

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Univerzitetni študijski program Biokemija
4. letnik

Kemija in biokemija živil

– vaje –

2. del: Biokemijska in molekularno-biološka analiza živil

študijsko leto 2008/2009



doc. dr. Marko Dolinar

To so navodila za izvedbo drugega dela vaj pri predmetu Kemija in biokemija živil za študente biokemije.

Ver. 1.6 (marec 2009).

Za optimiziran postopek vaje "Določanje vsebnosti gensko spremenjenih živil" se zahvaljujem doc. dr. Kristini Gruden z Nacionalnega inštituta za biologijo.

Navodila za vajo "Preverjanje vrstne sestave mesnih izdelkov" je pripravila dr. Vera Župunski, ki je tudi optimizirala postopek.

UVOD

Živila so pomemben del življenja vsakega posameznika. Pogosto predstavljajo tudi kulturno značilnost naroda. Od tega, kaj jemo in pijemo, je odvisno, kako se bomo počutili, kako zdravi bomo, celo ali bomo doživeli visoko starost ali ne. Kakovostna živila so torej eden od pogojev zdravega življenja, skrb za kvaliteto živil pa bi morala biti pomemben element zdravstvene in kmetijske politike vsake družbe.

Biokemijska analiza omogoča vpogled v nekatere bistvene značilnosti živil in se enakovredno dopolnjuje z osnovnimi kemijskimi in fizikalnimi metodami. Spada med objektivne analize (za razliko od določanja organoleptičnih lastnosti, ki so subjektivne narave, čeprav skušajo biti po metodološki plati standardizirane in objektivne) in daje nedvoumne odgovore.

Zaradi pomena posameznih živil za naše življenje so v preteklem stoletju razvili standarde za preizkušanje njihovih lastnosti. Testiranja opravljajo proizvajalci in predelovalci, pa tudi nadzorni organi, ki preverjajo, če kakovost izdelkov ustreza pravilnikom. Tudi v Sloveniji obstajajo natančni pravilniki o kakovosti živil in o preverjanju kakovosti. Postopki so pogosto preprosti in uporabljajo stare in preverjene tehnike, ki so za osnovne analize dovolj dobri. Ob teh pa je treba omeniti nekatere nove metode, ki so metodološko bolj zahtevne in še niso v celoti standardizirane s pravilniki. Obstajajo pa akreditirani laboratoriji, ki delujejo v skladu z evropskimi standardi in omogočajo izvedbo najzahtevnejših biokemijskih in molekularno-bioloških analiz tudi pri nas.

Vaje iz kemije in biokemije živil so razdeljene na dva dela. Ta navodila se nanašajo samo na del, ki se tiče analize biokemijskih molekul, predvsem proteinov in DNA in obsega skupaj 27 ur laboratorijskega dela. Praktično bomo obdelali 4 teme, 5. temo pa bomo obravnavali teoretično (tako kot tudi kratko poglavje o metodah za določanje prisotnosti mikroorganizmov v živilih):

1. Določanje deleža koruzne moke v pšenični moki
2. Kontrola pasterizacije mleka preko določanja encimske aktivnosti
3. Določanje sestave mletlega mesa na osnovi analize izolirane DNA
4. Določanje prisotnosti transgenske soje v sojinem mleku
5. Test genotoksičnosti različnih živil

Vaje bodo letos tekale petič in marsikaj smo glede na prva leta že izboljšali, vseeno pa je mogoče, da bi kakšen postopek za delo v skupini študentov še bilo mogoče izpopolniti. Postopki so prirejani iz različnih virov in so v nadaljevanju natančno opisani. Dve vaji sta pripravljene na osnovi pravilnikov, ki veljajo v Sloveniji in jih morajo ustrezni laboratoriji opravljati na točno tak način, kot je opisano tu. Če vseeno pogrešate kakšen podatek, potreben za izvedbo vaj ali za razumevanje teoretičnega ozadja vaje, mi sporočite. S tem boste pomagali sebi in naslednjim generacijam, ki bodo dobile v roke izpopolnjena navodila.

Tako kot pri vsakih vajah, pri delu z biološkimi molekulami pa morda še bolj, je za uspeh postopka nujno, da natančno sledite opisanim protokolom, precizno pipetirate in upoštevate navedene inkubacijske čase.

Želim vam uspešno delo na vajah in pri pripravah na kolokvij iz tega predmeta!

Marko Dolinar

Seznam vaj in razpredelnica izvajanja vaj po datumih:

1. vaja: Določanje deleža koruzne moke v pšenični moki	str. 7
2. vaja: Kontrola pasterizacije mleka s pomočjo določanja encimske aktivnosti	str. 14
3. vaja: Določanje vrstne sestave mešanega mesa	str. 19
4. vaja: Določanje prisotnosti gensko spremenjenih organizmov v hrani	str. 22
5. vaja: Test genotoksičnosti različnih živil	str. 27
6. vaja: Imunološko določanje patogenih mikroorganizmov v hrani	str. 32
Dodatek	str. 34

termin	1. vaja	2. vaja	3. vaja	4. vaja	5. vaja	6. vaja
12.5.	3 testi					teorija
19.5.			izolacija DNA in PCR		interpretacijska vaja (stari rezultati)	
26.5.			AGE & interpret.	izolacija DNA - 1. del		
28.5.		2 testa		nadalj., kvantif. & PCR		
tehnik				elektroforeza		

Kontaktne naslovi:

obvestila in slike elektroforeznih analiz bodo na naslovu:

http://openwetware.org/wiki/FCCT_Biochemistry_Lab:Courses:Biokemija-zivil-vaje

docentov e-naslov: Marko.Dolinar@fkkt.uni-lj.si

tel.: 01/241 9480

tehnikov e-naslov: Matjaz.Malavasic@fkkt.uni-lj.si

tel. 01/241 9486

1. vaja: Določanje deleža koruzne moke v pšenični moki

Na svetovnem trgu je cena koruze ves čas nekoliko nižja od cene pšenice. Veliki mlinarski obrati bi lahko dosegli znatno finančno prednost, če bi med pšenično moko vmešali tudi nekaj koruzne. Razen tega bi koruzno moko lahko dodajali moki, namenjeni za peko žitnih izdelkov, saj bi bili izdelki iz take moke bolj rumeni ob enaki porabi jajc za pripravo testa. Posebne vrste kruha so pravzaprav pogosto pripravljene iz mešanice dveh ali več mok, čeprav to ni vedno razvidno iz deklaracije.

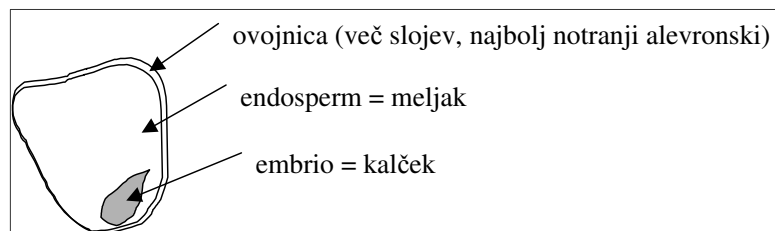
Metoda za določanje prisotnosti koruzne moke v pšenični je standardizirana in je bila objavljena kot priloga 4 k Pravilniku o metodah in postopkih ugotavljanja skladnosti kmetijskih pridelkov oziroma živil (Ur. list RS 84/2003: <http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlid=200384&stevilka=3999>) pod naslovom "Metode vzorčenja ter fizikalno-kemijske analize žit, mlevskih in pekovskih izdelkov, testenin in hitro zamrznjenega testa" (http://www.uradni-list.si/files/RS_-2003-084-03999-OB~P004-0000.PDF).

V točki 2.2.23 omenjene priloge je naveden postopek, ki ga bomo uporabili tudi pri vaji. Je preprost in sorazmerno zanesljiv, določanje prisotnosti koruze pa temelji na fotometrični analizi zeina z biuretno reakcijo. Glede na objavljeni postopek bomo vajo izvedli s polovičnimi količinami materiala.

Biuretno reakcijo uporabljamo za splošno dokazovanje prisotnosti proteinov v vzorcih. V alkalnem se proteini z bakrovim sulfatom obarvajo vijolično, intenziteta barve pa je sorazmerna s količino proteinov v vzorcu. Če hočemo določiti samo en protein v vzorcu (kot na primer zein iz koruze), moramo pripraviti ekstrakt tako, da ne bo vseboval drugih proteinov, ki bi predstavljali ozadje. V našem primeru lahko zein ločimo od ostalih žitnih proteinov tako, da izvedemo ekstrakcijo z vročim amilalkoholom, v katerem je zein topen, ostali proteini pa ne. Zein je beljakovina, značilna za koruzo in je v pšenici ni.

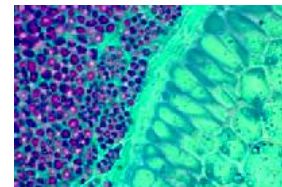
Žitna zrna

Zrna so rastlinska semena, ki jih sestavlja ovojnica, embrio (zasnova kalčka) in endosperm – slednji predstavlja pri žitih 85 % teže zrna, v njem pa je na primer pri pšenici ~55 % škroba in ~10 % proteinov.



Prerez dela koruznega zrna: levo endosperm s škrobnimi zrci (vijolično), desno celice kalčka (zeleno), ki vsebujejo večino zaloga maščob v zrnju, medtem ko je proteinov malo, škroba pa tu skoraj ni.

(<http://distans.livstek.lth.se:2080/microscopy/f-visit.htm>)



Proteini v žitu

V zrnih žit je proteinov precej: 10 – 15 % suhe teže zrn (v listih npr. 3-5 %). V rastlinskih tkivih, kjer je proteinov več kot ~5 %, predpostavljamo, da so proteini prisotni kot rezervna snov, predvsem kot vir dušika v rastnih razmerah, ko bi ga bilo v okolju na voljo premalo. V zrnih so rezervni proteini shranjeni kot vir dušika za čas kaljenja. Taki proteini so encimsko neaktivni in so v celicah prisotni

pretežno v obliki agregatov znotraj veziklov (proteinska telesca, alevronska zrnca). Žitni proteini so pogosto neenotni po sestavi in večinoma vsebujejo po več polipeptidnih verig. Pri koruzi je približno polovica vseh proteinov v zrnu netopnih v vodi. Na splošno lahko žitne proteine delimo na prolamine in gluteline.

Žitna moka

Moka predstavlja zmlete endosperme žitnih zrn. Semena so morali pred tem oluščiti (iz lusk so pripravili otrobe) in izločiti kalčke. Endosperm prekriva alevronska plast, ki vsebuje več maščob, pa tudi nekaj proteinov. Pri fino mletih mokah alevronsko plast odstranijo.

Pri pšenici je med proteini približno pol prolaminov (prevladuje gliadin) in pol glutelinov (glutenin). Ob prisotnosti vode in mesenju nastaja gosta elastična plastična snov, imenovana gluten, ki z vpijanem vode naraste do 200 % suhega volumna. Koruzna moka ni primerna za mesenje vzhajanege testa, ker sestava proteinov ne omogoča nastanka klasičnega glutena. Zato koruzni kruh vsebuje samo 30 % koruzne moke, ostalo pa je pšenična moka. Včasih dodajajo pri pripravi pšeničnega kruha malo koruznega zdroba, ker s tem dobijo bolj hrustljivo in okusno skorjo.

Zein

Zein je protein v endospermu koruznih zrn, za katerega je značilno, da nima aminokislin lizina in triptofana. V vodi je netopen, prav tako v etanolu, se pa topi v mešanici alkohola in vode [*povzeto po: Igoe, Robert S. 1983. Dictionary of Food Ingredients. Van Nostrand and Reinhold Company*]. Sestavlja ga morda celo 40 različnih polipeptidnih verig, od tega je 7-10 pogostih. Od vseh proteinov v koruznih zrnih je zeina 50 %. Večinski polipeptid ima $M \sim 35$ kDa. Zein predstavlja koruzni analog gliadina (je torej prolamin). V industriji ga uporabljajo za razne premaze, tudi pri proizvodnji filmov.

Analize žit in žitnih izdelkov

Po slovenskih predpisih pri analizi žit in mlevskih izdelkov lahko kontroliramo lastnosti žit in moke po 28 natančno opisanih postopkih. Pogostost vzorčenja, načini jemanja vzorca in postopki sami so zelo natančno določeni. Nekatere analize metode so zelo preproste, za druge pa je potrebno delo v dobro opremljenem laboratoriju. Analize zajemajo določanje organoleptičnih lastnosti (barva, vonj, okus), količine primesi, prostorninske mase, količine vode, količine pepela in peska, količine beljakovin, maščob, škroba in celuloze, aktivnosti alfa-amilaze, kislinske stopnje, prisotnosti žuželk, pršic, iztrebkov ipd., dokazovanje prisotnosti drugih mok v pšenični moki in določanje posebnih lastnosti pšenične moke z uporabo farinografa (reograf za določanje mešalnih lastnosti testa) in ekstenziografa (za določanje vlečljivosti testa).

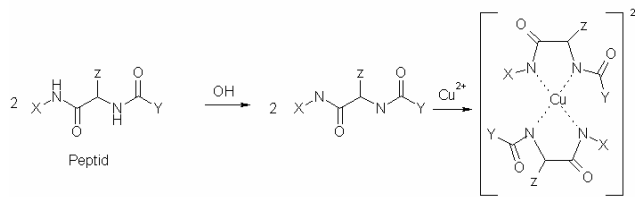
Dokazovanje primesi v žitni moki

S pravilnikom so določeni postopki za dokazovanje prisotnosti drugih mok v pšenični z mikroskopsko analizo (škrobna zrnca različnih žit imajo različno obliko), dokazovanje sojine moke v pšenični (temelji na osnovi aktivnosti ureaze, ki je v pšenični moki ni) in dokazovanje koruzne moke v pšenični – ta postopek bomo izvedli eksperimentalno.

