



**Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická,  
Purkyňova 464/118, 612 00 Brno**

## **DISERTAČNÍ PRÁCE**

### **AUTOREFERÁT**

# **IDENTIFIKACE DNA ROSTLINNÝCH A ŽIVOČIŠNÝCH DRUHŮ V POTRAVINÁCH POUŽITÍM POLYMERÁZOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCE**

Dizertační práce byla sepsána v rámci doktorského studijního programu na Vysokém učení technickém v Brně na ústavu Chemie potravin a biotechnologií v prezenční formě studia.

**Uchazeč:** Ing. Jiří Šmíd  
Ústav chemie potravin a biotechnologií  
FCH VUT Brno

**Školitel:** RNDr. Tomáš Kuchta, CSc.  
Oddělení mikrobiologie a molekulární biologie  
VÚP Bratislava

**Oponenti:**

## ÚVOD DO PROBLEMATIKY

Vzrůstající počet potravinových alergií je stále vážnějším zdravotnickým problémem. Výzkumné studie poukazují na rostoucí počet alergií u světové populace, proto je potřebné věnovat této problematice odpovídající pozornost.

Při předcházení alergickým reakcím mají pacienti jen jednu možnost a to úplně vyloučit konzumaci potravin obsahujících daný alergen. Spotřebitel musí být tedy informován o všech složkách potravin, které jsou dostupné v obchodní síti. Pro výrobce potravin vyplývá povinnost označovat všechny složky nacházející se v potravinářském výrobku. To vede k potřebě tyto údaje na obalech ověřovat testováním potravin, jsou tedy nutné citlivé a spolehlivé metody na detekování jednotlivých alergenů v potravinách a potravinářských výrobcích. První takové metody se zaměřovaly na analýzu proteinů, nyní je v centru zájmu vhodnější marker – DNA. Ta je přítomna v každém živočišné i rostlinné tkáni, specifické určení přítomnosti alergenů je tak možné i tehdy, když se v technologickém procesu zpracování suroviny poškodí alergenická složka. K analýze DNA slouží především PCR a její různé varianty.

Polymerázová řetězová reakce je metoda na rozmnožení definovaného úseku DNA v podmínkách *in vitro*. Proces amplifikace je analogický replikaci DNA probíhající v živých organizmech. Pomocí PCR je možné vytvořit desítky milionů kopií úseku DNA v průběhu několika desítek minut.

V posledních letech se ve výzkumu a analytické praxi čím dál více používá real-time PCR, což je PCR s průběžným monitorováním fluorescence. Zdrojem fluorescence je komplex DNA s interkalačním barvivem, nebo různé označené sondy nebo primery. K hlavním výhodám real-time PCR patří minimalizace rizika kontaminace laboratorního prostředí amplifikovanými fragmenty DNA díky uzavřenosti systému a možnosti kvantifikace specifického fragmentu DNA na základě průběhu amplifikačních křivek. Mezi další výhody patří zkrácení celkového času potřebného na analýzu a vyloučení manipulace s elektroforetickými gely.

## CÍLE

Cílem práce bylo navrhnout, vyvinout a otestovat metody na detekci potravinových alergenů rostlinného původu. Tyto alergeny lze analyzovat dvěma metodami, přímo a nepřímo. Přímá metoda je orientována na konkrétní proteiny způsobující alergii. V důsledku různých procesů při výrobě potravinářských produktů jako například změny teploty, pH, iontové síly a podobně, se mění rozpustnost proteinů a jejich detekce je obtížná. Nepřímá metoda je

orientována na jiný, stabilnější a odolnější marker – DNA. K analýze DNA se používá PCR a její různé varianty. V naší práci jsme proto zvolili jako marker pro detekci alergenů DNA, konkrétně specifické úseky vybraných genů příslušných alergenů.

Zaměřili jsme se na tři potravinové alergeny – soju, mandle a pistácie. Pro soju bylo cílem vyvinout kvantitativní metodu, pro mandle a pistácie kvalitativní metodu.

## MATERIÁL A METODY

### Sója

Testované potraviny byly zakoupeny v běžné maloobchodní síti v ČR a SR. Semena sóje byla zakoupena ve specializovaném obchodě se semeny v SR. Rostliny sóje byly vypěstovány z těchto semen v běžných pokojových podmínkách.

Sojový koncentrát Arcon S a sojový izolát Pro Fam byly získány od firmy Amitco (Brno, Česká republika), sojová okara byla od firmy Sojaprodukt (Drietoma, Slovensko). Modelové vzorky masové paštiky s definovaným obsahem sojového koncentrátu, izolátu nebo okary (složení viz tab. 1) byly připraveny v koncentracích 10; 5; 2; 1; 0,5; 0,2; 0,1; 0,05; 0,02 a 0,01 % w/w.

*Tabulka 1: složení sojového izolátu Pro Fam, sojového koncentrátu Arcon S a sójové okary.*

	<b>Pro Fam 974</b>	<b>Arcon S</b>	<b>okara</b>
proteiny	85 % - 90 %	66 % - 72 %	25 %
tuky	4 %	2 %	8 – 15 %
sacharidy	1 %	20 %	50 %
vlhkost	6 %	6 %	5 %
popel	5 %	5 %	5 %

Pro další analýzy jsme provedli extrakci DNA všech používaných vzorků pomocí komerční soupravy GeneSpin (GeneScan), DNAeasy Plant Mini Kit (Qiagen), Wizard (Promega) a validovaného postupu CTAB (ISPRA–JRC) s úpravami. Provedli jsme optimalizaci extrakčních metod.

Kvantifikace DNA je důležitým krokem pro značnou část praktické molekulární biologie. Koncentrace nukleových kyselin lze stanovit několika různými metodami. Mezi nejpoužívanější patří UV spektrofotometrické stanovení (spektrofotometr Gene Quant od firmy Biochrom, Cambridge, Anglie) a fluorimetrické stanovení koncentrace (barvivo PicoGreen<sup>®</sup> s použitím soupravy DNA Quant-iT<sup>™</sup> od firmy Invitrogen, Carlsbad, California,

USA a měření fluorescence probíhalo na fluorimetru Safire2 od firmy Tecan, Grödig bei Salzburg, Rakousko).

### Detekční systém

Na detekci sóje v potravinách byly použity primery a sonda orientované na gen *lec* kódující lektin specifický pro sóju. Na tuto cílovou sekvenci byl orientovaný PCR systém s primery Le2F a Le2R a sonda Le2P. Navržená sonda byla typu TaqMan (tab. 2). Systém byl navržen tak, aby nebyl homologický s žádnou sekvencí u příbuzných druhů rostlin v databázi Genbank.

Tabulka 2: detekční systém sóje v masových výrobcích.

	označení	sekvence (5' – 3')
B	Le2F	CCA GCT TCG CCG CTT CCT TC
	Le2R	GAA GGC AAG CCC ATC TGC AAG CC
	Le2P	FAM-CTT CAC CTT CTA TGC CCC TGA CAC-TAMRA

### Amplifikace DNA, real-time PCR

Na kvalitativní i kvantitativní analýzu extrahované DNA byla použita amplifikace vybraných specifických úseků genu pro sojový lektin s pomocí real-time PCR. Reakční směs pro real-time PCR specifickou pro sóju obsahovala 1x reakční tlumivý roztok pro PCR, 2,5 mmol.l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mmol.l<sup>-1</sup> směsi dNTP (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), 300 pmol.l<sup>-1</sup> každého primeru Le2F a Le2R, 200 nmol.l<sup>-1</sup> sondy Le2P (syntetizované MWG Operon, Ebersberg, Německo), a 1 U Cheetah hot start Taq DNA polymerázy (Biotium, Hayward, California, USA). Celkový objem reakční směsi i s přidanou DNA činil 25 µl. Reakce probíhala v termocyklerech GeneAmpR PCR Systém 7900 (Applied Biosystems), nebo iQ5 Multicolor Real-Time PCR (Bio-Rad, Hercules, USA).

### Kontrola amplifikovatelnosti DNA

Kvalita izolované DNA (ve smyslu amplifikovatelnosti) byla ověřena v každé vzorce DNA pomocí real-time PCR s univerzálními eukaryotickými primery TR03, TR04 a sondou TRPb orientovanými na gen 18S rRNA [10] (tab. 3).

Tabulka 3: sekvence primerů a sondy na ověření amplifikovatelnosti DNA.

označení	sekvence (5'-3')
TR03	TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA
TR04	AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT
TRPb	FAM-CCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAACC-TAMRA

### **Pistácie**

Testované potraviny byly zakoupeny v běžné maloobchodní síti v ČR a SR. Modelové vzorky (medvědí tlapky) s definovaným obsahem pistácií byly připraveny v koncentracích 0; 0,0004; 0,002; 0,01; 0,05; 0,4; 2 a 10% (w/w). Nejprve byla připravena směsná pasta vlašských ořechů a pistácií, kde byl pistáciiový podíl 0; 0,004; 0,02; 0,1; 0,5; 4; 20 a 100 % (w/w). Poté každá směsná pasta byla smíchána s těstem v poměru 1:9 na výslednou koncentraci pistácií uvedenou výše.

### **Izolace a purifikace DNA**

DNA byla extrahována stejnými postupy popsány v kapitole o sóji – na izolaci DNA ze zelených částí rostlin byla použita metoda DNeasy Plant Mini Kit, pro izolaci DNA z potravinových vzorek včetně modelových vzorek s definovaným obsahem pistácií byla použita metoda NucleoSpin Food (Macherey-Nagel, Düren, Německo) – stejný postup jako u GeneSpin (jen dodaný od jiné firmy). Princip obou metod je stejný – chaotropická extrakce na tuhé fázi. Postup izolace je také obdobný – navážení vzorku, následná lyze buněk, dále navázání DNA na silikagelovou kolonku, promývání kolonky a nakonec eluce DNA, vše za použití vhodných pufrů.

### **Stanovení koncentrace**

Koncentrace a čistota izolované DNA byla změřena na základě absorbance při vlnové délce 260 nm na spektrofotometru (Gene Quant, Biochrom, Cambridge, Anglie) a fluorimetricky s použitím interkalačního barviva PicoGreen s použitím soupravy DNA QuantIt (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) na fluorimetru Safire2 (Tecan, Grödig bei Salzburg, Rakousko). Podrobnější popis opět viz kapitola o sóji.

