. M., Chromatin effects in nutrition cancer, and obesity, Nutrition 20, 2004, s. 56-62.
- [27] VÁVROVÁ, J., Gelová permeační chromatografie (GPC) [online]. [cit. 2006-10-06]. Dostupný z WWW:  
<http://ciselniky.dasta.inzer.cz/hypertext/200610/hypertext/AJAZG26.htm>

- [28] ŘEZANKA, P., Hmotnostní spektrometrie [online]. [cit. 2006-10-07]. Dostupný z WWW:  
<http://www.chemweb.estranky.cz/clanky/ksicht---serial/hmotnostni-spektrometrie-ms>
- [29] COUFAL, P., Kapalinová chromatografie – HPLC [online]. [cit. 2007-05-04]. Dostupný z WWW:  
[http://www.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy\\_B/chromatografie.doc](http://www.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc)
- [30] KOLEJKOVÁ, D., Státní zemědělská a potravinářská inspekce – falšování potravin a jeho prokazování [online]. [cit. 2006-08-18]. Dostupný z WWW:  
<http://www.szpi.gov.cz/cze/tisk/article.asp?id=56215&cat=2162&ts4ec32>
- [31] OLDŘIHOVÁ, T., Přibarvování poživatin, Chemické Listy, 95, č. 3, 2001, s. 163-168.
- [32] KOPPELMAN, S. J., HEFLE, S. L., Detecting allergens in food, Cambridge, England, 2006, s. 185-329.
- [33] Quality of food, Food Australia, 54, č. 11, 2002, s. 474.
- [34] Kvalita olivového oleje z ekologického a konvenčního zemědělství, Food Additives & Contaminants, 23, č. 4, 2006, s. 339-347.
- [35] OSTRÝ, V., JECHOVÁ, M. a kolektiv, Vliv zpracování potraviny na alergenicitu, Státní zdravotní ústav, Brno, 2004, s. 1-17.
- [36] COOKE, S. A., SAMPSON, H. A., Allergenic Properties of Ovomuroid in Man, Journal of Immunology, 159, 1997, s. 2026-2032.
- [37] VOLDŘICH, M., QS FOOD, poradenství v potravinářském průmyslu [online]. [cit. 2006-08-18]. Dostupný z WWW: <http://www.qsfood.cz/sledovatelnost.htm>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

PCR	polymerázová řetězová reakce
ISO	International Organisation for Standardisation
DNA	deoxyribonukleová kyselina
mDNA	mitochondriální deoxyribonukleová kyselina
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
LA PCR	Long PCR
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
HACCP	systém kontrolních kritických bodů

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1 Zjednodušené schéma dvoušroubovicové DNA .....	17
Obr. 2 Párování N-bází adenin a thymin pomocí 2 vodíkových můstků .....	18
Obr. 3 Párování N-bází guanin a cytosin pomocí 3 vodíkových můstků .....	19
Obr. 4 Schéma replikace DNA.....	20
Obr. 5 Tři stupně PCR.....	22
Obr. 6 Princip reakce AS-PCR.....	26
Obr. 7 Průběh Sandwich ELISA, kompetitivní ELISA, nekompetitivní ELISA .....	32
Obr. 8 Schéma současné analýzy proteinů .....	33
Obr. 9 Kalibrační závislost log molekulové hmotnosti proteinu na jeho relativní mobilitě ...	35















**SEZNAM TABULEK**

Tab. 1 Dusíkaté organické báze adenin a cytosin.....	18
Tab. 2 Dusíkaté organické báze guanin a thymin.....	19













## **SEZNAM PŘÍLOH**

Příloha I Symboly pro identifikaci kvality potravin

## PŘÍLOHA I: SYMBOLY PRO IDENTIFIKACI KVALITY POTRAVIN

	FOOD <b>potravina (obecně)</b> hrnec na vaření, PT 1
	FOOD CHEMICAL CONSERVED <b>potravina konzervovaná chemicky</b> baňka používaná v laboratořích, PT 2
	FOOD FROZEN <b>potravina konzervovaná mražením</b> sněhová vločka, PT 3
	FOOD DRIED <b>potravina konzervovaná sušením</b> šípky naznačující proud vzduchu, PT 4
	FOOD IN VACUUM CONSERVED <b>potravina konzervovaná vakuově</b> chem. značka kyslíku se šípkou směřující z nádoby, PT 5
	FOOD PASTEURIZED <b>potravina konzervovaná pasterizací</b> plamen pod nádobou s označením teploty pasterizace, PT 6
	FOOD STERILIZED <b>potravina konzervovaná sterilizací</b> plamen pod nádobou s označením teploty sterilizace, PT 7
	FOOD CONSERVED THROUGH HIGH TEMPERATURE <b>potravina konzervovaná vysokým zahřátím</b> plamen pod nádobou s označením teploty zahřátí, PT 8
	FOOD CONSERVED WITH RADIATION <b>potravina konzervovaná ozářením</b> šípky naznačující paprsky prostupující potravinou, PT 9
	FOOD CONSERVED WITH SUGAR <b>potravina konzervovaná (ochucená) cukrem</b> kostky cukru, PT 10
	FOOD CONSERVED WITH ARTIFICIAL SWEETING <b>potravina obsahující náhradní sladidlo</b> zaoblené kostky cukru, PT 11
	FOOD WITHOUT SUGAR <b>potravina bez cukru</b> kostky cukru, dvojitý škrť, PT 12
	FOOD WITH LOWER CONTENT OF SUGAR <b>potravina se sníženým obsahem cukru</b> kostky cukru, přes jednu dvojitý škrť, PT 13
	FOOD CONSERVED WITH SALT <b>potravina konzervovaná (ochucená) kuchyňskou solí</b> krystalky soli, PT 14



	FOOD WITHOUT SALT <b>potravina bez kuchyňské soli</b> krystalky soli, dvojitý škrť, PT 15
	FOOD ARTIFICIAL COLORED <b>potravina uměle přibarvená</b> baňka používaná v laboratoři se spektrem barev, PT 16
	FOOD WITH SERTIFICIAL AROMA <b>potravina uměle aromatizovaná</b> baňka používaná v laboratoři s dýmem u hrdla, PT 17
	FOOD CONTAINED COFEIN <b>potravina obsahující kofein</b> zrnko kávy, PT 18
	FOOD CONTAINED ALCOHOL <b>potravina obsahující alkohol</b> písmeno "A", PT 19
	FOOD OF ANIMAL ORIGIN <b>potravina živočišného původu</b> býčí hlava, PT 20
	FOOD OF PLANT ORIGIN <b>potravina rostlinného původu</b> srdčitý list rostliny, PT 21
	FOOD OF COMPLEX RAW MATERIAL (whole grain) <b>potravina z komplexní suroviny (celozrnná apod.)</b> kulaté semeno s dvěma obaly, PT 22
	FOOD HYGIENIC PACKED <b>potravina hygienicky balená</b> hrnec na vaření s dvojitým obrysem, PT 23
	FOOD NECESSARY TO WASH ! <b>potravinu nutno omýt !</b> vodní kapka padající do hrnce, příkazová tabulka, PT 24
	FOOD NECESSARY TO WORM ! <b>potravinu nutno prohřát !</b> požadovaná teplota prohřátí, příkazová tabulka, PT 25
	FOOD NECESSARY TO COOK ! <b>potravinu nutno vařit</b> teplotní údaj 100, hladina vody, příkazová tabulka, PT 26