Ker količina zeina v koruzi variira, so dobljeni rezultati približni, razen če bi imeli za pripravo umeritvene krivulje enako koruzno moko, kot je bila zamešana z vzorcem. Metodo lahko uporabimo tako za rumeno kot tudi za belo koruzo. V moki lahko dokažemo nad 0,5 %, v kruhu pa z nekoliko prirejenim postopkom nad 5 % dodane koruzne moke.

Na strani 9 je opisan postopek za dokazovanje prisotnosti koruzne moke v pšenični, tako kot je objavljen v prilogi k "Pravilniku o metodah in postopkih ugotavljanja skladnosti kmetijskih pridelkov oziroma živil". Kljub temu, da je postopek opisan precej natančno, je kolorimetrični del samo omenjen. Ker standardnega kolorimetra nimamo v vajalnici, bomo uporabili spektrofotometer in merili absorbanco pri 550 nm.

Osnova metode je biuretska reakcija [E. Riegler, *Z. anal. Chem.* 53, 242 (1914)], pri kateri bakrovi ioni v alkalnem tvorijo koordinacijsko spojino s 4 NH-skupinami peptidnih vezi. Kompleks, ki nastane, ima absorpcijski vrh pri 540 nm - 580 nm.



V okviru je besedilo iz priloge Pravilnika. Na vaji bomo izvajali prilagojen test, opisan na naslednji strani!

Dokazovanje in določanje koruzne moke v pšenični moki

a) Dokazovanje

Koruzno moko v pšenični moki dokazujemo z navzočnostjo zeina, tipične beljakovine koruze, ki daje biuretno reakcijo (vijoličasto obarvanje z bakrovim sulfatom v alkalnem okolju) in ki se topi v vročem amilalkoholu različno kot druge v etanolu topne beljakovine, od katerih jo tako lahko ločimo.

1. Odtehtamo 20 g moke in ji dodamo 50 ml 96 %-nega etanola, nato pa segrevamo na vodni kopeli pri temperaturi 75 °C in večkrat premešamo; 10 ml filtrata zmešamo z 2 ml 1 mol (NaOH)/l in 10 kapljicami 2 %-ne raztopine bakrovega sulfata. Če mešanica vsebuje vsaj 5 % koruzne moke, postane vijoličaste barve.
2. Odtehtamo 10 g moke in jo 15 min kuhamo s 25 ml izoamilalkohola, nato pa raztopino še vročo hitro titriramo. Če je v filtratu le 1 % koruzne moke, postane pri hlajenju moten zaradi usedlega zeina.

b) Določanje

Princip

Določanje koruzne moke v pšenični moki temelji na fotometriški analizi zeina z biuretno reakcijo.

Aparati in pribor

Uporabljamo naslednje aparate in pribor:

- 1) fotokolorimeter;
- 2) bučki, 50 ml in 100 ml;
- 3) lij s premerom 8 cm do 10 cm;
- 4) merilno bučko, 50 ml;
- 5) filtrirni papir;
- 6) pipeto, 10 ml;
- 7) graduirani pipeti, 1 ml in 5 ml;
- 8) urno steklo.

Reagenti in sredstva

Uporabljamo naslednje reagente:

- 1) 96 %-ni etanol;
- 2) raztopino natrijevega hidroksida $c(\text{NaOH}) = \text{mol/l}$;
- 3) 5 %-no raztopino bakrovega sulfata;
- 4) aktivno oglje.

Postopek

Odtehtamo 15 g moke in jo 1 h ekstrahiramo v 100 ml bučki, pokriti z urnim steklom, in sicer s 75 ml etanola v vodni kopeli pri temperaturi 75 °C ter večkrat premešamo. Nato jo pustimo še 1 h. Potem vsebino še enkrat premešamo ter naenkrat, po možnosti vso, zlijemo na filtrirni papir. Prvih nekaj kapljic filtrata vrnemo na filter. Na 10 ml filtrata, ki mora biti popolnoma bister, dodamo (v 50 ml bučko 4 ml 1 mol (NaOH)/l raztopine in 4,8 ml raztopine bakrovega sulfata, premešamo in ponovno 15 min segrevamo na vodni kopeli pri temperaturi 75 °C. Tedaj dodamo 0,5 g aktivnega oglja v prahu, premešamo, filtriramo skozi naguban filtrirni papir v merilno bučko in z vodo dopolnimo do oznake. Filtrata morata biti bistra, in sicer: pri čisti koruzni moki temno vijoličaste, pri pšenični moki pa svetlo rumeno zelene barve.

Intenzivnost modro vijoličaste barve filtrata je sorazmerna s količino zeina in jo določimo fotokolorimetrično. Iz umeritvene krivulje odčitamo količino koruzne moke. Umeritveno krivuljo narišemo na običajen način z 0'20, 0'30, 0'40 itd. do 100 % koruzne moke v mešanici s pšenično moko. Za te mešanice koruzne moke in pšenične moke uporabljamo opisani postopek. Ker količina zeina v koruzi variira, so rezultati približni, razen če razpolagamo z enako koruzno moko, ki je bila zamešana z vzorcem, tako da jo uporabljamo za vzporedna določanja. To metodo lahko uporabimo za rumeno koruzo in za belo koruzo. V moki lahko dokažemo 0,5 %, v kruhu pa samo 5 % dodane koruzne moke. Z 1-urnim stanjem zmesi po segrevanju in filtriranjem skozi filtrirni papir odstranimo nekatere raztopljene beljakovine pšenice, ki dajo slabo biuretno reakcijo. Z aktivnim ogljem odstranimo kriptoksantin, ki to reakcijo ovira.

Izvedba vaje:

Vaja ima dva dela, hitro oceno deleža koruzne moke v pšenični (nad 5 % ali 1 % - 5 %) in točnejše določanje deleža (nad 0,5 %), ki je bolj zamudno. Zato boste najprej nastavili dolgotrajnejšo ekstrakcijo zeina, med inkubiranjem v vodni kopeli pa boste izvedli obe hitri oceni vsebnosti.

Pri določanju deleža (daljši postopek) boste vzporedno z neznanim vzorcem analizirali še enega od standardnih vzorcev, ki bo skupaj s standardi drugih skupin dal vrednosti za pripravo umeritvene krivulje. Vzorci standardov so vnaprej pripravljene mešanice pšenične moke, ki vsebuje 0 %, 10 %, 20 %, 30 % oziroma 40 % koruzne moke.

Vse končne vzorce shranite do konca vaje, da jih boste lahko primerjali med skupinami!

a) Dokazovanje prisotnosti koruze v pšenični moki

Aparati, pribor in reagenti:

- 1) termostatorirana vodna kopel (75 °C, 100 °C);
- 2) bučke, 100 ml;
- 3) steklene epruvete, 20 ml in 10 ml;
- 4) erlenmajerice, 25 ml;
- 5) steklen lij na stojalu;
- 6) filtrirni papir;
- 7) steklena palčka;
- 8) 96 %-ni etanol;
- 9) 1 M NaOH;
- 10) 2 %-na raztopina bakrovega sulfata.

Ocena deleža koruzne moke v pšenični:

[vzorci A-E]

1. Iz 50 ml centrifugirke zatehtajte 10 g vzorca. Pretresite ga v bučko in prilijte 25 ml 96 %-nega etanola. Zamašite s celuloznim (papirnatim) zamaškom, da etanol ne bo izhlapeval.
2. Segrevajte 45 min v vodni kopeli pri temperaturi 75 °C in večkrat premešajte. *Pazite pri jemanju vzorcev: vroče!*
3. Filtrirajte v 25 ml erlenmajerico.
4. Odvzemite 5 ml filtrata in ga prenesite v malo stekleno epruveto (10 ml).
5. Dodajte 2 ml 1 M NaOH in 5 kapljic 2 %-ne raztopine bakrovega sulfata. Dobro premešajte.
6. Inkubirajte pri sobni temperaturi 15 minut ali več in občasno premešajte. Če mešanica vsebuje vsaj 5 % koruzne moke, postane reakcijska zmes vijoličaste barve.

Ocena nizkega deleža koruzne moke v pšenični:

[vzorci J-N]

1. Vzorcju moke (5 g) v visoki stekleni epruveti (20 ml) v digestoriju dodajte 12,5 ml izoamilalkohola.
2. Premešajte s palčko in 15 min kuhajte v vreli vodni kopeli. Nivo vode v inkubatorju ne sme biti nižji kot 1 cm pod robom višine vzorcev.
3. Raztopino še vročo hitro filtrirajte v svežo malo stekleno epruveto, ki mora biti povsem prozorna. Zberite prvih 2,5 ml filtrata. Postavite ga v digestorij, da se povsem ohladi.
4. Če je v vzorcju bilo vsaj 1 % koruzne moke, postane filtrat ob ohlajanju moten zaradi izoborjenega zeina.

b) Kvantitativno določanje prisotnosti koruzne moke v pšenični [vzorci P-U]

Aparati in pribor

- 1) spektrofotometer;
- 2) termostatisirana vodna kopel (75 °C);
- 3) bučke, 100 ml;
- 4) erlenmajerice, 25 ml;
- 5) lij s premerom 8 cm do 10 cm;
- 6) merilna bučka, 25 ml;
- 7) filtrirni papir;
- 8) pipeta, 10 ml;
- 9) graduirani pipeti, 1 ml in 5 ml;
- 10) čaše, 50 ml;
- 11) stojalo z mufo in prižemo za pričvrstitev lija.

Reagenti in sredstva

- 1) 96 %-ni etanol;
- 2) raztopina natrijevega hidroksida: $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$;
- 3) 5 %-na raztopina bakrovega sulfata;
- 4) aktivno oglje.

Postopek

1. Standardnemu in testnemu vzorcu moke (po 7,5 g) v 100 ml bučki dodajte po 37,5 ml etanola in premešajte. Označite z nalepko in vodoodpornim flomastrom in bučko zamašite s čepom iz papirja.
2. Inkubirajte 80 min v vodni kopeli pri temperaturi 75 °C. Medtem večkrat premešajte, nato pa pustite stati še najmanj 30 min pri sobni temperaturi. (S tem in z naknadnim filtriranjem odstranite nekatere raztopljene beljakovine pšenice, ki dajo šibko biuretno reakcijo.)
3. Vsebino ponovno premešajte in jo vso zlijte na filtrirni papir na liju, ki je pričvrščen na stojalu. Filtrat zbirajte v 50 mililitrski čaši. Prvih nekaj kapljic filtrata vrnite na filter (medtem naj filtrat kaplja v rezervno 50-mililitrsko čašo).
4. Odvzemite 5,0 ml filtrata, ki mora biti popolnoma bister, in ga prenesite v 25 mililitrsko erlenmajerico.
5. Dodajte 2,0 ml raztopine NaOH in 2,4 ml raztopine bakrovega sulfata, dobro premešajte in ponovno 15 min segrevajte v vodni kopeli pri temperaturi 75 °C.
6. Zatehtajte in previdno dodajte 0,5 g aktivnega oglja v prahu, premešajte, filtrirajte skozi naguban filtrirni papir v merilno bučko (25 ml) in z vodo dopolnite do oznake.* Filtrata morata biti bistra in sicer: pri čisti koruzni moki temno vijoličaste, pri pšenični moki pa svetlo rumeno-zelene barve. (Z aktivnim ogljem odstranite kriptoksantin, ki ovira biuretno reakcijo).
** Ker je filtriranje zelo počasno in ga je na vajah težko dokončati, izvedite zaključni del analize nekoliko drugače: filtrirajte v 10 ml epruveto do oznake, ki jo predhodno naredite pri 2 ml, nato pa dopolnite do 5 ml z vodo.*
7. Določite intenzivnost modro-vijoličaste barve filtrata, ki je sorazmerna količini zeina v vzorcu. V plastični kiveti izmerite absorbanco pri 550 nm in iz umeritvene krivulje odčitajte količino koruzne moke v testnem vzorcu. Umeritveno krivuljo narišete na običajen način na osnovi testa z 0 %, 10 %, 20 %, 30 % in 40 % koruzne moke v mešanici (eno točko prispevate vi, ostale pa druge skupine).

Rezultati:

a) Dokazovanje prisotnosti koruze v pšenični moki

Ocena deleža koruzne moke v pšenični:

[vzorci A-E]

V vzorcu, ki ga je analizirala moja skupina in je bil označen s črko _____, je hitra ocena pokazala, da je vsebnost koruzne moke (večja/manjša):

_____ od 5 %

(vzorec je bil _____ barve)

Ocena nizkega deleža koruzne moke v pšenični:

[vzorci J-N]

V vzorcu, ki ga je analizirala moja skupina in je bil označen s črko _____, je hitra ocena pokazala, da je vsebnost koruzne moke (večja/manjša):

_____ od 1 %

(vzorec je bil _____)

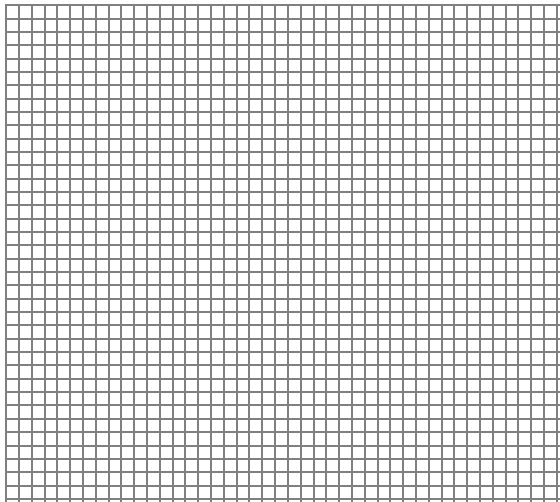
b) Kvantitativno določanje prisotnosti koruzne moke v pšenični

[vzorci P-U]

Umeritvena krivulja na osnovi standardov

Moja skupina je določala vsebnost koruzne moke v standardu s _____ % koruzne moke, analizirala pa testni vzorec _____.