### **Detekční systém**

Na detekci pistácií v potravinách byly použity primery a sonda orientované na gen *COR* kódující dehydrin, což je skupina stresových proteinů produkovaných jako reakce na chlad a sucho, patřících do rodiny ochranných strukturních proteinů Lea D11 (late embryogenesis

abundant). Na tuto cílovou sekvenci byl orientovaný PCR systém s primery PmanuF3B a PSTCR7 a se sondou PST. Sonda byla typu TaqMan (tab. 4). Systém byl navržen tak, aby nebyl homologický s žádnou sekvencí u příbuzných druhů rostlin v databázi Genbank. Reverse primer byl navržen s ohledem ke skutečnosti, že byl nově objeven intron v sekvenci genu. Nově byla také navržena sonda, pomocí níž se podařilo odstranit malé problémy s křížovými reakcemi, které se projevily při použití univerzálního barviva SYBR<sup>®</sup> Green.

Tabulka 4: detekční systémy sóje v potravinách.

označení	sekvence (5'-3')
PmanuF3B	CGTAGAGAAGAAGCACCAGGAT
PSTCR7	GCTTTTCTTTATACCTATATTGGGATG
PSTCPb	FAM-TCACGGCTGCTGATGTGGCC-BHQ

### Amplifikace DNA, real-time PCR

Na kvalitativní analýzu extrahované DNA byla použita amplifikace vybraného specifického úseku genu *COR* pro dehydrin s pomocí real-time PCR. Reakční směs pro real-time PCR specifickou pro pistácii obsahovala 1x reakční tlumivý roztok pro PCR, 2,5 mmol.l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mmol.l<sup>-1</sup> směsi dNTP (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), 300 pmol.l<sup>-1</sup> každého primeru PmanuF3B a PSTCR7, 200 nmol.l<sup>-1</sup> sondy PST (syntetizované MWG Operon, Ebersberg, Německo), a 1 U Cheetah hot start Taq DNA polymerázy (Biotium, Hayward, California, USA). Celkový objem reakční směsi i s přidanou DNA činil 25 µl. Reakce probíhala v termocykleru GeneAmpR PCR Systém 7900 (Applied Biosystems).

### Kontrola amplifikovatelnosti DNA

Kvalita izolované DNA (ve smyslu amplifikovatelnosti) byla ověřena v každé vzorce DNA pomocí real-time PCR s univerzálními eukaryotickými primery TR03, TR04 a sondou TRPb orientovanými na gen 18S rRNA [10] (tab.3).

### Mandle

#### Izolace a purifikace DNA

DNA byla extrahována stejnými postupy popsány v kapitole o sóji – na izolaci DNA ze zelených částí rostlin byla použita metoda DNeasy Plant Mini Kit, pro izolaci DNA ze semen mandlí byla použita metoda NucleoSpin Food (Macherey-Nagel, Düren, Německo) – stejný

postup jako u GeneSpin (jen dodaný od jiné firmy). Princip obou metod je stejný – chaotropická extrakce na tuhé fázi. Postup izolace je také obdobný – navážení vzorku, následná lyze buněk, dále navázání DNA na silikagelovou kolonku, promývání kolonky a nakonec eluce DNA, vše za použití vhodných pufrů.

### Stanovení koncentrace

Koncentrace a čistota izolované DNA byla změřena na základě absorbance při vlnové délce 260 nm na spektrofotometru (Gene Quant, Biochrom, Cambridge, Anglie) a fluorimetricky s použitím interkalačního barviva PicoGreen s použitím soupravy DNA QuantIt (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) na fluorimetru Safire2 (Tecan, Grödig bei Salzburg, Rakousko). Podrobnější popis opět viz kapitola o sóji.

### Detekční systém

Na detekci mandlí v potravinách byly použity primery a sondy orientované na různé geny (tab. 5):

- systém A na gen Pru1 kódující protein zásobní protein prunin [29]
- systém B na gen AL60SRP kódující ribosomální podjednotku 60S P2 [12]
- systém C na gen nsLTP kódující transportní protein LTP (lipid transfer protein) [42]
- systém D na gen Pru du 2 kódující stresové proteiny TLP (thaumatin-like protein)
- systém E na gen ACO1 kódující 1-aminocyklopropan 1-karboxyl oxidázu (komerční kit SURE<sup>®</sup> Food ALLERGEN Almond od firmy Congen, Berlin, Germany)

Tabulka 5: detekční systémy mandlí v potravinách.

	označení	sekvence (5'-3')
A	Pru1-1F Pru1-1R Pru1-1P	CCAAATCATCCAGGTAAGGG CTTGTTGTTGCCTCTCCTG FAM-TCCTGTTGTCGCTCCTCGTGCT-BHQ1
B	Prd5-1F Prd5-1R	GGTTGTTGCAGCATACTTGTTGGC GGACATCCTTGGCTCTGTTGGAGC
C	Pd nsLTP S Pd nsLTP AS M Pd target AS probe	GAGTCAACCCTAACAATGCCGC CAGTTGGTGGAGGGGCTATTCTG FAM-TTAACTCCACACTTGCCGGGAAGCG-BHQ1
D	ThauF ThauR	ACTGAGCACACGGAATAT TAGGATGCCGTGCGTAGC
E	cox F cox R	CGCTTAAAGTAATTATGGGTGTGAAG GAAACTAACAATTCCCAGGTCCG

### **Amplifikace DNA, real-time PCR**

Na kvalitativní analýzu extrahované DNA mandlí byly použity různé systémy primerů, některé se sondou, jiné s univerzálním interkalačním barvivem SYBR<sup>®</sup> Green, vždy jako real-time PCR. Reakční směsi se lišily podle přítomnosti nebo nepřítomnosti oligonukleotidové fluorescenčně značené sondy. Celkový objem reakční směsi i s přidanou DNA činil 25  $\mu$ l. Reakce probíhala v termocykleru GeneAmpR PCR System 7900 (Applied Biosystems).

### **Kontrola amplifikovatelnosti DNA**

Kvalita izolované DNA (ve smyslu amplifikovatelnosti) byla ověřena v každé vzorce DNA pomocí real-time PCR s univerzálními eukaryotickými primery TR03, TR04 a sondou TRPb orientovanými na gen 18S rRNA [10] (tab. 3).

### **Příprava DNA na sekvencování**

#### ***Příprava PCR produktu***

Klasickou PCR (end-point PCR) bylo připraveno dostatečné množství PCR produktu určeného k sekvenování. PCR produkt byl ověřen gelovou elektroforézou a poté purifikován pomocí kitu Quiaquick PCR purification kit.

#### ***Purifikace PCR produktu***

K celkovému objemu PCR produktu bylo přidáno 5 objemů PB pufru. Tato směs byla nanesena na spin kolonku a centrifugována 1 min při 13 000 g. Supernatant byl odstraněn a kolonka naplněna promývacím pufrem PE (750  $\mu$ l). Opět byla centrifugována 1 min při 13 000 g. Supernatant byl odstraněn a prázdná kolonka umístěná v mikrozkuhavce centrifugována 1 min při 13 000 g. Kolonka byla umístěna do nové 1,5 ml mikrozkuhavky a bylo do ní napipetováno 50  $\mu$ l elučního EB pufru. Po centrifugaci 1 min při 13 000 g byl takto získán purifikovaný PCR produkt.

#### ***Vložení PCR produktu do plazmidu pDrive***

PCR produkt byl vložen do plazmidu pomocí QUIAGEN PCR cloning kit. Nejprve bylo připraveno dostatečné množství ledu. Poté byly rozpuštěny komponenty kitu (2x Ligation Master Mix, pDrive Cloning Vector DNA, destilovaná voda) a umístěny do vaničky s nadrceným ledem. Byla připravena ligační směs, která byla zlehka promíchána pomocí mikropipety. Tato směs byla inkubována 2 hod v ledničce a poté umístěna v mrazáku při teplotě -20°C.

#### **3.3.6.4 Příprava kompetentních buněk**

Nejprve byly připraveny živné půdy potřebné pro buňky *E. coli* použité k transformaci.

1. den byly naočkovány buňky *E. coli* DH5 $\alpha$  (ze zásobní mikrozkušavky s glycerolem uložené v mrazáku) na Petriho misku s LB agarem a inkubovány přes noc při teplotě 37 °C.

2. den byla jedna narostlá kolonie *E. coli* naočkována do 3 ml LB média a inkubována na třepačce při teplotě 37 °C.

3. den probíhala vlastní příprava buněk na transformaci a následně i transformace. Narostlé buňky *E. coli* z předešlého dne byly přeočkovány do 10 ml nového LB média v Erlenmeyerově baňce, umístěny na třepačku a inkubovány cca 3 hod při teplotě 37 °C na výslednou optickou hustotu 0,3 až 0,5. Narostlá kultura buněk byla zchlazena ve směsi voda-led po dobu 10 min. Poté byl přidán roztok 1 M CaCl<sub>2</sub> a buňky byly inkubovány 1 hod ve vaničce se směsí voda-led. Kultura buněk byla rozdělena na alikvoty po 1,5 ml do mikrozkušavek a centrifugovány ve vychlazené centrifuze 3 min při 13 000 g. K sedimentu bylo po odstranění supernatantu přidáno 100  $\mu$ l roztoku B (0,1 M CaCl<sub>2</sub>; 10 mmol/l TrisHCl pH = 7,6). Po rozsuspendování byly buňky v mikrozkušavkách vloženy do vaničky s nadrceným ledem a dále použity na transformaci.

#### **Transformace buněk**

Ke 100  $\mu$ l kompetentních buněk bylo přidáno 4  $\mu$ l ligační směsi a byly inkubovány 1 hod ve vaničce s nadrceným ledem. Následně byly buňky opracovány tepelným šokem inkubací 2 min při 42 °C, potom byly ochlazeny inkubací 10 min ve vaničce s ledem.

K natransformovaným buňkám bylo přidáno 0,8 ml tekutého LB média a byly inkubovány 1 hod při 37 °C. Potom byla kultura buněk vyseta na tuhý LB agar s kanamycinem, X-gal a IPTG a inkubovány přes noc při 37 °C.

4. den bylo přeočkováno 30 bílých klonů rozetřením na nový tuhý LB agar s kanamycinem.