(označite osi, vrišite vse standardne vrednosti in narišite umeritveno krivuljo. Z X označite v grafu točko, ki predstavlja neznani vzorec!)



Iz umeritvene krivulje lahko razberem, da je neznani vzorec vseboval _____ % koruzne moke.

Komentarji:

(vpišite kakršnekoli spremembe v postopku dela glede na opisanega, opažanja, ki bi lahko bila pomembna za razumevanje rezultatov ali pri ponavljanju testa!)

Vprašanja za ponavljanje:

(vprašanja služijo lastnemu preverjanju razumevanja snovi in znanja, ki smo ga pridobili z vajo)

1. Kakšna je biokemijska sestava žitnih semen?
2. Kaj je zein?
3. Ali bi lahko pričakovali, da obstaja en sam gen za zein? Razložite!
4. Na čem temelji biuretska reakcija?
5. Kako bi še lahko dokazali prisotnost zeina v ekstraktu koruznih semen?
6. Trenutna cena koruze na čikaški borzi (opcija julij 2008) je 5,55 USD za mernik (bushel = 35 l ali 25 kg koruze), pšenice pa 7,35 USD za mernik (27 kg). Koliko na letni ravni profitira mlinarsko podjetje, če med pšenično moko vmeša 2 % koruzne moke pri proizvodnji 100 ton moke na mesec?
(Kot zanimivost: leta 2006 je bila cena za mernik koruze 2,40 USD, pšenice pa 3,72 USD.)

2. vaja: Kontrola pasterizacije mleka s pomočjo določanja encimske aktivnosti

Mleko je verjetno kemično najboljše raziskano živilo, saj se z njim raziskovalci ukvarjajo že več kot 150 let. Vseeno pa gre za biokemijsko zelo zapleteno živilo in o njem še vedno ne vemo vsega. Cenjeno je predvsem, ker vsebuje precej proteinov, med njimi največ kazeina. Na splošno mlečne proteine delimo na kazeine (ki se oborijo, če mleko nakisamo na pH 4,6) in proteine sirotke – tem nekateri pravijo tudi serumski proteini. Pri kravjem mleku je razmerje med skupinama 80:20 v korist kazeinov, pri kobiljem mleku pa na primer 50:50. Med proteini sirotke med drugim najdemo laktalbumine, laktoglobuline in nekatere encime.

Zaradi prisotnosti mikrobov v pomolzenem mleku bi se mleko hitro pokvarilo. Rast mikrobov ustavimo s termično obdelavo, ki je lahko bodisi pasterizacija ali sterilizacija. Ob tem pa se encimi v mleku inaktivirajo. Za hranilno vrednost mleka to ni pomembno, je pa osnova za kontroliranje termične obdelave mleka. Pasterizacijo preverjamo preko zmanjšanja aktivnosti fosfataze ali preko zmanjšanja aktivnosti peroksidaze.

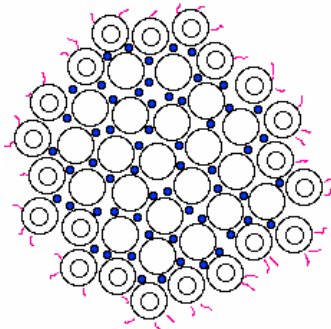
Sestava mleka

Mleko je vodna emulzija s pH 6,6 – 6,9, ki vsebuje proteine (~3,5 % suhe snovi), ogljikove hidrate (prevladuje laktoza, ki predstavlja 4,7 % suhe snovi), raznovrstnih emulzificiranih lipidov (do 4 % suhe snovi; največ je trigliceridov in so prisotni v obliki maščobnih kroglic [v kravjem mleku $2r = 0,1 \mu\text{m} - 10 \mu\text{m}$], obdanih z lipidnim dvoslojem). Minerali so večinoma vezani na kazein (kalcij: 12 g/l). [<http://classes.aces.uiuc.edu/AnSci308/milkcomp.html>]

Ob tem mleko lahko vsebuje tudi bakterije (sprejemljiva meja je 100.000 bakterij / ml) in somatske celice (meja je 400.000 / ml).

Proteini v mleku

Večinski protein v mleku je kazein v obliki micelov [$2r = 10 \text{ nm} - 300 \text{ nm}$], ki jih sestavlja več med seboj podobnih polipeptidnih molekul z vezanim kalcijem in fosforjem ter vodo. V resnici je kazeinov več vrst, so si pa med seboj podobni.



[<http://www.foodsci.uoguelph.ca/deicon/casein.html>]

Kazein po enem od modelov skupaj s še nekaterimi drugimi sestavinami mleka tvori micelle, sestavljene iz submicelov. Vendar pa mnenje o tem, kako definirani so v resnici submiceli, ni enotno in mnogi avtorji trdijo, da namesto submicelov v micelih nastopajo špagetom podobni navoji kazeinskih verig. Kalcijev fosfat ($\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$; temne točke na sliki) je tako v notranjosti kot na obodu submicelov.

Na micelle se vežejo tudi druge vrste proteinskih molekul, vključno z nekaterimi encimi. Micelna oblika proteinov omogoča lahko ločevanje proteinov iz mleka. Če miceli razpadejo, se proteini začnejo obarjati (sesirjati), saj je čist kazein v vodnem okolju zelo slabo topen. Sesirjanje lahko povzročimo z nakisanim (na $\text{pH} \leq 4,6$) ali s proteolitično razgradnjo, micelle pa lahko odstranimo v laboratoriju tudi z ultracentrifugiranjem. V sirotki, ki ostane po sesirjenju kazeina, ostajajo še nekateri proteini; največ je beta-laktoglobulina in alfa-laktalbumina, najdemo pa tudi imunoglobuline, serumski albumin, rastne faktorje, hormone itd.

Fosfataza

V mleku je v resnici več vrst fosfataz, čeprav v tehnološkem izrazoslovju pogosto govorijo o fosfatazi kot da bi bila ena sama. Najpomembnejši fosfatazi sta alkalna in kislina fosfomonoesteraza. Alkalna fosfataza, ki jo najdemo v mleku, je temperaturno labilna in se inaktivira pri temperaturi, ki je malenkostno višja (okrog $63 \text{ }^\circ\text{C}$; odvisno od časa inkubiranja) kot je temperatura, potrebna za uničenje bakterije *Mycobacterium tuberculosis*. Zato so že zelo zgodaj razvili test na osnovi aktivnosti fosfataze, ki ga mlekarne še vedno uporabljajo za preverjanje uspešnosti pasterizacije. Če ugotovijo, da je fosfataza še aktivna, to kaže na možno napako pri pasterizaciji. V tem primeru vzorec mleka iz industrijske pasterizacije ponovno pasterizirajo v malem merilu v laboratoriju. Če je fosfatazni test

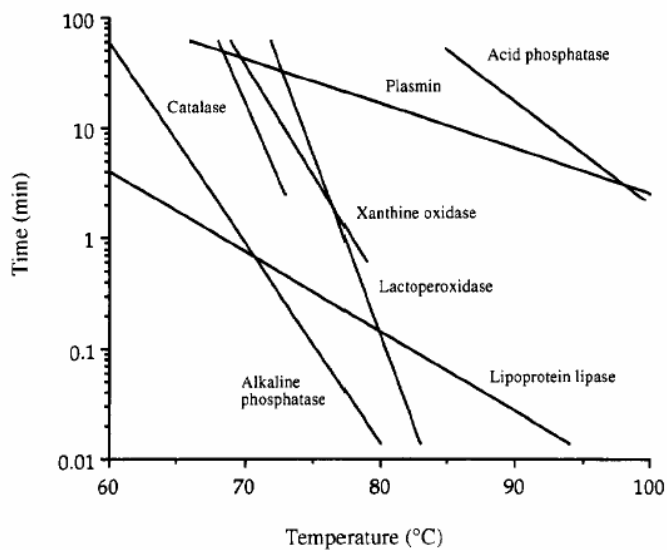
tokrat negativen, je šlo očitno za napako v postopku pasterizacije. V redkih primerih pa tudi po laboratorijski pasterizaciji še lahko detektirajo aktivno fosfatazo. Ugotovili so, da termostabilna fosfataza lahko izvira iz v mleku nagojenih mikroorganizmov, če okuženo mleko ni bilo hranjeno v skladu s predpisanim postopkom.

Kisle fosfataze je v mleku približno 50x manj kot alkalne, zato ne moti testa, čeprav je temperaturno bolj obstojna kot alkalna fosfataza.

Laktoperoksidaza

Peroxidaza je eden temperaturno najbolj obstojnih encimov v mleku, zato ga danes uporabljajo pri kontroli nekaterih hitrih načinov pasterizacije. Je homodimer z $M_r=77.500$ in vsebuje 0,07 % železa.

Slika 2.2: Kombinacije inkubacijskega časa in temperature, pri kateri je treba segrevati mleko, da inaktiviramo nekatere encime v mleku (iz: Walstra & Jenness, *Dairy Chemistry and Physics*, John Wiley & Sons, New York, 1984).



Termična obdelava mleka

Za pakiranje, skladiščenje in transport je treba mleko obdelati, da mikroorganizmi, ki so v njem prisotni, ne začnejo kvariti njegovih lastnosti. Pasterizacija je inkubiranje pri povišani temperaturi toliko časa, da pobije 99 % do 99,5 % vseh mikroorganizmov v mleku. Poznamo nizko pasterizacijo (30 min pri 63°C - 65°C), kratkotrajno pasterizacijo (40 s pri 71 °C – 74 °C ali 15 s pri 74 °C – 76 °C), visoko pasterizacijo (2 s - 5 s pri 85 °C – 87 °C) in ultravisokotemperaturno obdelavo (1 s - 2 s pri 138 °C – 142 °C), pri kateri pa uničijo skoraj vse mikroorganizme. Zaradi različnih postopkov termične obdelave so tudi mleka različno označena, kar je pogosto odvisno tudi od predpisov v posameznih državah. Tako se na primer v ZDA pojavlja oznaka UP (ultra-pasteurized) za mleko, ki je bilo vsaj 2 s pri 138 °C, ni pa bilo pakirano v aseptičnih pogojih, zato ga je treba hraniti v hladilnikih, lahko tudi več tednov. Oznaka UHT (ultra-high temperature) v severnoameriških državah pomeni, da je bilo mleko obdelano enako kot UP, vendar pa so ga pakirali v aseptičnih pogojih in zato velja za sterilno. HTST (high temperature short time) označuje mleko, ki je bilo vsaj 15 s pri 72 °C in naj bi ga ob hrambi v hladilniku porabili v 10 – 21 dneh.

V Evropi merila kakovosti, načine zbiranja in (termične) obdelave mleka določa direktiva Sveta Evrope 92/46/EEC (<http://www.food-control.com/LEGAL/D92-46.HTML>). Direktiva ne definira natančnih tehnoloških parametrov, pač pa za pasterizirano mleko postavlja minimalno merilo "15 s pri 71,7 °C ali drugo ustrežno kombinacijo z enakim učinkom", pri čemer je tako mleko pozitivno v testu na peroksidazo in negativno v testu na fosfatazo. Če sta oba testa negativna, mora biti mleko označeno kot visokotemperaturno obdelano (UHT). Sicer za UHT mleko velja, da je moralo biti segreto na vsaj 135 °C za vsaj 1 s, tako dobljeno mleko pa mora v zaprti embalaži biti obstojno vsaj 15 dni pri 30 °C ali 7 dni pri 55 °C. Enako obstojno mora biti mleko, ki je označeno kot sterilizirano, s tem, da je

sterilizirano mleko šlo skozi tehnološki postopek v hermetično zaprti embalaži, UHT mleko pa se lahko v postopku meša z vodno paro.

Preverjanje termične obdelave

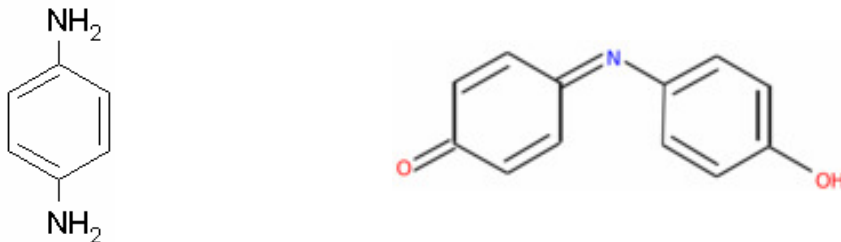
Pravilnik o vzorčenju in analiznih metodah za surovo in toplotno obdelano mleko (Uradni list RS, št. 11/2004) (http://www.uradni-list.si/_pdf/2004/Ur/u2004011.pdf - stran 1246) je uskladil predpise z evropskimi. Natančne postopke pa so določili kasneje. Pred tem je bil od leta 2003 v veljavi pravilnik, ki je v prilogah navajal npr. metode vzorčenja ter fizikalno-kemijske analize mleka in mlečnih izdelkov. V dokumentu (http://www.uradni-list.si/files/RS_-2003-084-03999-OB~P007-0000.PDF) je bilo točno opisano, kdo sme jemati vzorce, kako pogosto jih je treba jemati, kaj vsebuje zapisnik o odvzemu vzorcev, katere metode so predpisane in kako jih je treba izvajati.