5. den byl proveden skrínink klonů pomocí PCR (primery M13 F/R homologické k použitému plazmidu pDrive). Jako vzorek DNA bylo použita jedna odpíchnutá kolonie narostlých buněk *E. coli* s natransformovaným PCR produktem. Celkový objem MasterMixu činil 25  $\mu$ l.

Na základě skríninku klonů byly identifikované správné klony, tj. ty, které obsahují plazmid s včleněným PCR produktem. Byla provedena další PCR s primery M13F/R, tentokrát v dvojnásobném objemu 50  $\mu$ l. Poté byl PCR produkt skontrolován elektroforézou v 2,5 % agarozovém gelu. PCR produkt byl přečištěn pomocí Quiaquick PCR purification kit.

Další elektroforéza byla provedena jako kontrola i jako odhad koncentrace DNA. Poté byl PCR produkt naředěn na cca 10 ng/μl a byl odevzdán spolu s naředěnými primery M13F/R na sekvenování do laboratoře Přírodovědecké fakulty University Komenského v Bratislavě.

## 4 VÝSLEDKY

Cílem této práce bylo vyvinutí metod na detekci různých alergenů v potravinách. Byla zvolena nepřímá metoda založená na detekování molekul DNA příslušných potravinových alergenů. Výhodou této nepřímé metody je vysoká citlivost a selektivita, nevýhodou je riziko falešně pozitivních výsledků, kdy v konkrétní potravine nebo potravinářském výrobku je sice přítomna DNA alergenů, ale proteiny přímo zodpovědné za vyvolání alergické reakce u senzitivních jedinců přítomny nejsou. Naštěstí takových případů potravin je minimum, jako příklad lze uvést olej získaný ze semen daného alergenu.

Každá metoda je popsána pěti základními kroky:

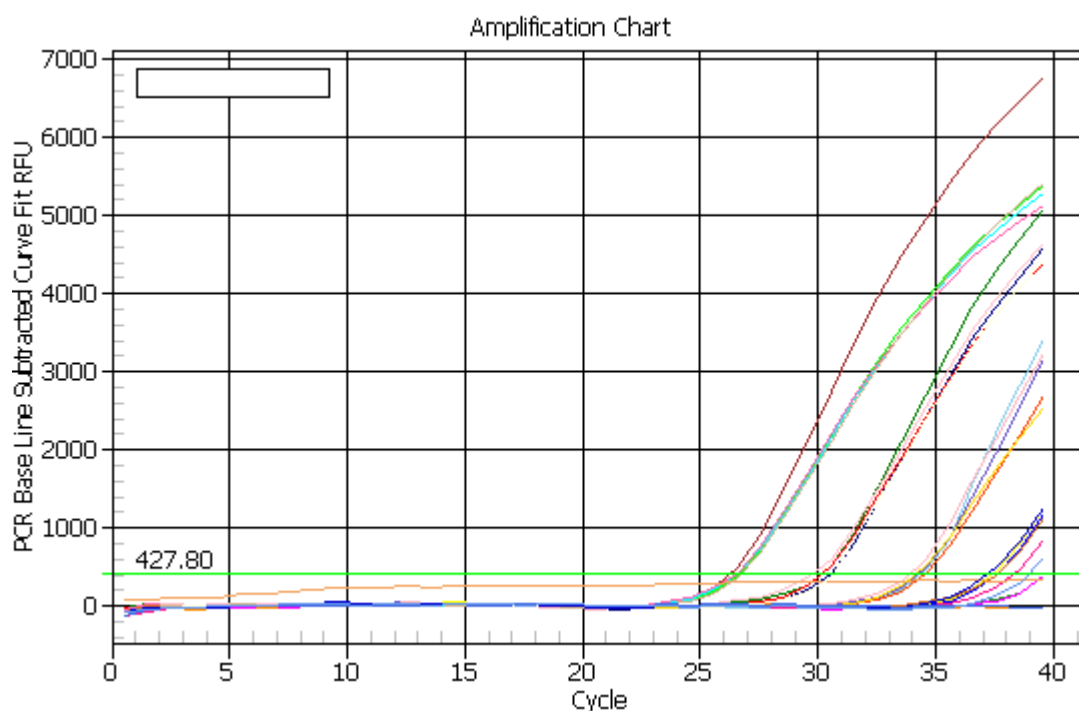
- teoretický detekční limit – DNA izolovaná ze zelené části dané rostliny (z listů) je naředěna desítkovým ředěním 10x – 10<sup>6</sup>x a určí se mez amplifikovatelnosti, tj. při kterém nejnižším ředění ještě dojde u většiny paralelních vzorků k amplifikaci.
- inkuzivita – s navrženými primery dojde (nebo nedojde) k amplifikaci u všech odrůd daného alergenu
- exkluzivita – testují se hlavně příbuzné druhy, u žádného by nemělo dojít k amplifikaci
- praktický detekční limit – z připravených modelových vzorků s definovaným obsahem daného alergenu se pomocí PCR určí mez amplifikovatelnosti, tj. minimální procentní zastoupení alergenu, které je ještě detekovatelné v potravinách a potravinářských výrobcích.
- reálné vzorky – aplikace navržené metody na konkrétní běžně dostupné potraviny a potravinářské výrobky.

### Sója

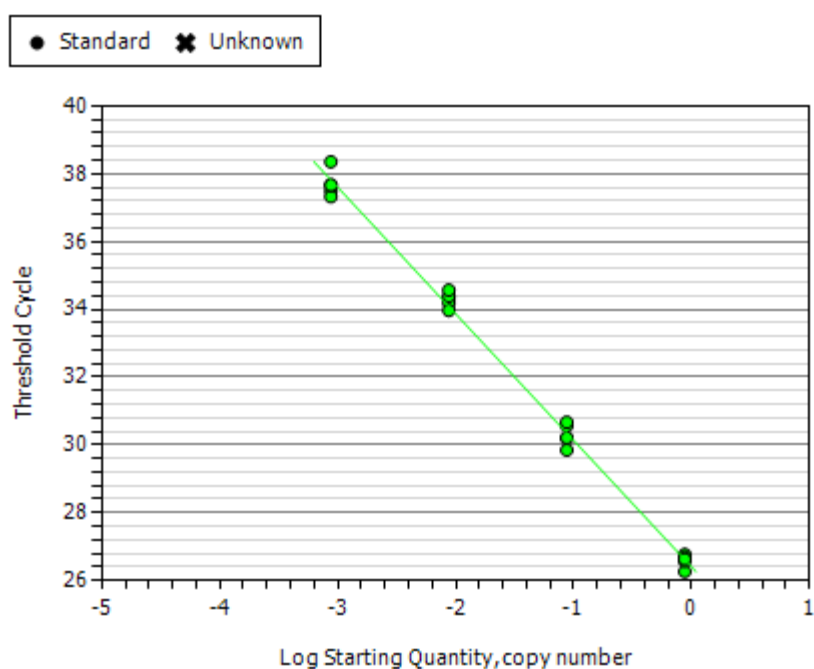
Na detekci soje v masových výrobcích již bylo publikováno několik metod založených na PCR, zatím však byly všechny pouze kvalitativní. Naším cílem bylo vyvinutí kvantitativní metody se zachováním všech kvalitativních parametrů a dostatečnou citlivostí.

#### Teoretický detekční limit

Ze semen soje byly vypěstovány rostliny, z jejichž listů pak byla izolována DNA použitá pro stanovení detekčního limitu metody pro identifikaci soje v masových výrobcích. Tato DNA byla naředěna 10x, 100x, 1 000x, 10 000x a 100 000x postupným naředováním. Pomocí real-time PCR pak byla zjišťována amplifikovatelnost.



Obrázek 1: amplifikační křivky jednotlivých koncentrací.



Obrázek 2: kalibrační křivka, její parametry jsou:  $R^2 = 0,995$ ; slope = -3,733;  $y = 26,402$ .

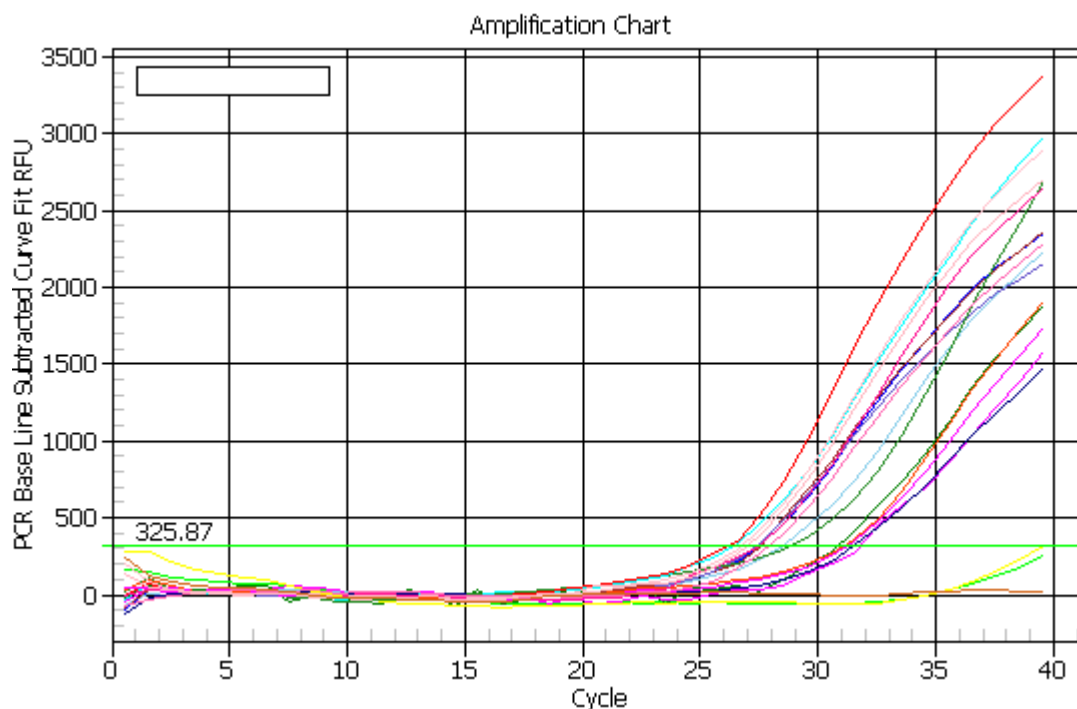
Poslední ředění, u kterého došlo u všech paralelek k amplifikaci, je 10 000x (obr. 1 a 2), což odpovídá koncentraci DNA 2,75 pg/ $\mu$ l, po přepočtu na genomové ekvivalenty je to 2,43.