Dokazovanje pasterizacije so po tem pravilniku opravljali po dveh metodah. "Fosfatazni preskus z metodo po Andersenu in Petersenu" je primeren za preverjanje nizke pasterizacije ali kratkotrajne pasterizacije, pri kateri se alkalna fosfataza inaktivira. Odsotnost aktivnosti, merjene na fenilfosfat, je dokaz primerne pasterizacije.



dinatrijev fenilfosfat (levo) in 2,6 dibromokinon-4-klorimid (desno).

"Peroksidazni preskus s Storchovo metodo" je bil po slovenskih predpisih namenjen preverjanju visoke pasterizacije, ker je peroksidaza temperaturno bolj stabilna od fosfataze. Aktivnost določamo posredno preko reakcije razgradnega produkta (kisika), ki se veže na brezbarvni akceptor para-fenilendiamin, ki se pretvori v indofenol škrlatno-modre barve.



p-fenilendiamin (1,4 diaminobenzen) (levo) in indofenol (desno)

V nekaterih drugih državah imajo standardizirano metodo določanja aktivnosti termolabilnih encimov s fluorogenimi substrati ali pa s kromogenim testom po alternativnih postopkih (npr. v ZDA po Scharerju).

a) Fosfatazni test po Andersenu in Petersenu

Alkalna fosfataza hidrolizira estre fosforne kisline, pri čemer se sprošča fenol, ki daje z dibromokinon-klorimidom modro barvo.

Aparati in pribor

- 1) erlenmajerica 100 ml;
- 2) pipete: 10 ml, 5 ml, 1 ml;
- 3) merilni valj 50 ml;

- 4) epruvete;
- 5) vodna kopel.

Reagenti

- 1) pufer: Na-karbonat (2,2 g), Na-bikarbonat (8,7 g) v vodi ($V_{sk} = 1000$ ml);
- 2) substrat: 1,1 g dinatrijevega fenilfosfata/1000 ml vode;
- 3) reagent na fenol: 50 mg 2,6 dibromokinon-4-klorimida v 8 ml 96 %-nega etanola (raztopina je rumene barve in jo hranimo v hladilniku).
- 4) Vzorci: A: pasterizirano mleko 1,6 % (Spar - Agroind Vipava), B: Alpsko mleko 0,5 % (Ljubljanske mlekarne); testni vzorci.

Postopek

- 1) K 50 ml pufru dodamo 5 ml raztopine substrata.
- 2) Od dobljene zmesi odvzamemo 3-krat po 10 ml in prenesemo v 3 epruvete.
- 3) Dodamo po 1 ml mlečnega vzorca (A, B in še en testni vzorec, ki ga bo določil asistent).
- 4) Pretresemo in pustimo 15 min v vodni kopeli pri 38 °C.
- 5) V epruveto kanemo nekaj kapljic reagenta na fenol in pretresemo.

Interpretacija: surovo in premalo pasterizirano mleko obarva raztopino v modro.

b) Peroksidazni test po Storchu

Peroksidaza v prisotnosti akceptorja kisika katalizira razgradnjo H_2O_2 na H_2O in O_2 . Če kot akceptor uporabimo parafenilendiamid, se bo ta obarval modro.

Pribor

- 1) pipeta 5 ml;
- 2) kapalke;
- 3) epruvete.

Reagenta

- 1) 2 %-na (m/V) sveža raztopina p-fenilendiamina;
 - 2) 1 %-na (V/V) sveža raztopina H_2O_2 .
- Oba reagenta pripravite tik pred uporabo, ker nista obstojna. Izračunajte, koliko vsake raztopine boste potrebovali in pripravite 20 % več, kot ste izračunali.

Postopek

1. V 3 epruvete odmerite po 5 ml enakih vzorcev kot pri fosfataznem testu.
2. S kapalko dodajte po 2 kapljici raztopine parafenilendiamina in po 1 kapljico raztopine vodikovega peroksida.
3. Pustite, da reagira 1 minuto.

Interpretacija: mleko, segreto nad 80 °C ima negativno reakcijo (ostane belo).

Rezultati:

V fosfataznem testu so dali vzorci naše skupine naslednje barvne reakcije:

- A:
B:
—:

Na osnovi dobljenih rezultatov sklepam, da

V peroksidaznem testu so dali vzorci naše skupine naslednje barvne reakcije:

A:

B:

—:

Na osnovi dobljenih rezultatov sklepam, da

Vprašanja za ponavljanje in razmišljanje:

- Katere proteine najdemo v mleku in katerih je največ?
- Kako definiramo kazeine?
- Katero mleko je sterilizirano, katero pa pasterizirano?
- Ali je v mleku samo ena fosfataza?
- Kakšna je vloga peroksidaze v mleku?
- Ali bi bilo smiselno določati kazein v mleku z metodo PCR? Zakaj?
- Ali bi fosfatazni test lahko izvedli kot kvantitativni preskus?
- Kako bi izvedli oba testa z manjšimi količinami vzorca in reagentov? Zakaj menite, da je test po slovenskem pravilniku določen s tako velikimi količinami vzorcev?
- Predpostavite, da je mleko, ki ste ga dobili v testiranje, dalo v fosfataznem testu modro obarvano raztopino, v peroksidaznem pa ni bilo aktivno. Kako bi lahko interpretirali dobljeni rezultat?
- Kakšen bo izid peroksidaznega testa in kakšen rezultat fosfataznega pri mleku, ki ga je kmet segreval 10 min pri 60 °C?
- Ali bi peroksidazni test lahko izvedli tudi s smetano, kajmakom in sirom roquefort? Kaj pa s sadnim sokom, ki ga pred polnjenjem tudi pasterizirajo?

3. vaja: Določanje sestave mletega mesa z metodo PCR

(vajo in navodila je pripravila dr. Vera Župunski)

Slovenija mora svojo gospodarsko priložnost iskati v izvozu lastnih izdelkov, ki po kvaliteti presegajo druge. Ena takih ekonomskih priložnosti je izvažanje hrane v arabske države, ki imajo sicer veliko naravnih bogastev a malo drugih virov. Ta trg obsega poldrugo milijardo ljudi in trenutno predstavlja odlično ekonomsko nišo. Njihova živilsko-predelovalna industrija je slabše razvita, hkrati pa imajo posebne standarde ali zahteve pri sestavi in pridelavi hrane. Izdelki iz mesa morajo imeti certifikat »halal«, ki potrjuje, da je hrana pripravljena po islamskih predpisih.

Tako bi lahko v muslimanske države izvažali mesne izdelke, ki ne smejo vsebovati svinjine. Zato smo razvili test, s pomočjo katerega lahko ugotovimo, ali je v vzorcu svinjsko meso. Z metodo hkratne PCR (verižna reakcija s polimerazo) lahko z eno reakcijo določimo vrstno sestavo mesnega izdelka. Prednost te metode je sočasna detekcija več vrst mesa v vzorcu, torej ne določamo samo prisotnost svinjskega mesa, ampak nam rezultati metode lahko služijo za izdelavo deklaracije prehrabnega izdelka ne glede na trg, kamor je namenjen.

Izvedba vaje:

Ugotoviti moramo, iz katerih vrst mesa so pripravili mleto meso. Iz vzorcev mletega mesa boste izolirali genomsko DNA in jo analizirali z verižno reakcijo s polimerazo (metoda PCR). S to metodo boste na osnovi začetnih oligonukleotidov specifično pomnožili različno dolge fragmente DNA, ki bodo pokazali, iz katerih vrst mesa je pripravljeno mleto meso. Z eno reakcijo PCR boste lahko pomnožili fragmente DNA iz 3 različnih vrst mesa: fragment piščančje DNA je dolg 227 bp, goveje DNA 274 bp in prašičje DNA 398 bp.

Genomsko DNA lahko izolirate s pomočjo standardnih protokolov, ki so zapisani v laboratorijskih priročnikih ali s prirejenimi oz. izboljšanimi protokoli, ki so jih opisali znanstveniki v raziskovalnih člankih. Večina teh metod temelji na uporabi reagentov z definirano sestavo, ki jih lahko vsak pripravi v laboratoriju. Na voljo pa imamo tudi kompletne reagentov (»kite«), ki vsebujejo optimiziran protokol in reagente z večinoma neznan sestavo kemikalij, ki jih kupimo pri različnih proizvajalcih. Za izolacijo DNA iz mletega mesa bomo uporabili komplet »Wizard Genomic DNA Purification Kit« proizvajalca Promega.

a) Izolacija genske DNA

(točke 1-3 izvede tehnik en dan pred vajo)

1. V 1,5 ml mikrocentrifugirko odpipetirajte 120 µl 0,5 M EDTA in 500 µl pufru za liziranje jeder (*Nuclei Lysis Solution*) in ohladite na ledu.
2. V novo mikrocentrifugirko dajte manjši košček mletega mesa (0,5 cm³) in dodajte 600 µl zgornje mešanice.
3. Dodajte še 17,5 µl proteinaze K s koncentracijo 20 mg/ml in inkubirajte preko noči pri 55 °C. Med tem večkrat dobro premešajte.
-
4. Dodajte 3 µl raztopine RNaze (konc. 4 mg/ml) in premešajte z 2-5x obračanjem mikrocentrifugirke. Raztopino inkubirajte 15 min pri 37 °C, nato vzorec še 5 min inkubirajte pri sobni temperaturi.
5. Vzorcju dodajte 200 µl pufru za obarjanje proteinov (*Protein Precipitation Solution*) in dobro premešajte z vibracijskim mešalnikom (20 s). Vzorec dajte na led za 5 min.
6. Nato centrifugirajte 4 min pri 13,000 g – 16,000 g. Oborjeni proteini tvorijo belo oborino na dnu mikrocentrifugirke.
7. Previdno prenesite supernatant, ki vsebuje DNA, v mikrocentrifugirko, v katero ste predhodno odpipetirali 600 µl izopropanola (sobna T).

8. Z obračanjem mikrocentrifugirke nežno premešajte raztopino, da nastane nitasta oborina DNA.
9. Centrifugirajte 1 min pri sobni T pri enaki hitrosti kot prej. DNA vidimo kot belo oborino, supernatant pa previdno odlijte ali odstranite s pipeto.
10. Dodajte 600 μl 70 %-nega etanola (sobna T) in zopet nežno premešajte z obračanjem. S tem oborjeno DNA sperete, nato pa vzorec centrifugirajte 1 min.
11. Previdno s pipeto odstranite raztopino, ker je usedlina le rahlo pritrjena na dno mikrocentrifugirke.
12. Mikrocentrifugirko obrnjeno postavite za 3 min na papirnate brisače, nato pa v termo-blok na 37 $^{\circ}\text{C}$, da se usedlina posuši.
13. Dodajte 100 μl rehidracijske raztopine in inkubirajte 1 h pri 65 $^{\circ}\text{C}$, da se DNA rehidrira. DNA lahko pustite tudi čez noč pri 4 $^{\circ}\text{C}$.
14. Izolirano genomsko DNA hranite pri 2 $^{\circ}\text{C}$ – 8 $^{\circ}\text{C}$ ali pa takoj uporabite za PCR.

b) Določanje sestave mletega mesa z metodo PCR

S PCR bomo določili vsebnost različnih sestavin v mesnem izdelku, ki lahko vsebuje piščančje, goveje in svinjsko meso. Uporabili bomo 4 različne začetne oligonukleotide. Oligonukleotid v smiselni smeri je enak za vse vrste mesa, oligonukleotidi v nasprotni smeri pa so specifični za posamezno vrsto DNA in so narejeni na osnovi gena za citokrom b ustrezne živalske vrste:

- oligonukleotid v smiselni smeri:
FOR: 5'-GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAA
- oligonukleotidi v nasprotni smeri za piščančje, goveje in svinjsko meso:
PI: 5'-AAGATACAGATGAAGAAGAATGAGGCG
GO: 5'-CTAGAAAAGTGTAAGACCCGTAATATAAG
SV: 5'-GCTGATAGTAGATTTGTGATGACCGTA

Produkte PCR bomo med seboj ločili z agarozno elektroforezo.

1. V 0,2 ml mikrocentrifugirko odpipetirajte naslednje reagente v naštetem vrstnem redu:

5 μl dNTP (končna konc. 0,2 mM)
 5 μl 10x pufer za PCR
 3 μl MgCl_2 (končna konc. 1,5 mM)
 5 μl oligonukleotida FOR (konc. 4 pmol/ μl = 4 μM)
 15 μl oligonukleotida PI (konc. 4 pmol/ μl)
 3 μl oligonukleotida GO (konc. 4 pmol/ μl)
 3 μl oligonukleotida SV (konc. 4 pmol/ μl)
 5 μl genomske DNA
dopolnite z dH_2O do 47 μl

Po prvi stopnji denaturacije DNA dodajte 3 μl encima polimeraze *Taq* (konc. 0,5 U/ μl).

Eden izmed študentov naj pripravi pozitivno kontrolo, drug študent pa negativno kontrolo PCR!

2. Na PCR-aparaturi nastavite program z naslednjimi koraki:
 - denaturacija pri 97 $^{\circ}\text{C}$ 5 min
 - sledi 34 ciklov:
 - denaturacija pri 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min
 - prileganje oligonukleotidov pri 50 $^{\circ}\text{C}$ 1 min
 - sinteza verige pri 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s
 - inkubacija pri 15 $^{\circ}\text{C}$

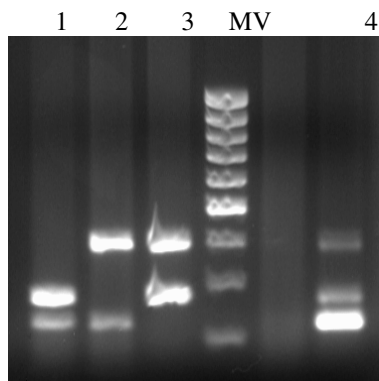
3. Pripravite 1,8 % agarozni gel z etidijevim bromidom (3 μ l / 100 mL gela) in po končani PCR odpipetirajte v novo 1,5 ml mikrocentrifugirko 20 μ l vzorca, dodajte 2 μ l nanašalnega pufra za agarozno elektroforezo ter vse skupaj nanesite v žepek na agaroznem gelu. Na gel poleg vzorcev nanesite še pozitivno in negativno kontrolo ter označevalec velikosti (100 bp). Elektroforeza naj poteka pri 100 mA dokler prvo barvilo ne pripotuje do 2/3 gela. Gel si oglejte na transiluminatorju pri 310 nm.

c) Rezultati:

Nalepite sliko elektroforeznega gela z obarvano DNA (bo na spletni strani vaj) in jo opišite! Koliko so veliki fragmenti DNA, ki ste jih pomnožili na osnovi izolirane genomske DNA mletega mesa? Katere vrste mesa so v vašem vzorcu?

d) Vprašanja za ponavljanje:

1. Zakaj uporabljamo za pomnoževanje 3 fragmentov 4 začetne oligonukleotide, če vemo, da pri vsaki PCR rabimo en komplementarni začetni in en končni oligonukleotid?
2. Na priloženi sliki so rezultati PCR na osnovi izolirane DNA iz 4 različnih vzorcev polpet. Določite, katere vrste mesa so bile v testiranih vzorcih 1-4! Na sliki je označevalec velikosti z zgornjo liso pri 1000 bp, ostale lise pa predstavljajo po 100 bp krajše molekule.



3. Ali izdelek, katerega vzorec ste testirali, lahko prodamo na muslimanski trg?
4. Iz katerega organizma so izolirali encim, ki ga uporabimo pri PCR? Zakaj?
5. Kaj sta pozitivna in negativna kontrola pri PCR?
6. S katero metodo bi še lahko določili, katere vrste mesa so v vzorcu?
7. Ali lahko na osnovi elektroforezne analize ugotovimo, koliko je bilo v vzorcu posamezne vrste mesa?
8. Primerjajte metode za izolacijo DNA, ki jih poznate!

4. vaja: Določanje prisotnosti gensko spremenjenih organizmov v hrani

Nekatere poljščine v tujini, predvsem v ZDA, so gensko spremenjene, kar pomeni, da razen genov, ki jih nosi posamezna sorta, vsebujejo še dodatne gene, ki predstavljajo določeno prednost pri pridelavi, skladiščenju pridelka ali uživanju hrane. Gensko spremenjenih rastlin ni dovoljeno sejati brez dovoljenja pristojnih uradov, ki v postopku med drugim določijo, za kakšne namene bo pridelek uporaben. Uporabo lahko omejijo in določijo, da je gensko spremenjena rastlina lahko samo vir živinske krme, lahko pa dovoli tudi uporabo v prehrani ljudi.

Gensko spreminjanje je v naravi vsakdanji pojav. Tudi pri križanju rastlinskih sort (ali živalskih pasem) prihaja do spreminjanja genske zasnove. Ker pa na gensko spreminjanje, ki je opravljeno usmerjeno, v laboratoriju, mnogo ljudi gleda skeptično ali ima do gensko spremenjenih organizmov odklonilno stališče, je v Evropi prevladalo mnenje, da imajo potrošniki pravico vedeti, ali je hrana, ki jo kupujejo in uživajo, pripravljena iz gensko spremenjenih organizmov (GSO).

Štiri države, ki skupaj pridelajo 99 % vse gensko spremenjene hrane na svetu so ZDA, Kanada, Kitajska in Argentina. Med rastlinami, ki so najpogostejše gensko spremenjene, so koruza, soja, bombaž in ogrščica (oljna repica). V ZDA je bilo lani že 80 % vse soje gensko spremenjene, koruze pa 38 %. Večina gensko spremenjene koruze spada v skupino (Bt). Vstavljen ima gen za bakterijski toksin, ki deluje predvsem proti koruzni večči. Ličinke te večče vrtajo rove v stebela, tako da koruza zastaja v razvoju, stebela pa polegajo. Približno tretjino toliko kot Bt-koruze je koruze, ki je odporna proti herbicidu glifozatu. Taka koruza raste na poljih, ki so bila obdelana s herbicidom, tako da na njih ne morejo rasti pleveli. Tudi gensko spremenjena soja vsebuje DNA, ki ji omogoča rast v zemlji, obdelani s herbicidom (Bt-sort ne sejejo).

Nasprotniki GSO menijo, da gensko spremenjena hrana pomeni grožnjo za okolje in za zdravje ljudi. Razen tega nekatere moti, da 91 % svetovnega trga z gensko spremenjenimi semeni obvladuje ena sama firma (Monsanto). Grožnja za okolje naj bi predstavljalo siromašenje rastlinskih vrst (manj plevelov), kar posledično lahko vpliva na oženje spektra žuželk, ki so navezani na te pleveli. Po drugi strani pa bi bakterijski toksin lahko deloval tudi na druge žuželke, ne samo na tiste, proti katerim je v prvi vrsti usmerjen. Gensko spremenjena hrana vsebuje nove antigene, proti katerim bi lahko ljudje razvili imunski odziv. Tudi zaužitje DNA, ki po svojem izvoru ni rastlinska, se zdi nekaterim problematično. Danes gensko spremenjene poljščine zasedajo samo okrog 3 % obdelovalnih površin in nekateri menijo, da se potrošniki vse bolj negativno odzivajo na GSO, kar bo privedlo do usihanja pridelave gensko spremenjenih rastlin.

Direktnih kratkoročnih zdravstvenih učinkov uživanja GSO ni uspel dokazati še nihče. Za dolgoročne študije pa je morda minilo še premalo časa, da bi jih bilo smiselno izvajati, saj so prve gensko spremenjene poljščine začeli gojiti šele leta 1996 (gensko spremenjeni paradižnik pa dve leti pred tem, vendar ta ni imel vključenih tujih genov v pravem pomenu besede, saj je vseboval le protismerno DNA zapisa za poligalakturonidazo).

Evropski parlament in Svet Evrope sta septembra 2003 sprejela predpis 1829/2003, ki med drugim določa, da je treba ustrezno označiti vse izdelke, ki vsebujejo več kot 0,9 % GSO (predpis je treba izvajati od 18. aprila 2004 naprej). Za izdelke, ki vsebujejo več kot 0,9 % gensko spremenjenih surovin, je treba pridobiti dovoljenje za dajanje na trg in take izdelke ustrezno označiti. Vendar do danes na slovenskem trgu še ni nobenega izdelka, ki bi imel tako oznako. Preliminarne študije so pokazale, da tudi v resnici GSO le v zelo redkih primerih najdemo v izdelkih na naših tržnih policah. Proizvajalci prehrabnih izdelkov zahtevajo od dobaviteljev surovin certifikat o ustreznosti, uvozniki hrane pa v glavnem skrbijo, da hrano, za katero ne morejo pridobiti ustreznega potrdila, predhodno testirajo. Edina akreditirana ustanova v Sloveniji, ki opravlja tovrstne analize, je Nacionalni inštitut za biologijo.

Vsebnost GSO lahko preverjamo na več načinov. Specifične antigene lahko določamo s pomočjo imunoloških testov. Zaradi visoke občutljivosti pa večina postopkov temelji na PCR. Na ta način lahko

preverjamo prisotnost zapisov za posamezne značilne komponente rastlinskih ekspresijskih sistemov. Med temi je na primer močni promotor CaMV35S (CaMV = virus mozaika cvetače, *cauliflower mosaic virus*) ali pa deli zapisa za insekticid iz talne bakterije *Bacillus thuringiensis* (Bt). Običajno hkrati z reakcijo, s katero dokazujemo prisotnost zaporedja DNA, ki je značilno za transgenske organizme, pomnožujemo tudi del genomske DNA, ki vsebuje vrstno-specifična zaporedja. Tako bi na primer pri testiranju koruznih kosmičev pomnoževali segment, ki nosi zapis za Bt, hkrati pa del gena za zein, ki je značilen samo za koruzo. S tem bi preverili, ali je reakcija PCR sploh potekla, kar je še posebej pomembno v primerih, ko ne moremo dokazati prisotnosti produkta, ki bi kazal na gensko spreminjanje. Pomembno je, da sta produkta pri takem hkratnem pomnoževanju različno dolga, da lahko po elektroforezni ločitvi produktov ugotovimo, katera območja genoma so se v resnici pomnožila.

Eksperimentalno bomo določali vsebnost gensko spremenjene soje v sojinem mleku dveh proizvajalcev. Eden od vzorcev bo iz ZDA, kjer je verjetnost, da v trgovini kupite gensko spremenjeno hrano, največja. Vendar pa na izdelku ni pisalo, da je pripravljen iz gensko spremenjenih rastlin. Drugi vzorec je bil kupljen v eni od ljubljanskih veleblagovnic, na njem pa je pisalo, da je bila soja 'ekološko pridelana'. S PCR bomo pomnoževali dve genomski območji: vstavljeni promotor E35S s sosednjim delom rastlinske DNA (pričakovana dolžina pomnoženega segmenta je 193 bp) ter kot kontrolo del zapisa za sojin lektin (414 bp). Promotor E35S je izboljšana varianta CaMVE35S, ki ima podvojeno ojačevalno zaporedje in zato zagotavlja višjo raven konstitutivnega izražanja. Da pa bi lahko izvedli PCR, bomo najprej morali izolirati DNA. Za izolacijo smo izbrali metodo s kationskim detergentom CTAB.

Postopek:

Izhodiščni postopek je posredovala doc. dr. Kristina Gruden z Nacionalnega inštituta za biologijo.

a) Izolacija genomske DNA

Aparati in pribor

- 1) vodna kopel 65 °C;
- 2) mikrocentrifuga;
- 3) mikrocentrifugirke, 1,5 ml;
- 4) nastavljiva avtomatska pipeta, 200 µl - 1000 µl.

Reagenti in sredstva

- 1) absolutni etanol;
- 2) 70 %-ni etanol;
- 3) kloroform;
- 4) izopropanol;
- 5) pufer s CTAB (2 % heksadeciltrimetilamonijev bromid (CTAB), 1,4 M NaCl, 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, 20 mM EDTA): za 100 ml rabite 2 g CTAB, 8,2 g NaCl, 1,58 g Tris/HCl in 0,75 g Na₂EDTA, dodajte 70 ml deionizirane vode, nastavite pH z 1 M NaOH in dopolnite do 100 ml z vodo. Avtoklavirajte.
- 6) obarjalna raztopina (0,5 % CTAB, 40 mM NaCl): za 100 ml v vodi raztopite 0,5 g CTAB in 0,25 g NaCl in nastavite pH na 8,0 z 1 M NaOH. Avtoklavirajte.
- 7) 1,2 M NaCl (7 g NaCl v 100 ml deionizirane vode; avtoklavirajte);
- 8) 3 M Na-acetat, pH 4,8;
- 9) reagenti za PCR in polimeraza *Taq*;
- 10) avtoklavirana deionizirana voda.

Postopek

1. V dve mikrocentrifugirki odpipetirajte po 100 µl sojinega mleka (zapišite si oznako vzorca za kasnejšo interpretacijo rezultatov).
2. Dodajte 500 µl pufera s CTAB in premešajte.