## Inkluzivita

V rámci testování metody na detekci soje v masových výrobcích byla ověřována inkluzivita metody, testováno bylo 9 odrůd soje původem z Kanady, Francie a Japonska (tab. 6).

Tabulka 6: jednotlivé odrůdy soje testované na inkluzivitu a jejich výsledky.

	Odrůda	původ	výsledek
1	<i>Glycine max</i> Belmont	Kanada	+
2	<i>Glycine max</i> OAC Vision	Kanada	+
3	<i>Glycine max</i> Cardiff	Kanada	+
4	<i>Glycine max</i> Enterprise	Kanada	+
5	<i>Glycine max</i> Korada	Kanada	+
6	<i>Glycine max</i> Primus	Kanada	+
7	<i>Glycine max</i> OAC Erin	Kanada	+
8	<i>Glycine max</i> Quito	Francie	+
9	<i>Glycine max</i> Kanakawa Wase	Japonsko	+



Obrázek 3: amplifikační křivky DNA jednotlivých odrůd soje.

Z grafu (obr. 3) a tabulky (tab. 6) je patrné, že inkluzivita navržené metody na detekci soje v masových výrobcích byla 100 %. Naměřené hodnoty  $C_t$  často neodpovídaly naměřené koncentraci izolované DNA, což bylo dáno zřejmě tím, že DNA použitá k PCR nebyla

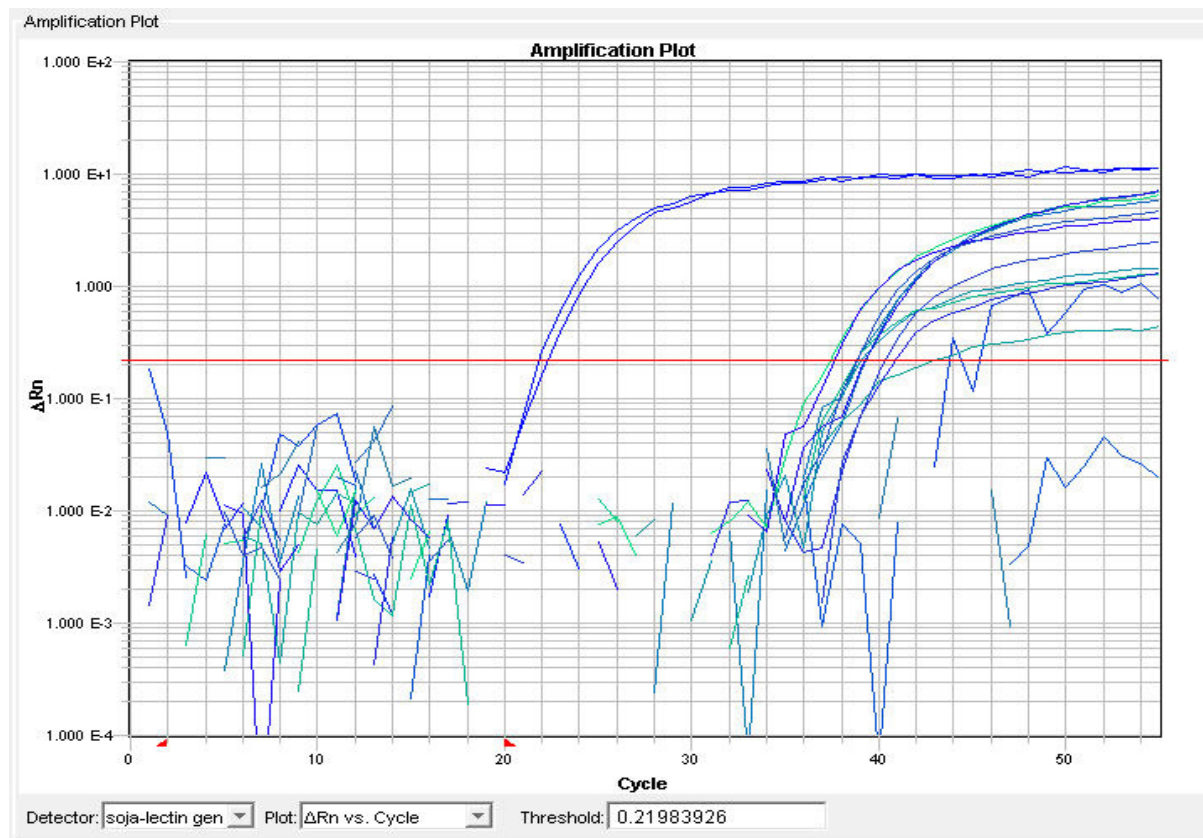
ředěna, proto mohlo docházet k tzv. overload efektu, kdy dochází k částečné inhibici PCR reakce nadbytkem DNA. Výsledek testu inkluzivitu to ale nijak neovlivnilo.

### Exkluzivita

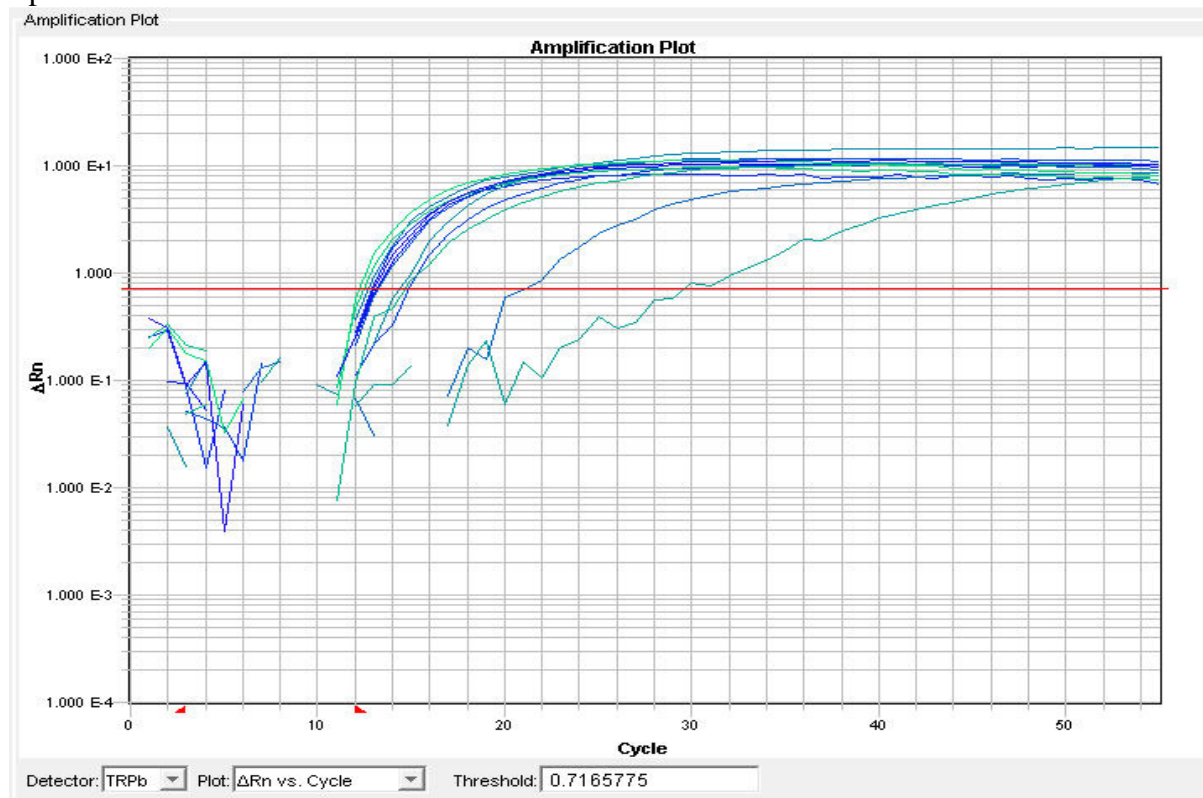
Navržená metoda na detekci soje v masových výrobcích byla také testována na exkluzivitu, tedy že nebude docházet ke křížovým reakcím u DNA příbuzných druhů, případně dalších složek potravin, které se mohou vyskytovat společně s DNA soje (tab. 7).

Tabulka 7: přehled testovaných druhů a jejich výsledky.

	vzorek	výsledek		vzorek	výsledek
1	sója (lagris)	+	13	pšenice	-
2	sója (marianna)	+	14	ječmen	-
3	čočka	-	15	žito	-
4	cizrna	-	16	rýže	-
5	bob	-	17	para ořech	-
6	fazole zahradní	-	18	kakao	-
7	fazole saxa	-	19	kešu	-
8	fazole maxidor	-	20	pistácie	-
9	hrách G13	-	21	kuřecí maso	-
10	hrách gloriosa	-	22	skopové maso	-
11	hrách setý	-	23	hovězí maso	-
12	podzemnice olejná	-	24	vepřové maso	-



Obrázek 4: amplifikační křivky testu exkluzivity navržené metody na detekci soje v potravinách.

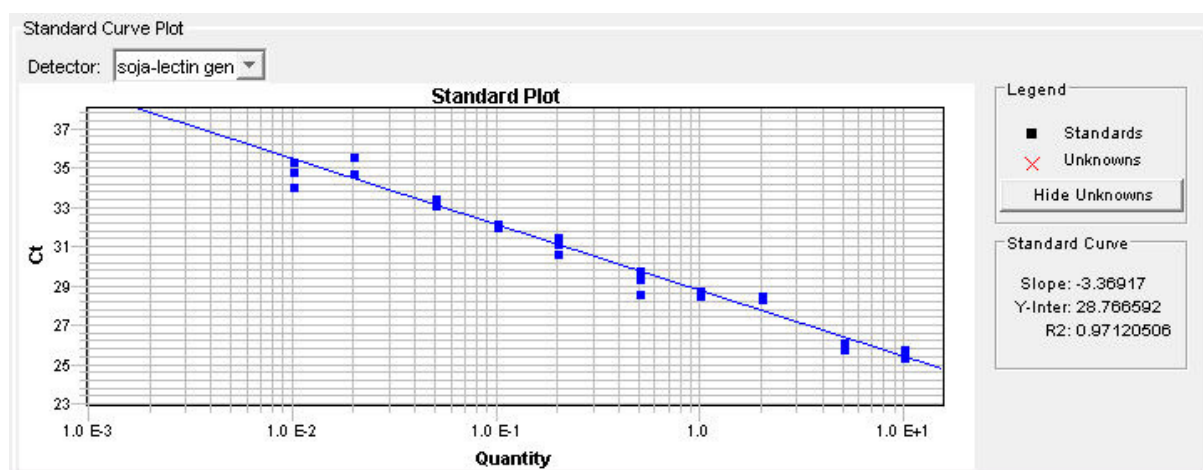


Obrázek 5: ověření amplifikovatelnosti použité DNA v testu exkluzivity.