3. Inkubirajte 30 min v vodni kopeli pri 65 °C.
 4. Centrifugirajte 8 min pri 15 000 g.
 5. V svežo mikrocentrifugirko odpipetirajte 500 µl kloroforma in mu dodajte supernatant po centrifugiranju. *Pazite na kompakten flotant!*
 6. Stresajte 30 s.
 7. Centrifugirajte 5 min pri 15 000 g.
 8. Zgornji (vodni) sloj prenesite v svežo centrifugirko in dodajte 2 V obarjalne raztopine. Premešajte s pipetiranjem.
 9. Inkubirajte vsaj 60 min pri sobni T (ali več dni pri 4 °C).
-
10. Centrifugirajte 5 min pri 15 000 g.
 11. Supernatant zavržite, usedlino pa raztopite v po 175 µl raztopine NaCl (1,2 M) in združite raztopini iz obeh mikrocentrifugirk v eni sami.
 12. Dodajte 350 µl kloroforma in stresajte 30 s.
 13. Centrifugirajte 8 min pri 15 000 g.
 14. Zgornji (vodni) sloj prenesite v svežo mikrocentrifugirko.
 15. Dodajte 0,6 V izopropanola in dobro pretresite.
 16. Centrifugirajte 8 min pri 15 000 g.
 17. Odstranite supernatant (organsko fazo), usedlini pa dodajte 500 µl 70 %-nega etanola.
 18. Previdno stresajte, nato pa centrifugirajte 8 min pri 15 000 g.
 19. Supernatant zavržite (odpipetirajte do zadnjega µl), usedlino pa posušite v vaakumskem koncentradorju (2 min pri 20 °C).
 20. DNA raztopite v 35 µl sterilne deionizirane vode.

b) Določanje vsebnosti DNA v preparatu

Ker se v industrijskem procesu priprave sojinega mleka (homogenizacija v vodi) iz celic sprosti DNA, bo ta prisotna v mleku v taki množini, da je lahko iz 200 µl izoliramo po zgornjem postopku tudi več kot 1 µg. Pričakovana koncentracija rastlinske DNA bo torej ~10 ng/µl. Vendar pa se včasih zgodi, da izhodna surovina vsebuje nekoliko manj DNA, pa tudi v postopku izolacije lahko pride do napak, ki privedejo do nizkih izplenov. Zato je smiselno, da pred izvedbo PCR ugotovimo, koliko DNA smo izolirali.

Zaradi majhnega volumna vzorca spektrofotometrično določanje koncentracije ni izvedljivo, zato bomo določili koncentracijo semikvantitativno preko fluorescence vzorca na agarozni plošči z etidijevim bromidom. Na ploščo bomo na rob nanесли po 2 µl standardnih raztopin (2 µl naj vsebujeta 2 ng, 4 ng, 8 ng, 16 ng, 32 ng, 64 ng in 128 ng DNA), v sredino pa 2 µl DNA, izolirane iz sojinega mleka. Po 20 min na transiluminatorju pri 312 nm primerjamo intenziteto lis in ocenimo, koliko DNA vsebuje naš vzorec.

c) Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Za PCR potrebujemo 50 ng – 100 ng DNA iz sojinega mleka (pričakujemo, da boste to količino imeli v največ 10 µl vzorca). Pripravimo reakcijo v skupnem volumnu 50 µl:

snov	PCR-L [µl]	PCR-P [µl]
vzorec	x	x
puffer, ki že vsebuje Mg ²⁺ (10x)	5 µl	5 µl
mešanica dNTP (vsak dNTP 2,5 mM)	4 µl	4 µl
začetni oligonukleotid GM01 (lektin), 0,2 µM	3 µl	--
začetni oligonukl. GM02 (lektin/reverzni), 0,2 µM	3 µl	--
začetni oligonukleotid GM05 (promotor), 0,2 µM	--	3 µl
začetni oligonukl. GM06 (promotor/reverzni), 0,2 µM	--	3 µl
deionizirana voda (do 49 µl skupnega volumna)		

PCR bo treba izvesti v dveh ločenih reakcijah po spodnji shemi. Vse vzorce najprej inkubirajte 10 min pri 95 °C, nato dodajte 1,5 U DNA-polimeraze *Taq* (0,5 U/μl) in začnite s pomnoževanjem:

	PCR-L	PCR-P
denaturacija	95 °C, 30 s	95 °C, 30 s
prileganje	57 °C, 30 s	62 °C, 30 s
polimerizacija	72 °C, 30 s	72 °C, 30 s
število ciklov	40	40

Po 40 ciklih izvedemo še dokončanje reakcij (7 min, 72 °C), nato pa vzorce ohladimo na 15 °C in jih do uporabe hranimo v hladilniku (lahko tudi več dni).

d) Elektroforezna analiza produktov PCR

Pripravimo 2,2 % agarozni gel z etidijevim bromidom v pufru TAE. Po končanem pomnoževanju reakcijsko zmes oborite z dodatkom 0,1 V 3 M Na-acetata in 2,5 V etanola. Premešajte in centrifugirajte 10 min pri polnih obratih. Supernatant zavržite, oborino pa sperite s 50 μl 70 %-nega etanola. Centrifugirajte 3 min pri polnih obratih. Kvantitativno odstranite supernatant, oborino pa posušite v vakuumskem koncentradorju.

Posušeni oborini dodajte 10 μl pufru TE in 1,5 μl nanašalnega pufru ter nanesite na agarozni gel. Elektroforeza naj teče pri 80 V dokler bromfenolmodro ne pripotuje do 2/3 dolžine gela. Na transiluminatorju detektirajte produkte PCR; če je potrebno, še enkrat pobarvajte DNA z etidijevim bromidom.

Rezultati:

Vzorec naše skupine je bil označen s črko ____.

Iz 100 μl sojinega mleka smo izolirali ____ ng genomske DNA. Koncentracija je torej _____ ng/μl.

Elektroforezno ločitev pomnoženih produktov predstavite s kopijo elektroferograma.

Kaj lahko na osnovi rezultatov PCR poveste o sojinem mleku, ki ste ga analizirali? Opišite tudi rezultate drugih skupin!

Vprašanja za ponavljanje in razmišljanje:

- Katere poljščine najpogosteje gensko spreminjajo? Zakaj ravno te?
- Kateri dve lastnosti najpogosteje najdemo v gensko spremenjenih kmetijskih pridelkih?
- Kaj pomeni oznaka Bt pri gensko spremenjeni koruzi?
- Kako vnesejo nove gene v rastline?
- Kako pride DNA v sojino mleko?
- Kako verjetno je, da bodo v naslednjih letih množično pridelovali Bt-sojo tudi pri nas?
- Katero novo lastnost so vključili v edino gensko spremenjeno koruzo, odobreno za sajenje v Evropski uniji?
- Ali bi bilo smiselno v Sloveniji pridelovati gensko spremenjeno koruzo? Zakaj?
- Izolacija genomske DNA je zapleten proces. Poskusite ga opisati z največ 5 ključnimi stopnjami!
- Zakaj smo izvajali kontrolno pomnoževanje dela zapisa za sojin lektin, saj smo vedeli, kaj smo vzeli kot vzorec?
- Kdo v Sloveniji inšpekcijsko nadzira vsebnost GSO v hrani?
- Za katero hrano je verjetnost, da vsebuje gensko spremenjene surovine, največja?
- Ali bi lahko določili vsebnost gensko spremenjene ogrščice v jedilnem olju? Utemeljite!

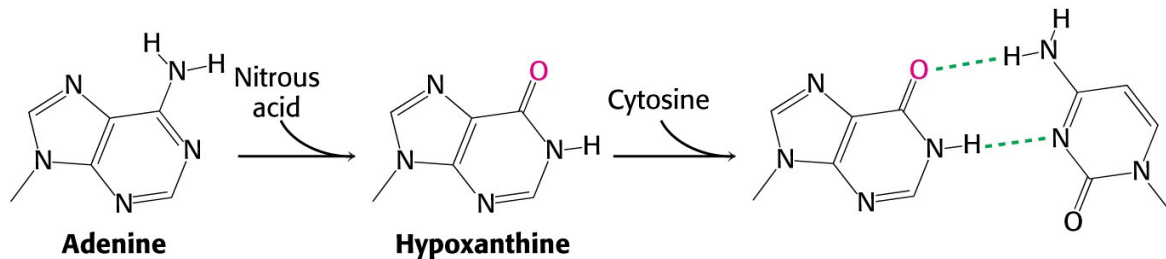
Vira:

Meyer R. in Jaccaud E., Detection of genetically modified soya in processed food products: development and validation of a PCR assay for the specific detection of glyphosate-tolerant soybeans. *Proceedings of Euro Food Chem IX*, September 24-26, 1997, Interlaken, Švica, Vol. 1, Swiss Society of Food and Environmental Chemistry.

Lipp M. *et al.*, Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *Eur. Food Res. Technol.* 212, 497-504 (2001)

5. vaja: Test genotoksičnosti različnih živil

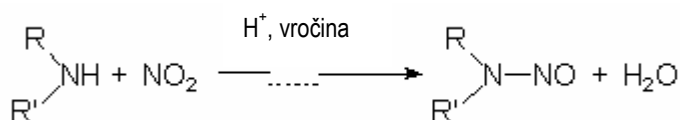
Čeprav naj bi živila vsebovala za zdravje neškodljive snovi so med aditivi tudi take, ki lahko povzročajo mutacije. Tako na primer mesnim izdelkom dodajajo nitrite, ki lahko povzročijo modifikacijo baz: adenin se pod vplivom nitritov spremeni v hipoksantin, ta pa se nato pari s citozinom, kot da bi šlo za gvanin (ne pa modificirani adenin). Tako se ob podvojevanju DNA zamenja ena baza, kaj bo to pomenilo za celico, pa je odvisno od tega, kje v zaporedju je mutirana baza, ali gre za eno od ohlapnih baz ali za kodirajočo, ali gre za zamenjavo aminokislino, ki ima aktivno vlogo v proteinu ali za manj pomembno strukturno aminokislino. Seveda se lahko kemično spremeni več baz v nekem zaporedju, lahko pa prihaja do sinergističnih mutagenih učinkov še z drugimi dodatki v živilih.



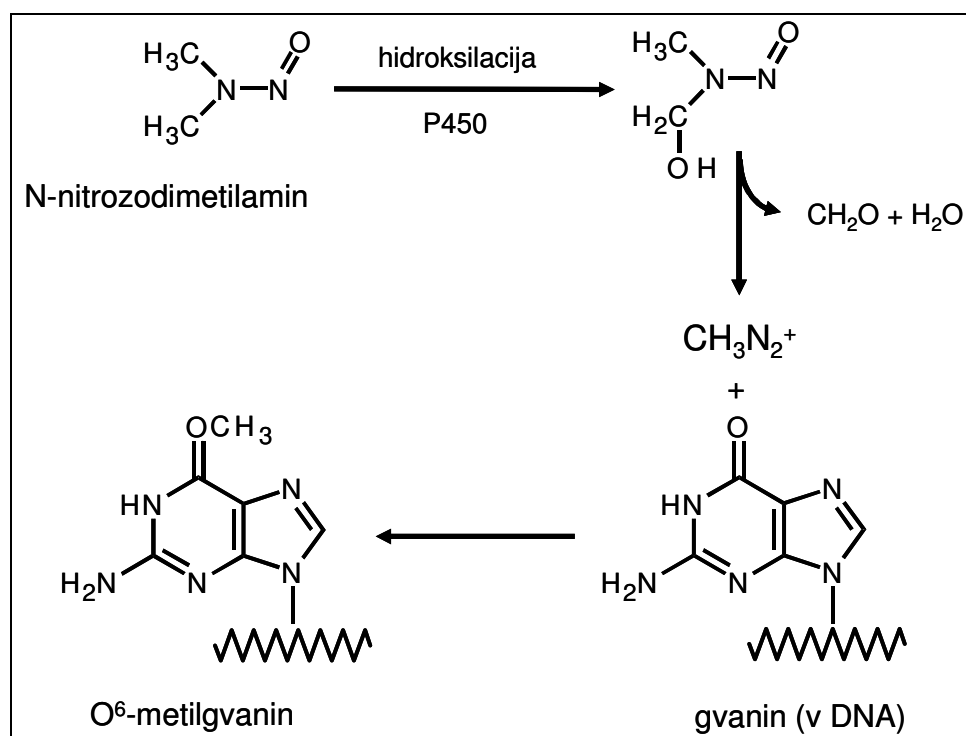
(Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., *Biochemistry*, 5th ed., W.H. Freeman & Co., 2002)

Natrijev nitrit (NaNO_2) uporabljajo v živilstvu že od začetka prejšnjega stoletja, glavni namen uporabe pa je preprečevanje rasti mikroorganizma *Clostridium botulinum* in s tem nastajanja toksina v živilih, deluje pa tudi na druge možne mikrobe v hrani (*Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*). Po letu 1970 pa so ugotovili, da v določenih pogojih nitrit lahko reagira z amini ali amidi in tvori n-nitrozo-spojine, ki so kancerogene. Zato so sprejeli ustrezno zakonodajo, s katero so v ZDA in v evropskih državah prepovedali uporabo natrijevega nitrata, uporabo natrijevega nitrata pa omejili in kot dodatek uvedli še askorbat, ki preprečuje nastajanje nitrozaminov. Študije o karcinogenosti natrijevega nitrata niso imele enotnih rezultatov. Nekaterne raziskave so pokazale, da v živalskih modelih (na miših in podganah) sam natrijev nitrit ni bil kancerogen in da je celo zmanjšal možnost za razvoj levkemije in nekaterih vrst raka pri poskusnih živalih. Epidemiološke študije na ljudeh v devetdesetih letih prejšnjega stoletja pa so sprva kazale na šibko povezavo med zaužitim nitritom in rakom pri majhnih otrocih, kasneje pa so znanstveniki to povezavo ovrgli in danes menijo, da je nitrit v hrani neškodljiv. Upoštevati je treba, da nitriti nastajajo tudi v našem organizmu in to v količinah, ki so bistveno višje, kot jih najdemo dodane mesnim izdelkom. Ob prebavljanju zelenjave zaužiti nitrati prehajajo v nitrite. Več kot 85 % nitrata, ki je posledica prehranjevanja, je v telesu torej naravnega izvora. Tudi sicer imajo nitriti v organizmu fiziološki pomen, saj nas ščitijo pred razvojem mikrobov v ranah in morda celo deluje protitumorsko. Razen tega je lahko pomemben vir vnosa nitrata v telo preko vode, saj so vodni viri različno onesnaženi z nitrati, ti pa se v telesu pretvorijo v nitrite in ob ugodnih pogojih naprej v kancerogene derivate.

Nitrit uporabljajo predvsem pri pripravi šunk, hrenovk in slanine. Oznaka za natrijevo sol je E 250, za kalijevo pa E 249. V živilskih izdelkih je Na-nitrit kot konzervans dovoljeno uporabljati samo v obliki "natrijev nitrit za prehrano" (angl. "food grade", E250), ki sicer lahko vsebuje še okrog 1 % Na-nitrata ter <0.2 % drugih nečistoč. Razen tega, da deluje inhibitorno na rast mikrobov, nitrit tudi ohranja okus in barvo mesa. Skupina $-\text{NO}_2$ v želodcu reagira s kislino in tvori HNO_2 , ta pa modificira aminokislino do nitrozaminov. Podoben postopek lahko poteče pri pripravi mesnih izdelkov. Zaradi velike količine biogenih aminov pri ribah ('vonj po ribah') naj bi ribjega mesa ne obdelovali z nitriti.



Nitrozamini posredno povzročajo metilacijo organskih baz v DNA.



Za določanje genotoksičnosti obstaja več eksperimentalnih sistemov. Med najstarejšimi je Amesov test, ki ga izvajamo na salmonelah z definiranimi okvarami v genomu. V osnovi sevi, ki jih uporabljamo, ne morejo rasti na gojiščih brez dodanega histidina. Po dodatku snovi, ki povzroča mutacije, bodo nekatere bakterije začele rasti na gojišču brez histidina, ker bodo mutacije povzročile popraviljanje okvare. Ker je spekter mutacij/sevov dokaj širok, lahko na osnovi tega, kateri mutirani sevi so najpogosteje revertirali, določimo celo tip mutagenega sredstva. Ker nekatere snovi same po sebi niso mutagene, se pa v mutagene spremenijo v metabolnih poteh po vstopu v telo, je smiselno Amesov test izvajati ob uporabi ekstrakta jetrnih celic. Tak ekstrakt vsebuje veliko encimov, ki bi v organizmu vneseno snov lahko metabolizirali. Na sredino selektivnega trdnega gojišča z razmazanimi bakterijami nato naneseemo testirano snov po tem, ko smo jo nekaj časa pustili v prisotnosti jetrnega ekstrakta. V okolici nanosa bomo našli več revertant kot ob robu plošče. Število revertiranih bakterij je merilo mutagenosti, spekter sevov, pri katerih smo našli največ revertant, pa nam da informacijo o tipu mutagenega sredstva. Pomanjkljivost Amesovega testa je v tem, da analiziramo mutagenost na prokariotskem sistemu, medtem ko nas v resnici najbolj skrbi, ali je neka snov mutagena za človeka.

Sevi bakterij *Salmonella typhimurium* v Amesovem testu imajo razen okvare v biosintezni poti histidina še okvaro v genu *uvrB* (sodeluje pri popraviljanju mutacij z izcepom baze) in v genu *rfa* (sprememba strukture bakterijske stene – zaradi delne izgube lipopolisaharida je permeabilnost za kemikalije povečana). Tipi mutacij, ki so vključene v gene *hisC*, *hisD* in *hisG*, so premik bralnega okvira in substitucije baz. Dodatno v testu uporabljajo tudi sev *E. coli* z okvoro v biosintezi triptofana in mutacijo *uvrA*. Jetrni ekstrakt iz različnih organizmov je mogoče kupiti in ga označuje kratica S9 (oznaka postmitohondrijske frakcije pri centrifugiranju jetrnega homogenata), dodani pa so mu encimski kofaktorji. V testu uporabljajo kot pozitivno kontrolo serijo mutagenih sredstev. Brez aktivacije kot mutageni delujejo 2-nitrofluoren, natrijev azid, mitomicin C, 9-aminoakridin in metilmetansulfonat, ob aktiviranju pa 2-aminofluoren, 1,8-dihidroksiantrakinon, 2-aminoantracen in ciklofosfamid. Za necitotoksične snovi velja, da jih na eno ploščo nanesejo največ 5 mg, test pa za vsako snov izvedejo na najmanj petih različnih sevih (5 različnih mutacij) in s 5 različnimi koncentracijami testne snovi. Natančnejše podatki o izvedbi so na voljo na primer kot Smernice OECD za preizkušanje kemikalij (<http://www.oecd.org/dataoecd/18/31/1948418.pdf>).

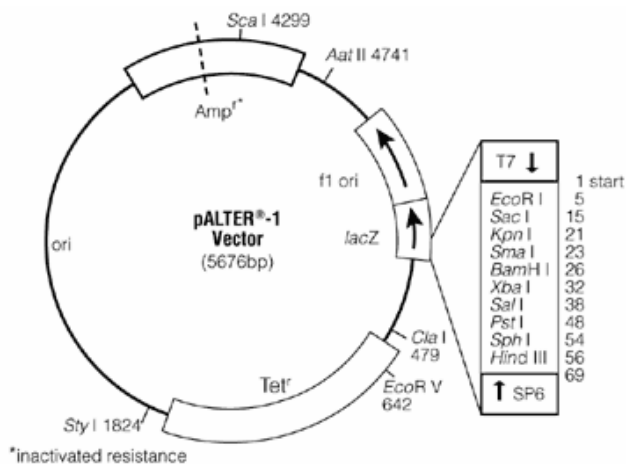
Da bi test mutagenosti dal rezultate, ki bi bili bolj relevantni za človeški organizem, so raziskovalci razvili več testov, ki vključujejo evkariontske celice ali cele organizme. **Mikrojedrni test** običajno izvajamo tako, da preizkušano snov dajemo živim živalim bodisi intraperitonealno, oralno, nanašamo na kožo ali kako drugače, njihove celice pa analiziramo po določenem času. Opazujemo, ali je po dodatku neke snovi prišlo do nastanka mikrojedr – to je jedrom podobnih struktur v celici, ki vključujejo DNA, vendar so po velikosti izrazito manjše kot intaktna jedra. Mikrojedra predstavljajo genski material, ki se ob delitvi ni pravilno vključil v jedro in vsebuje dele kromosomov ali celotne nepravilno razdeljene kromosome. Čeprav testiramo celotne živali, pa običajno analiziramo samo celice kostnega mozga, celice iz periferne krvi ali kakšne druge celice. Pri krvnih celicah so najenostavnejši za analizo eritrociti, ki svoja jedra izgubijo kmalu po tem, ko se razvijejo, mikrojedra pa ostanejo v citoplazmi odraslih eritrocitov. V ZDA je postopek standiriziran pri EPA (Agenciji za zaščito okolja) in se izvaja na eritroblastih miši ali podgan [http://www.epa.gov/docs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/870-5395.pdf]. Test pa lahko izvajamo tudi na gojenih celicah, na primer človeških fibroblastih ali kakšnih drugih celicah, ki jim v rastni medij dodajamo snov, ki jo preizkušamo.

V Evropski skupnosti je za strokovna vprašanja v zvezi z varnostjo živil zadolžen Evropski urad za varnost hrane (European Food Safety Authority; <http://efsa.eu.int/>), ki so ga ustanovili leta 2002 in ima sedež v Parmi v Italiji. Med njegove naloge spada tudi obveščanje potrošnikov. EFSA ima svoj znanstveni odbor in strokovne skupine (za 8 področij), ki izdajajo mnenja o posameznih snoveh, ki jih najdemo v hrani ali ki lahko vanjo zaidejo, pa tudi o gensko spremenjenih rastlinah, ki bi jih proizvajalci želeli prodajati (kot semena za gojenje poljščin ali kot živila, pripravljena iz GS rastlin).

Enostavni test genotoksičnosti na sevu *E. coli* s fagmidom pALTER-1

Princip testa genotoksičnosti na prokariotskih organizmih si lahko ogledamo na poenostavljenem sistemu. Namesto serije sevov z različnimi mutacijami v genih za biosintezo histidina bomo uporabili sev *E. coli*, ki smo ga predhodno transformirali z vektorjem pALTER-1. Gre za fagmid, ki ima funkcionalen zapis za zagotavljanje odpornosti proti tetraciklinu in okvarjen zapis za rezistenco na ampicilin. Tako transformirane bakterije torej rastejo na gojišču s tetraciklinom, ne pa na gojišču z ampicilinom.

Ob dodatku mutagenega sredstva v gojišče lahko pričakujemo, da se bodo mutacije pojavile na različnih mestih, med drugim tudi v zapisih, ki določata obe rezistenci. Zelo redke bodo med drugimi mutacije, ki bodo popravile okvaro v zapisu za β -laktamazo, pojavile pa se bodo mutacije, ki bodo povzročile okvaro zapisa za odpornost proti tetraciklinu. Število sevov, pri katerih bo prišlo do popraviljanja okvarjenega zapisa za β -laktamazo, bomo določili tako, da bomo določeno število bakterij razmazali po agarni plošči, ki bo vsebovala ekstrakt iz živila, za katerega sumimo, da je mutageno.



Plazmidna karta vektorja pALTER-1 (Promega). Mutirano mesto v zapisu za β -laktamazo je označeno s črtkano črto.

Inaktivacijo zapisa za β -laktamazo so dosegli s tem, da so deletirali 4 bazne pare dolg fragment, kar je privedlo do premika bralnega okvira, zato se od mesta mutacije naprej vgrajujejo drugačni aminokislinski ostanki in veriga se verjetno predčasno zaključi. Mutacije, ki bi popravile spremembo bralnega okvira, bi torej morale vstaviti vsaj en bazni par. Prav tako bi lahko do revertiranja fenotipa privedla delecija še dveh baznih parov in to čim bližje tistemu mestu, kjer je bila uvedena prvotna mutacija. Nastali protein bi bil sicer s tem za 2 ostanka krajši, vendar predpostavimo, da ne gre za delecijo v regiji, ki bi bila ključna za aktivnost ali stabilnost encima, ki zagotavlja odpornost proti ampicilinu.

Izvedba eksperimenta:

a) Priprava gojišč

Pripravite po 200 ml gojišča LB, ki vsebuje 1 % peptona (mešanice aminokislin), 0,5 % kvasnega ekstrakta, 1 % NaCl in 1,5 % agarja. Avtoklavirajte in ko se ohladi pod 55 °C, dodajte ampicilin (do 100 μ g/ml) oziroma tetraciklin (do 12,5 μ g/ml) ter nalijte v sterilne plastične petrijevke.

b) Nanos preizkušanih snovi

Vsaj pol ure pred nanosom bakterij nanesite preizkušano snov. Vse skupine nanašajo po 200 μ l testnih snovi, ki predstavljajo:

- A: vodo po kuhanju hrenovk
- B: vodo po kuhanju poltrajnih klobas
- C: suspendirano jetrno pašteto
- D: konzervirani ribani hren
- E: homogenizirane kapeline ("kaviar")
- F: homogenat sesekljanega dimljenega lososa (morskega saja)

Testne snovi razmažite na po eno ploščo LBA in LBT. Nanesite jih s pipeto (pri C uporabite modri nastavek z odrezano konico) in razmažite po celotni površini gojišča s steklenim trianglom. Pustite napol odprt pokrov, da se testne snovi vpijejo v gojišče.

c) Nanos bakterij

Prekonočni kulturi celic *Escherichia coli* DH5 α s fagmidom pALTER-1 (pripravil jo bo asistent) določite A₅₅₀ in na osnovi dobljene vrednosti ocenite gostoto celic. Na vsako od testnih plošč razmažite po 1×10^9 celic. Počakajte, da se celična kultura popolnoma vpije v gojišče. Pripravite tudi kontrolni poskus, v katerem razmažete enako količino celic na plošči LBA in LBT, na kateri niste nanesli preizkušanih sestavin.

d) Rast / mutageneza in analiza rezultatov

Celice na testnih gojiščih naj rastejo pri 37 °C vsaj 20 ur. Nato preštejte ali ocenite, koliko kolonij je zraslo na ploščah z ampicilinom in koliko na ploščah s tetraciklinom.

Rezultati:

Testne snovi in zrasle kolonije na ploščah:

vzorec	opis vzorca	št. kolonij na LBT	št. kolonij na LBA
1			
2			
kontrola			

Med vsemi vzorci je najmočnejši mutagen v uporabljenem testu _____. To lahko trdimo zato, ker _____.

Ali bi pričakovali, da bi bil isti vzorec najbolj mutagen tudi, če bi izvedli mikrojedrni test? Zakaj?

Zanimivosti:

Nemški recept za pripravo dobrih domačih jetrnih klobas v mesnopredelovalnem obratu

[<http://www.igfsek2.de/nahrung/wurst.htm>]:

28 % svinjskih parkljev, 28 % slanine, 14 % mesa in kože svinjskih glav, 23,3 % svinjskih jeter, 6,5 % vroče vode. Zmeljemo in na 1 kg dobljene mase dodamo: 20 g soli za klobase (vsebuje Na-nitrit), 7 g sredstva "Rosipur" (biološko aktivni sladkor na osnovi laktoze), 1 g preparata "Smak S" (ojačevalec okusa za meso in mesne izdelke), 1 g preparata "PöK extra stark BL" (stabilizator za mesne izdelke), 5 g preparata "Lemal" (emulgator za jetrne izdelke), 4 g začimbne mešanice za jetrne klobase "Altmeister", 0,5 g emulzificirane začimbe z okusom ocvrte čebule.