K amplifikaci v mezích detekčního limitu navržené metody na detekci soje v masových výrobcích došlo jen u dvou odrůd soje (pozitivní kontrola). Amplifikační křivky jiných druhů jsou až za tímto limitem detekce ( $C_T > 38$ ), proto lze považovat test exkluzivity za 100 % úspěšný (tab. 7 a obr. 4). Testem amplifikovatelnosti byla ověřena kvalita DNA použitá při testu exkluzivity, vzorky se špatnými výsledky byly vyřazeny, aby neposkytovaly falešně negativní hodnoty (obr. 5).

### Praktický detekční limit

Byly připraveny modelové vzorky paštiky s definovaným obsahem soje, z nich izolována DNA byla použita pro testování praktického detekčního limitu navržené metody na detekci soje v masových výrobcích.



Obrázek 6: křivka závislosti  $C_t$  na obsahu soje v modelových vzorcích paštiky.

Poslední ještě amplifikovaný modelový vzorek paštiky byl 0,02 % (w/w) při hodnotě prahového cyklu  $C_t = 35,3$  (obr. 6). Pro navrženou metodu na detekci soje tak byla stanovená hodnota  $C_t \leq 36$  považovaná za pozitivní detekci sóje a výsledky s hodnotou  $C_t > 36$  se považují za negativní.

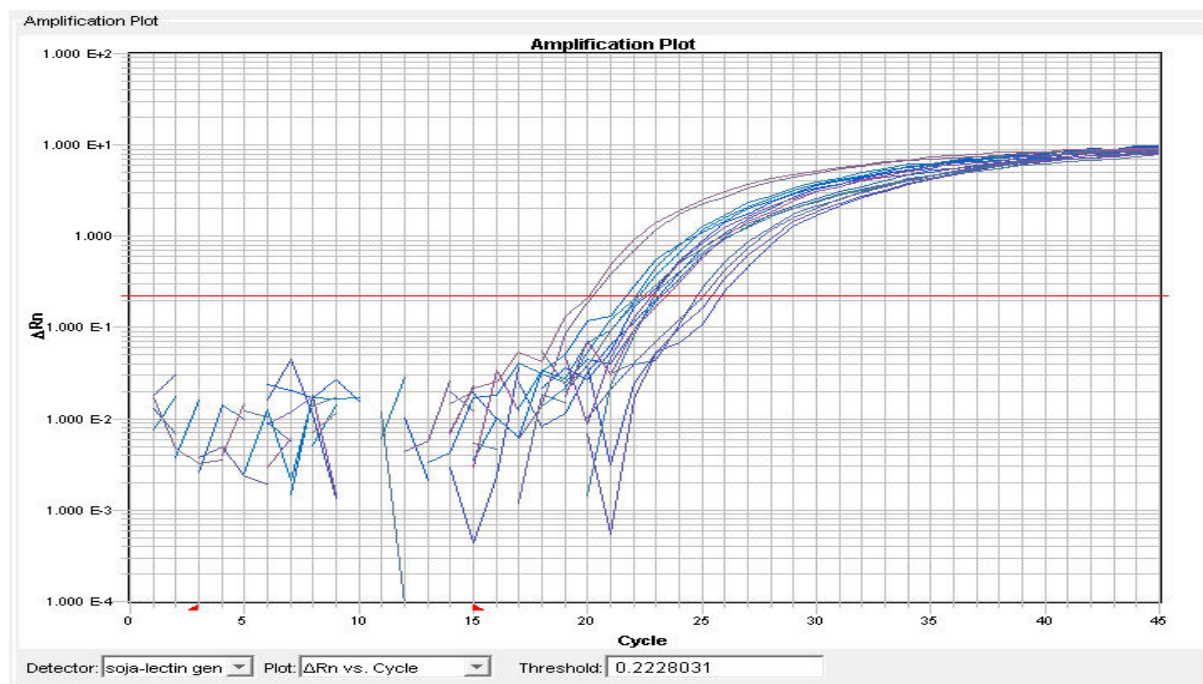
### Reálné vzorky

Navržená metoda na detekci soje v masových výrobcích dosáhla potřebné citlivosti, úspěšně prošla testy na inkluzivitu i exkluzivitu, proto byla aplikována na reálné vzorky masových výrobků zakoupených v běžné maloobchodní síti. Výsledky pak byly srovnány s deklarovanými údaji na obalech těchto potravin (tab. 8).

*Tabulka 8:* přehled testovaných masových výrobků a srovnání naměřených výsledků s deklarovanými údaji na obalech příslušných potravin (- značí *neobsahuje*, ± značí *obsahuje stopy*, + značí *obsahuje*), průměr  $C_t$  počítán ze čtyř paralelních reakcí.

vzorek	původ	deklarováno	výsledek	Ø $C_t$	SD
1 Kuřecí párky	ČR	+	+	27,85	0,38
2 Bernské párky	ČR	-	-		
3 Vídeňské párky	ČR	-	-		
4 Bavoráček	ČR	-	+	27,98	0,15
5 Spišské párky	Slovensko	+	+	29,20	0,46
6 Bratwurst	Rakousko	-	-		
7 Kubisowie párečky	Polsko	+	+	30,03	0,28
8 Sekaná 1	Slovensko	±	-		
9 Sekaná mix	Slovensko	±	-		
10 Poličan	ČR	-	-		
11 Kladenská pečeně	ČR	±	+	34,30	0,39
12 Dušená šunka	ČR	±	+	35,55	0,58
13 Paštika pochoutka	ČR	-	-		
14 Sekaná 2	Slovensko	±	+	34,38	0,51
15 Sertesmajkrém	Maďarsko	+	+	32,95	1,35
16 Super krém	Slovensko	+	±	37,00	0,10
17 Pomazánka s uzeným masem	Slovensko	+	+	31,90	0,50
18 Zámecká ďábelská pomazánka	Slovensko	±	-		
19 Svačinková pomazánka	ČR	+	-		
20 Zámecký bůčkový krém	Slovensko	+	+	33,90	0,00
21 Dedinská paštika	Slovensko	+	+	29,75	0,55
22 Pasta z uzeného masa 1	Slovensko	+	-		
23 Pasta z uzeného masa 2	Slovensko	+	+	30,90	0,80
24 Svačinka	ČR	+	-		

Naměřené výsledky byly většinou ve shodě s údaji deklarovanými výrobcem na obalech příslušných potravin. Některé výrobky neobsahovaly soju, i když výrobce deklaroval na obale, že soju obsahuje (19, 22, 24). Všechny vzorky byly podrobeny testu amplifikovatelnosti, aby byly vyloučeny falešně negativní výsledky (obr. 7).

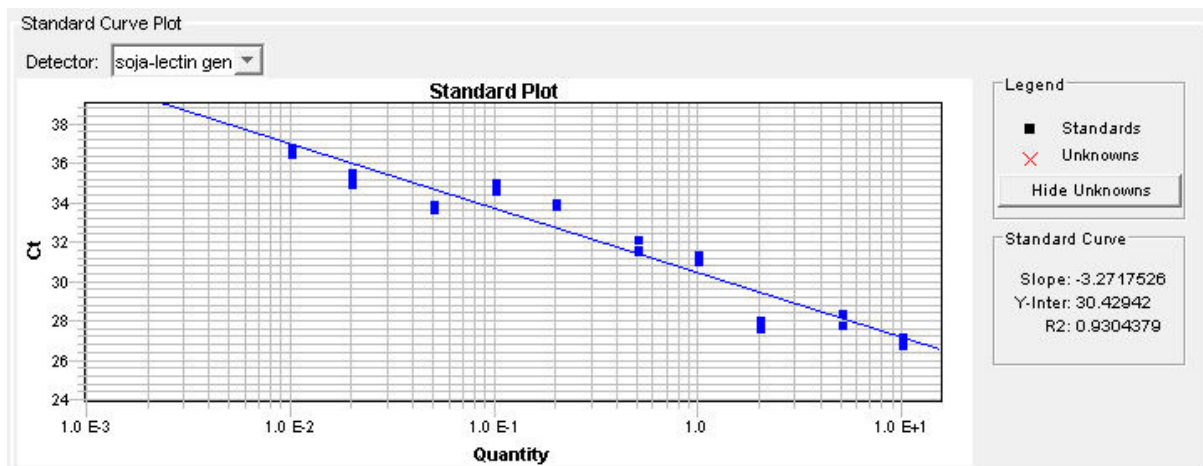


Obrázek 7: ověření kvality DNA použité při zjišťování přítomnosti soje v masových výrobcích pomocí testu amplifikovatelnosti.