Malo drugačen je recept za hrenovke (vir: vaja pri predmetu Tehnologija mesa na Biotehniški fakulteti UL,

[<http://www.bf.uni-lj.si/zt/meso/vaja3/hrenovka.htm>]): 30 % govejega mesa, 16 % svinjskega

mesa, 24 % slanine, 30 % ledu, 1,7 % nitritne soli, 2 % sojinega izolata, 0,7 % dodatka "mesol univerzal K" (vsebuje fosfate, sladkor in izoaskorbat), 0,3 % začimbne mešanice za hrenovke.

Vprašanja za ponavljanje:

- Zakaj dodajajo nitrite mesnim izdelkom?
- Kateri so viri nitritov v telesu?
- Kako delujejo nitriti na organske baze v DNA? Ali lahko delujejo tudi na RNA? Razložite!
- Kako bi določili vsebnost nitritov v živilskih izdelkih z mikrobiološkimi in kako s kemijskimi tehnikami?
- Kako bi izvedli test, v katerem bi želeli ugotoviti, koliko bakterij (od 10^{10}) je izgubilo odpornost proti tetraciklinu, okvarjen pa imajo tudi zapis za β -laktamazo?
- Katere so slabosti enostavnega testa (kot ste ga izvajali) v primerjavi z Amesovim testom?
- Ali je fagmid v bakterijski celici prisoten v enoverižni ali dvoverižni obliki? Razložite!
- Ali bi bilo bolj smiselno test izvajati v sevu, ki bi imel okvarjene gene za proteine, ki sodelujejo pri popravljanju mutacij?
- Če ste ugotovili, da je prišlo do popravljanja mutacije v zapisu za rezistenco proti ampicilinu, poskušajte razložiti, za kakšno vrsto mutacij je pri tem lahko šlo in katere snovi so jo lahko povzročile!

6. vaja: Imunološko določanje patogenih mikroorganizmov v hrani (teoretična vaja)

V proizvodnji hrane se je težko izogniti vnosu nekaterih mikroorganizmov v izdelke, saj je skoraj nemogoče organizirati proizvodnjo v aseptičnih pogojih. Mikroorganizmi so prisotni v izhodnih surovinah (sadje, meso, mleko), seveda pa tudi v okolju, kjer hranijo pridelke in živila. Proizvodnja v razumni meri poskuša iz izdelka odstraniti čimveč mikroorganizmov, v celoti pa je to sorazmerno preprosto le pri izdelkih, ki dobro prenesejo sterilizacijo v embaliranem stanju (razne konzerve). Seveda obstajajo tudi živila, kjer je prisotnost ustreznih mikroorganizmov zaželena – pomislite samo na pripravo jogurtov, sirov ali kislega zelja. Tam je treba skrbeti za to, da so v živilu samo izbrani mikroorganizmi.

Nekateri mikroorganizmi v živilstvu so zelo trdoživi, saj sporilirajo, spore pa se lahko začenjajo razraščati šele kasneje, ko je živilo že v skladišču ali na policah trgovin. Misliti pa je treba tudi na stabilnost živila pri potrošnikih.

Razrast mikrobov delno preprečujejo same lastnosti živila; na primer visoke stopnje sladkorja v marmeladah ali nizek pH pri izdelkih, ki nastajajo s kisanjem. Jogurti zato veljajo kot higiensko neoporečna živila tudi v krajih, ki jih imamo sicer za nevarne za razvoj črevesnih bolezni. Pri veliki večini živil pa je treba skrbeti za mikrobiološko neoporečnost v procesu priprave.

Za potrošnike je gotovo najbolj moteča prisotnost patogenih mikroorganizmov, med katerimi je na najslabšem glasu – zaradi svojega izredno močnega toksina – bakterija *Clostridium botulinum*. Seveda pa so vsaj neprijetne tudi bakterije iz rodov *Salmonella*, patogeni sevi iz rodu *Escherichia*, *Listeria monocytogenes*, bakterije iz rodov *Campylobacter* in *Arcobacter*, bakterije, ki proizvajajo enterotoksine (*Staphylococcus*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*), sporiformne bakterije (razen *C. botulinum* še *C. perfringens* in razne vrste iz rodu *Bacillus*). Ob teh je treba omeniti tudi možnost okužbe z virusi, paraziti (*Cryptosporidium*, *Giardia*, *Cyclospora*), možno prisotnost toksogenih gliv ali bakterije *Mycobacterium paratuberculosis*.

Živila patogenih mikroorganizmov ne smejo vsebovati, zato je njihovo prisotnost (oziroma odsotnost) treba redno kontrolirati. Tudi nepatogenih mikrobov v hrani ne sme biti v takem številu, da bi povzročali spremembe organoleptičnih in biokemijskih lastnosti hrane.

Načini detekcije mikroorganizmov v živilih

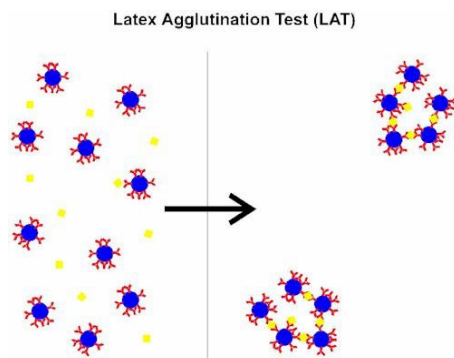
Mikroorganizme seveda lahko zaznamo z mikrobiološkimi metodami – te tehnike so najstarejše in dokaj zanesljive, čeprav so pogosto dolgotrajne in zahtevajo pripravo posebnih gojišč, ki omogočajo rast točno določenim vrstam mikroorganizmov. Prisotnost mikroorganizmov lahko zaznamo tudi z genetskimi testi – posredno preko detekcije mikrobne DNA. Seveda bi pri tem najprej pomislili na metodo PCR in uporabo specifičnih oligonukleotidov. Laboratorij mora za take analize biti ustrezno opremljen, velika pa je nevarnost kontaminacije. Tretji pogost način zaznavanja prisotnosti predvsem patogenih mikroorganizmov je s pomočjo imunoloških metod. Običajno teste kupimo kot optimizirane komplete reagentov, saj je z njihovo pomočjo izvedba zelo preprosta, rezultat pa nedvoumen. Med tako imenovane hitre teste štejemo tudi mikroskopsko štetje fluorescenčno označenih mikrobov, metode, ki vključujejo pretočno citometrijo in nekatere nove metode, ki so še v fazi razvoja, to so uporaba biosenzorjev, mikromrež itd.

Optimalen sistem za zaznavanje in vrednotenje mikroorganizmov v hrani bi moral biti visoko občutljiv, visoko specifičen, visoko ponovljiv, hiter, robusten in poceni. Vendar pa doslej še niso razvili postopka, ki bi izpolnjeval vse našete pogoje. Razen mikrobioloških metod dandanes največ uporabljajo postopke na osnovi PCR in na osnovi ELISA.

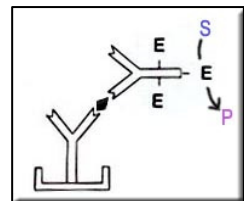
Imunološki testi

Uporabljamo monoklonska, poliklonska ali rekombinantna protitelesa, sistemi detekcije pa so različni: radioaktivni, fluorescenčni, luminiscenčni in encimski. Zaradi svoje enostavnosti so uporabni tudi aglutinacijski testi, ki služijo predvsem za kvalitativno določanje, ne pa za kvantificiranje prisotnosti določenih patogenih mikroorganizmov v hrani.

Med prvimi komercialno dostopnimi kompleti za imunološko določanje prisotnosti mikrobov v živilih so bili aglutinacijski testi za določanje salmonel na osnovi lateksa. Obarvane delce lateksa prekrivajo specifična protitelesa, ki ob prisotnosti tarčnega antigena povzročijo sprijemanje delcev, kar zaznamo s prostim očesom.



ELISA zahteva več laboratorijske opreme, zato pa so rezultati kvantitativni. Tudi za ta sistem obstaja veliko kompletov reagentov za določanje prisotnosti bakterij iz rodov *Listeria*, *Salmonella*, seva *E. coli* O157, stafilokoknega enterotoksina, diarejnega toksina iz bakterij rodu *Bacillus* itd. Čeprav štejemo imunološke metode za dokaj občutljive, pa so meje detekcije pogosto okrog 10^4 - 10^6 celic/ml vzorca. Zato moramo pred izvedbo testa izvesti obogatitev vzorca, s tem pa celoten čas izvedbe naraste na dva do tri dni. To je še vedno hitreje kot klasične mikrobiološke metode, za katere rabimo 3 – 5 dni. Imunološke hitre teste so večinoma razvili pred letom 1990, mnoge pa še vedno izboljšujejo. Za mnoge patogene mikroorganizme je tolerančna meja prisotnosti v živilih nič, kar pomeni, da v dveh 25-gramskih vzorcih živila ne sme biti prisotnega niti ene kolonijske enote (cfu). Pri takih zahtevah pa je potrebna vsaj ena stopnja obogatitve vzorca, inkubacija pa traja vsaj 6 h - 48 h. Izvedba ELISA je najpogostejša v obliki sendviča.



Za določanje nekaterih pogostih mikroorganizmov so proizvajalci razvili standardizirane polavtomatske postopke na osnovi ELISA, tako da prodajajo aparaturo, ki izvede večino pipetiranja, spiranje in odčitavanje rezultatov.



Poenostavljeni imunološki testi na osnovi imunokromatografije v zadnjem času uporabljajo tehnologijo lateralnega pretoka, pri kateri so na nosilcu 3 reakcijske celice. V prvi je protitelo, vezano na obarvan nosilec. Po dodatku tekočega vzorca, ki vsebuje antigen, nastane kompleks antigen-protitelo, ki kapilarno potuje v drugo celico, kjer ga ustavi drugo protitelo in nastane obarvana lisa. Prebitek protiteles potuje v tretjo celico, kjer ga veže tretje protitelo in tvori kontrolno liso. (Tako delujejo tudi hitri testi nosečnosti.)

Tržišče analitike živil je po nekaterih ocenah veliko 1,1 milijarde EUR, trenutno pa ga obvladuje okrog 50 podjetij. 2/3 vseh nakupov opravijo v Evropi in ZDA. Mikrobiološki testi pokrivajo približno polovico tržišča (še vedno okrog 85 % analiz vključuje štetje mikroorganizmov na selektivnih gojiščih), hitre metode pa zaenkrat le 20 %.

DODATEK:

Naloga za prosti čas

Tehnični direktor mesnopredelovalnega podjetja v katerem ste se zaposlili kot vodja analiznega laboratorija vam je naročil, da pripravite polmikro-postopek za določanje čistih beljakovin v lovski pašteti. Doslej so namreč 30 let uporabljali makro-postopek za določanje skupnih beljakovin po Kjeldahlu, kar pa dandanes ni več moderno. Uporabiti je treba postopek, kot je predpisan s pravilnikom, samo napisati ga je treba tako, da ga bo vaš laborant lahko izvedel samostojno.

Načrtajte torej poskus na osnovi objavljene metode! Predstavljajte si izvedbo povsem praktično: s čim bi odvzeli reagente, kam bi jih prenesli, katere aparature in reagente bi rabili, kako dolgo bi poskus trajal in na kaj bi bilo treba še posebej paziti? Napišite postopek po točkah – podobno kot so napisana navodila za vaje! (Kolega iz skupine naj pregleda in komentira ustreznost vaših navodil - pri tem naj razmišlja kot laborant s 35 leti delovne dobe!)

Metoda:

[http://www.uradni-list.si/priloge/RS_-2003-084-03999-OB~P008-0000.PDF (april 2004)]

1. Raztopina bakrovega sulfata: 60 g kristalnega bakrovega sulfata ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) raztopimo v 1 litru vode;
2. Raztopina natrijevega hidroksida: 12,5 g natrijevega hidroksida raztopimo v 1 l vode;
3. 10 %-na raztopina kalijevega ferocianida;
4. 10 %-na raztopina barijevega klorida;

Postopek

Približno 50 g ($\pm 0,1$ g) mesa ali izdelkov posušimo toliko, da jih je mogoče zdrobiti (da gredo skozi sito z 1 mm odprtinami). Tako posušeno snov stehamo, da bi mogli dobljene rezultate preračunati na originalni vzorec; 1 do 2 g ($\pm 0,001$ g) posušene snovi prekuhamo v čaši s 30 ml vode in pustimo še 10 minut v vodni kopeli. Nato dodamo 25 ml raztopine bakrovega sulfata in z mešanjem 25 ml raztopine natrijevega hidroksida. Pri tem nastaja zelenkasta usedlina bazičnih beljakovinskih soli. Pustimo da se usedlina sesede, nato tekočino nad njo previdno odlijemo. Usedlino pa nekajkrat dekantiramo z vodo in končno prenesemo na filtrirni papir. Usedlino na filtru izpiramo z vročo vodo, dokler filtrat ne reagira negativno na baker s kalijevim ferocianidom ali na žvepleno kislino z barijevim kloridom. Filtrirni papir mora biti brez dušika, kar ugotovimo s slepim poskusom. Popolnoma izpran filtrirni papir z usedlino prenesemo v Kjeldahlovo bučo, dodamo 25 ml koncentrirane žveplene kisline in postopek nadaljujemo po Kjeldahlovi metodi.

Račun

Pri izračunu vsebine čistih beljakovin v originalnem vzorcu moramo upoštevati izgubo teže pri predhodnem sušenju. Vsebino dušika oziroma beljakovin izračunamo tako, kot je navedeno za določanje celotnih beljakovin.