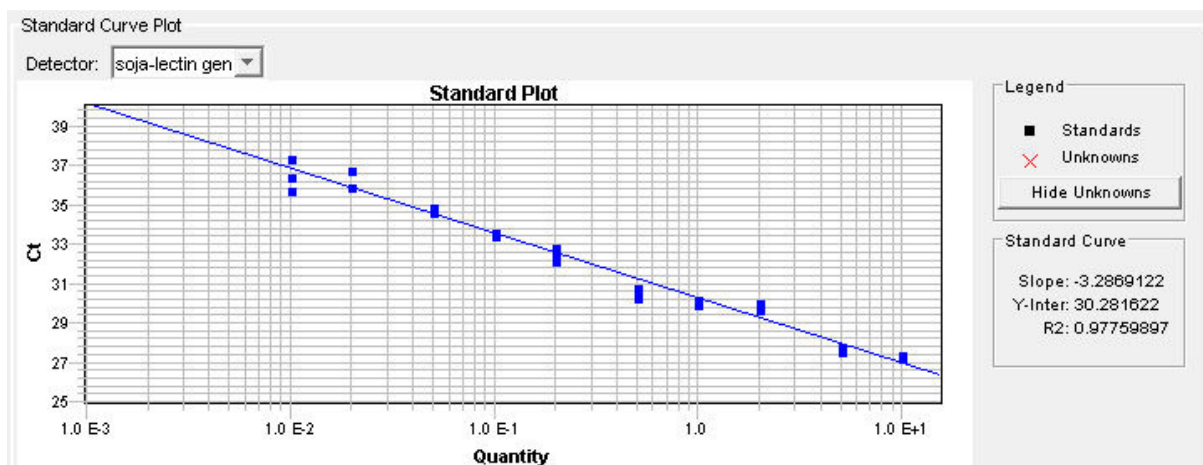
### Kvantifikace

Navržená metoda detekce soje v masových výrobcích byla zatím jen kvalitativní, tj. poskytovala pouze informaci, zda daná potravina či potravinářský výrobek obsahuje, nebo neobsahuje soju. My jsme se pokusili posunout metodu na vyšší stupeň tak, aby bylo možné použít tuto metodu také jako kvantifikační, tj. určit kolik soje se v masovém výrobku nachází.

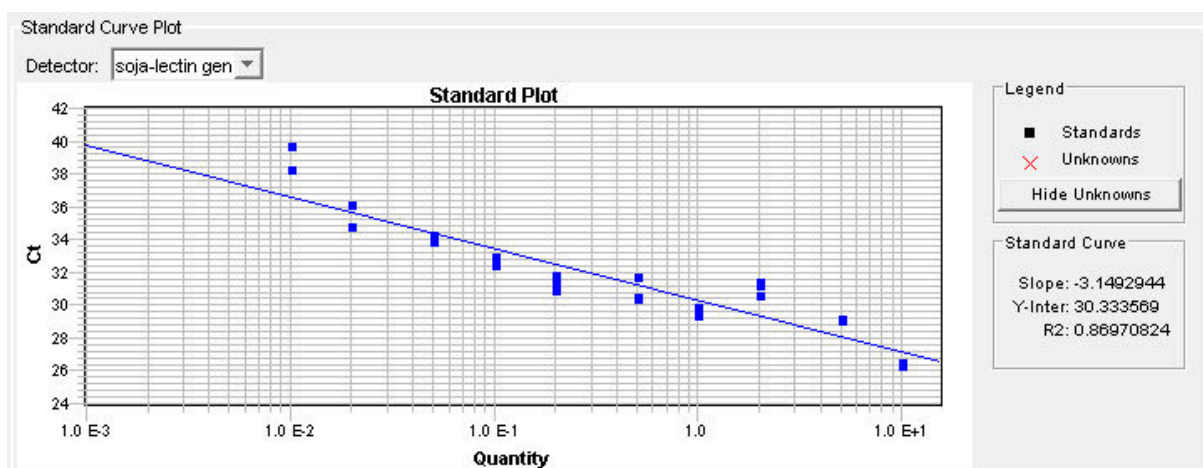
Byly připraveny tři řady modelových vzorek masových výrobků s definovanými obsahy sojových preparátů – první řada se sojovým koncentrátem Arcon S, druhá řada se sojovým izolátem Pro Fam a třetí řada s okarou (viz. kapitola Materiál a metody). DNA izolovaná z těchto modelových vzorek byla použita pro reakci real-time PCR, z výsledků pak byly sestrojeny tři kalibrační křivky, vždy jedna pro danou řadu modelových vzorek se sojovými preparáty.



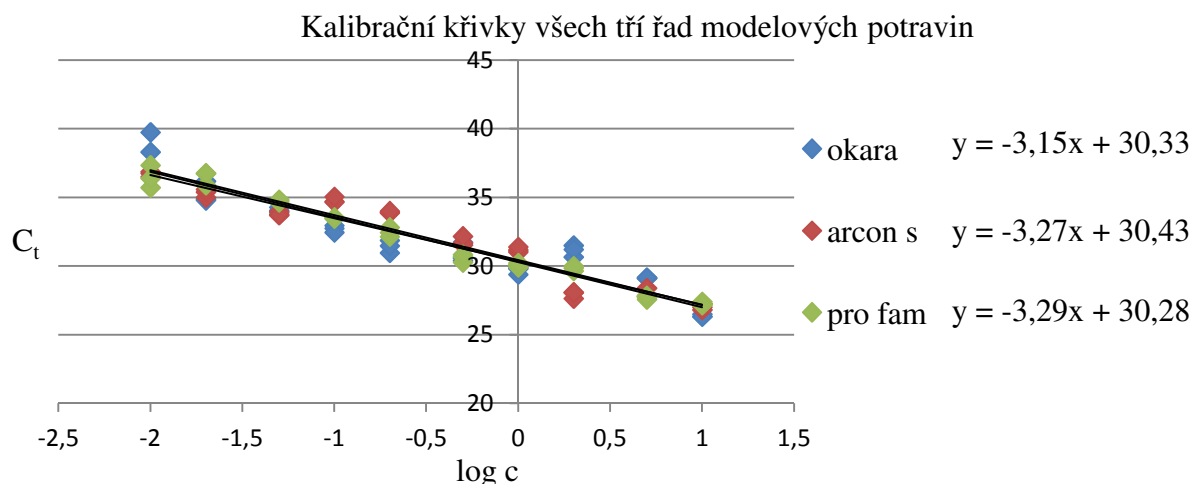
Obrázek 8: kalibrační křivka první řady modelových vzorek se soj. koncentrátem Arcon S.



Obrázek 9: kalibrační křivka druhé řady modelových vzorek se sojovým izolátem Pro Fam.



Obrázek 10: kalibrační křivka třetí řady modelových vzorek se sojovým preparátem okara.



Obrázek 11: kalibrační křivky všech tří řad modelových masových výrobků.

Optimalizací parametrů real-time PCR (threshold a baseline) bylo dosaženo takových výsledků, že kalibrační křivky všech tří řad (obr. 8, 9, 10) jsou nejen prakticky rovnoběžné (tj. mají skoro shodný sklon), ale jsou i těsně vedle sebe (tj. vytínají téměř stejný úsek na ose y). To vše při relativně vysokém korelačním stupni  $R^2$ , který ukazuje na vysokou míru linearitu příslušných dat jednotlivých kalibračních křivek (obr. 11).

Tabulka 9: přehled masových výrobků, které obsahovaly soju, hmotnostní podíly (vyjádřené v procentech) vypočtené dle jednotlivých kalibračních křivek a jejich průměr. Čísla vzorků jsou pro lepší orientaci převzata z předcházející tabulky č. 8.

	Ø Ct	Arcon s	okara	Pro Fam	Ø podíl	SD
1 Kuřecí párky	27,85	6,02	6,13	5,48	5,88	0,286
4 Bavoráček	27,98	5,52	5,60	5,02	5,38	0,255
5 Spišské párky	29,20	2,33	2,28	2,13	2,25	0,085
7 Kubisowie párečky	30,03	1,30	1,25	1,20	1,25	0,044
11 Kladenská pečeně	34,30	0,06	0,05	0,06	0,06	0,004
12 Dušená šunka	35,55	0,03	0,02	0,03	0,02	0,002
14 Sekaná 2	34,38	0,06	0,05	0,06	0,06	0,004
15 Sertesmajkrém	32,95	0,17	0,15	0,15	0,16	0,008
16 Super krém	37,00	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	
17 Pomazánka s uzeným masem	31,90	0,35	0,32	0,32	0,33	0,013
20 Zámecký bůčkový krém	33,90	0,09	0,07	0,08	0,08	0,005
21 Dedinská paštika	29,75	1,58	1,53	1,45	1,52	0,054
23 Pasta z uzeného masa 2	30,90	0,70	0,66	0,65	0,67	0,024

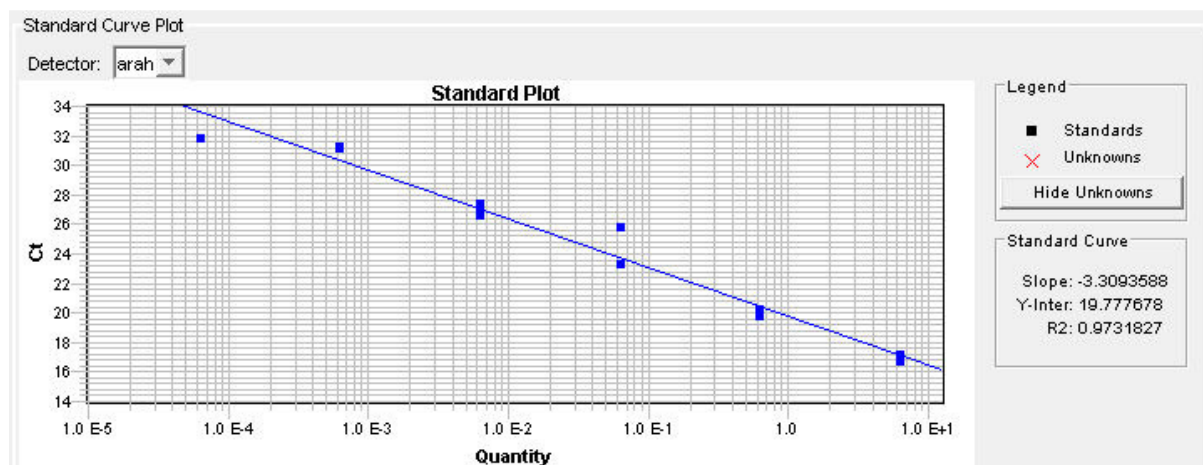
Pomocí kalibračních křivek bylo vypočteno množství soje v masových výrobcích, ve kterých byla kvalitativní metodou detekována přítomnost soje. Největší množství soje byla nalezena v párcích, v kuřecích párcích přibližně 6 %. Naproti tomu v dalších masových výrobcích, jako jsou šunky, sekaná a paštiky, byly naměřeny relativně nízká množství soje. Jedinou výjimku představuje vzorek č. 21 (Dedinská paštika), která obsahovala 1,5 % soje (tab. 9).

## Pistácie

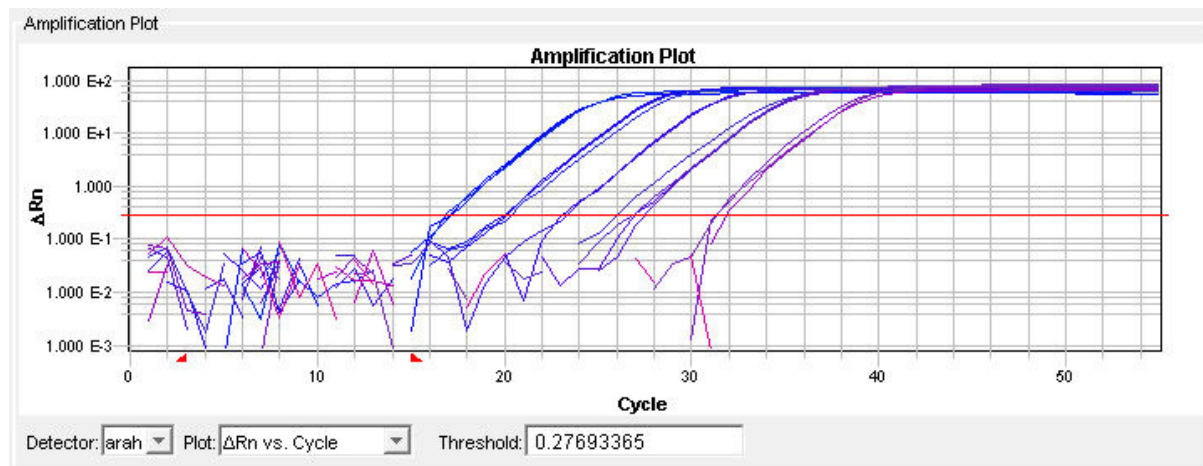
Metoda je alternativou k již dříve vyvinuté metodě [11], která byla navržena na vysoce citlivou kvalitativní analýzu. Nová metoda je orientována na jednokopiový gen *COR* kódující stresový protein dehydrin, kdežto předcházející metoda byla orientována na mezníkovou oblast mezi geny pro 18S rRNA a 5,8S rRNA specifické pro pistácie, které jsou multikopiové, proto i daná oblast mezi těmito geny je multikopiová. Jednokopiová varianta je však výhodnější do budoucna pro kvantitativní analýzu, protože u multikopiových genů existuje velká variabilita v počtu kopií mezi jednotlivými odrůdami pistácie a dokonce i mezi jednotlivými pletivy jedné rostliny. Také je vhodnější pro multiplexovou real-time PCR k detekci vícero druhů potravinových alergenů v jedné reakci.

## Teoretický detekční limit

DNA pistácie Khinjuk byla naředěna 10x, 100x, 1 000x, 10 000x, 100 000x a 1 000 000x postupným naředováním a pomocí real-time PCR testována amplifikovatelnost.



Obrázek 12: kalibrační křivka a její parametry, pistácie Khinjuk.



Obrázek 13: amplifikační křivky jednotlivých koncentrací DNA pist. Khinjuk.

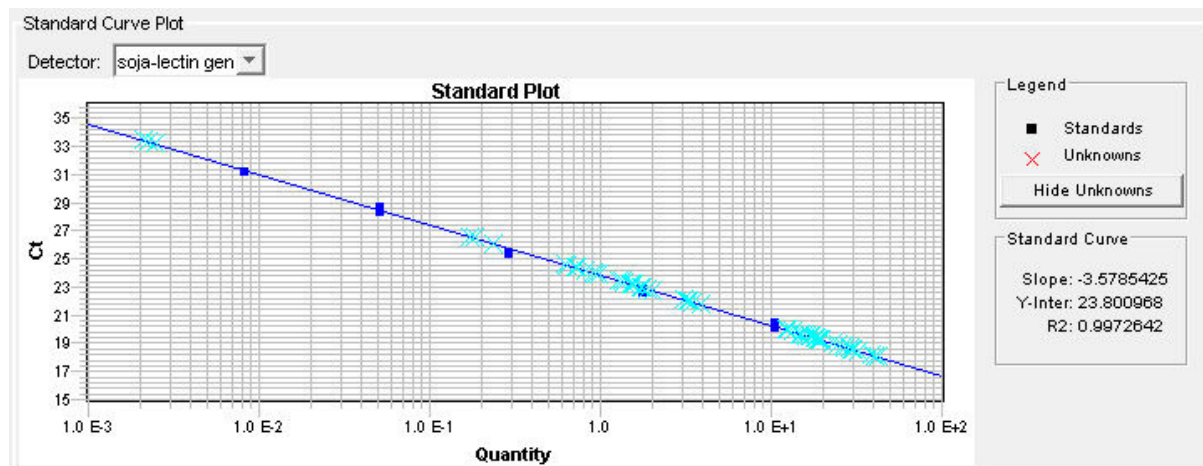
Z obrázků (obr. 12 a 13) je vidět, že k amplifikaci všech paralelek došlo ještě u ředění 100 000x, což odpovídá koncentraci DNA  $6,09 \cdot 10^{-4}$  ng/μl, tedy 3,5 pg. Vzhledem k tomu, že molekulová hmotnost genomu pistácie není známa, nelze detekční limit vyjádřit jako počet genomových ekvivalentů.

### Inkluzivita

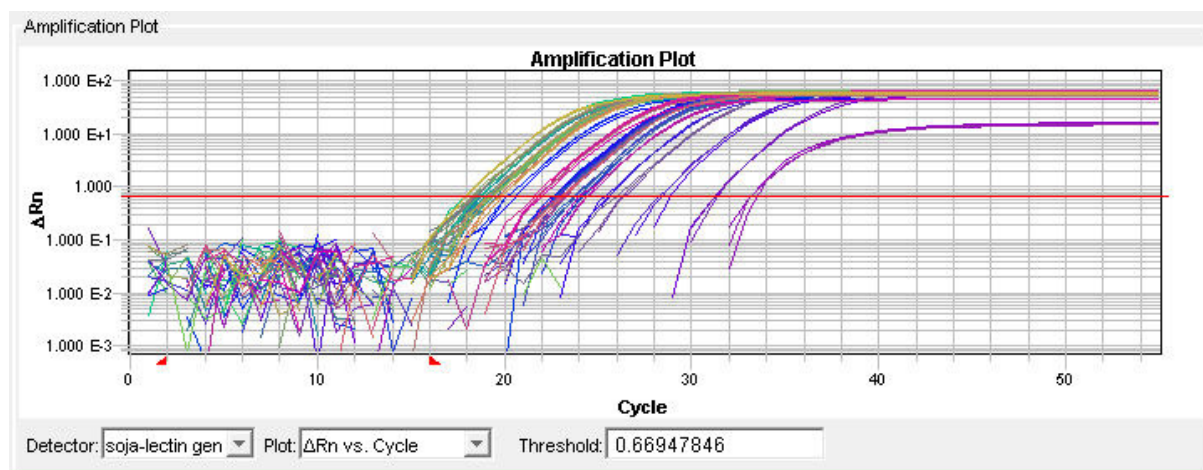
U navržené metody detekce pistácií v potravinách byla otestována inkluzivita, testováno bylo 22 různých odrůd a variant pistácie (tab. 10).

Tabulka 10: Výpis odrůd pistácií testovaných na inkluzivitu a jejich výsledky při testování inkluzivity.

	odrůda	výsledek		odrůda	výsledek
1	<i>Pistacia vera</i> WEINMAN	+	12	<i>Pistacia vera</i> Bronte	+
2	<i>Pistacia vera</i> CT	+	13	<i>Pistacia vera</i> Red Alepps	+
3	<i>Pistacia vera</i> California	+	14	<i>Pistacia vera</i> Algina	+
4	<i>Pistacia vera</i> U	+	15	<i>Pistacia vera</i> Trabonella	+
5	<i>Pistacia vera</i> α	+	16	<i>Pistacia vera</i> Vera	+
6	<i>Pistacia vera</i> 3	+	17	<i>Pistacia vera</i> Damghan	+
7	<i>Pistacia vera</i> E	+	18	<i>Pistacia vera</i> Rashti	+
8	<i>Pistacia vera</i> Rash	+	19	<i>Pistacia vera</i> Gazrim	+
9	<i>Pistacia vera</i> Dr. Rashid	+	20	<i>Pistacia vera</i> Kerman	+
10	<i>Pistacia vera</i> R α bio	+	21	<i>Pistacia vera</i> SFAX	+
11	<i>Pistacia vera</i> LORENZ	+	22	<i>Pistacia vera</i> Lassen	+



Obrázek 14: Kalibrační křivka a výsledné  $C_t$  jednotlivých vzorků variant pistácií.



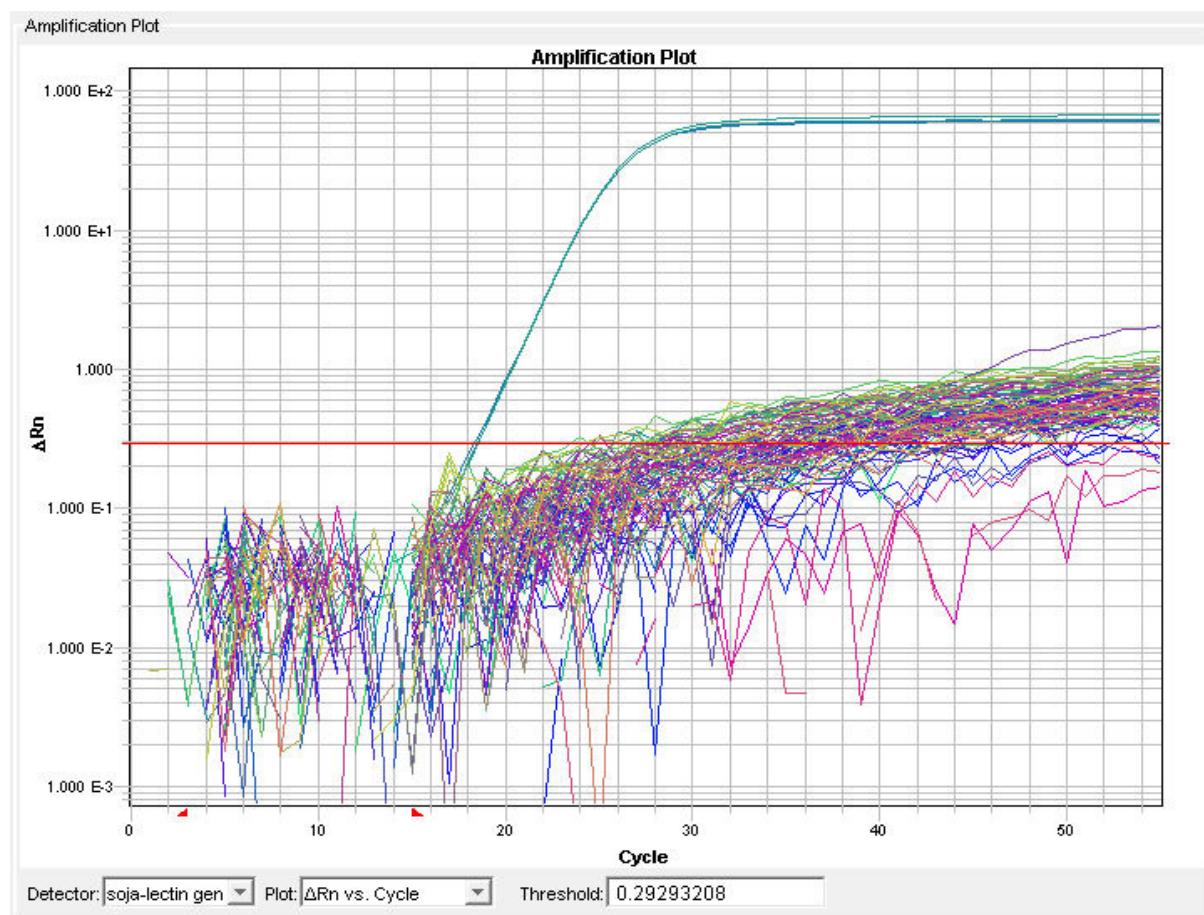
Obrázek 15: Amplifikační křivky vzorků pistácií testovaných při inkluzivitě.

Jednotlivé body kalibrační křivky (obr. 14) odpovídají koncentracím DNA 10; 1,7; 0,3; 0,05 a 0,008 ng/  $\mu$ l. Větší část vzorků DNA jiných odrůd pistacie měla nižší  $C_t$  než první bod kalibrační křivky (odpovídající koncentraci 10 ng/ $\mu$ l), z čehož plyne vyšší koncentrace DNA ve vzorcích. Vzorek DNA (pistacie WEINMAN), který je na obrázku reprezentován třemi posledními body s nejvyšším  $C_t$  pravděpodobně obsahoval inhibitory PCR, protože koncentrace této vzorky neodpovídá poloze bodů  $C_t$  na kalibrační křivce. Zatímco poslední bod kalibrační křivky má koncentraci 0,008 ng/ $\mu$ l, koncentrace naměřená ve vzorce byla řádově vyšší – 39,2 ng/ $\mu$ l. Amplifikovány byly všechny vzorky, inkluzivita tedy byla 100 % (obr. 15).

### Exkluzivita

Navrhnutá metoda byla testována také na exkluzivitu, tedy že nebude docházet ke křížovým reakcím u DNA příbuzných druhů, případně dalších složek potravin, které se mohou

vyskytovat společně s DNA pistácií (tab. 11). DNA těchto složek by neměla být amplifikována.



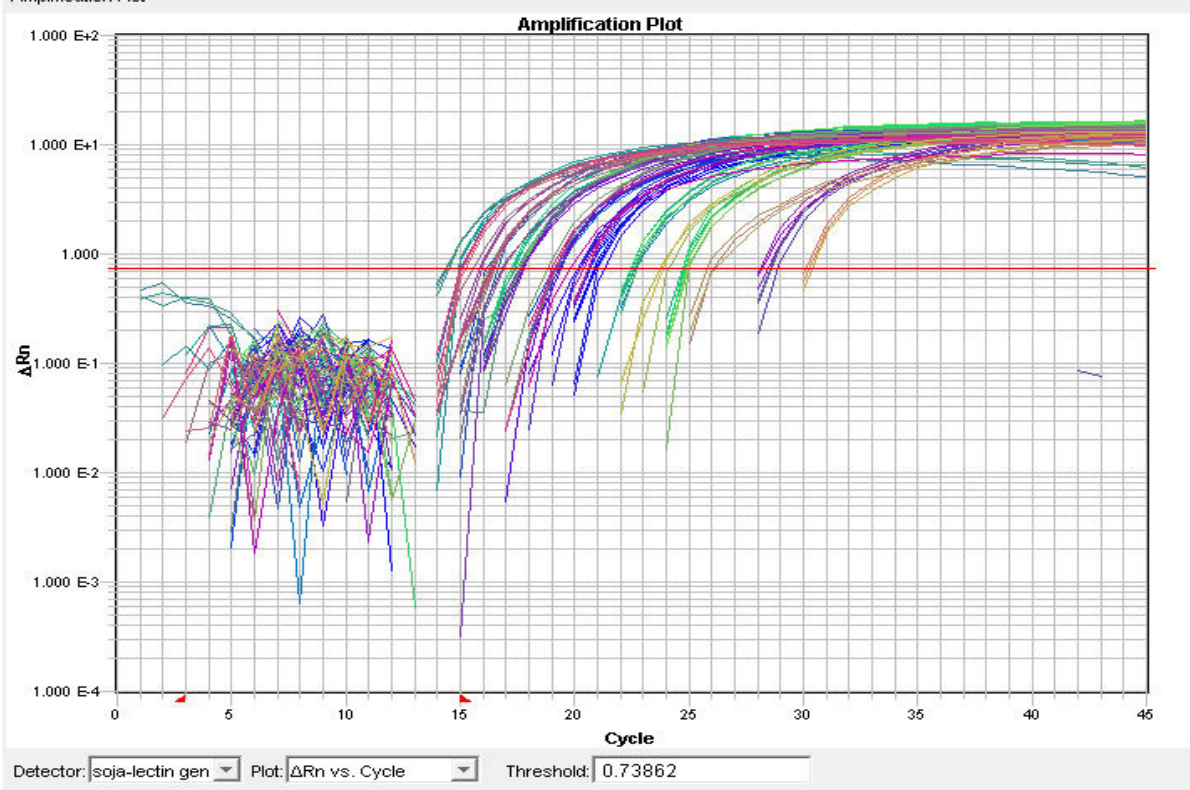
Obrázek 16: Amplifikační křivky jednotlivých vzorků testovaných na exkluzivitu.

K amplifikaci došlo jen u pozitivní kontroly (pistácie Khinjuk), všechny ostatní vzorky nebyly amplifikovány (obr. 16). Test tedy demonstroval exkluzivitu 100 %. Byla ověřena kvalita DNA použitá při testu exkluzivity pro vyloučení falešně negativních výsledků (obr. 17).

Tabulka 11: přehled testovaných složek potravin a jejich výsledky při testu exkluzivity.

	vzorek	výsledek		vzorek	výsledek
1	sója listy	-	16	žito	-
2	mandle PEGARINKOS 2	-	17	rýže	-
3	mandle FERRAGNES	-	18	pozitivní kontrola	+
4	arašídy listy	-	19	ječmen APEX	-
5	kešu	-	20	kukuřičná mouka 1	-
6	mango pecka	-	21	kukuřičná mouka 2	-
7	para ořech	-	22	pohanková mouka	-
8	makadamský ořech Seeberger	-	23	kakao	-
9	lískový ořech list	-	24	brambora 1	-
10	slunečnice Miletičova	-	25	brambora 2	-
11	lichi 1	-	26	kuřecí maso	-
12	lichi 2	-	27	králíčí maso	-
13	rhus typhinia	-	28	krůtí maso	-
14	rhus 1	-	29	vepřové maso	-
15	polohrubá pšeničná mouka	-	30	hovězí maso	-

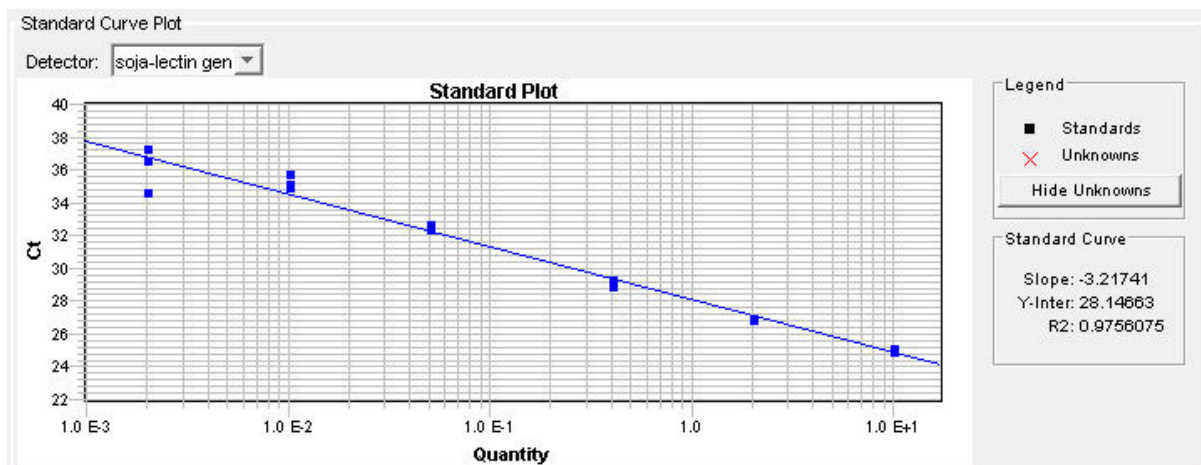
Amplification Plot



Obrázek 17: test amplifikovatelnosti použité DNA při testu exkluzivity.

## Praktický detekční limit

Z připravených modelových vzorek vánočního cukroví (medvědí tlapy) s definovaným obsahem pistácií byla izolována DNA, která byla použita na real-time PCR s použitím primerů a sondy na detekci pistácií v potravinách a potravinářských výrobcích. Testovali jsme tak praktický detekční limit, tj. nejmenší obsah pistácií ve výrobku, který je ještě možno touto metodou detekovat.



Obrázek 18: Křivka závislosti  $C_t$  na obsahu pistácií v potravinových vzorcích.

Poslední ještě amplifikovaný potravinový vzorek s definovaným obsahem pistácií byl 0,002 % (w/w), praktický detekční limit pak tedy je 20 mg/kg (obr. 18).

## Reálné vzorky

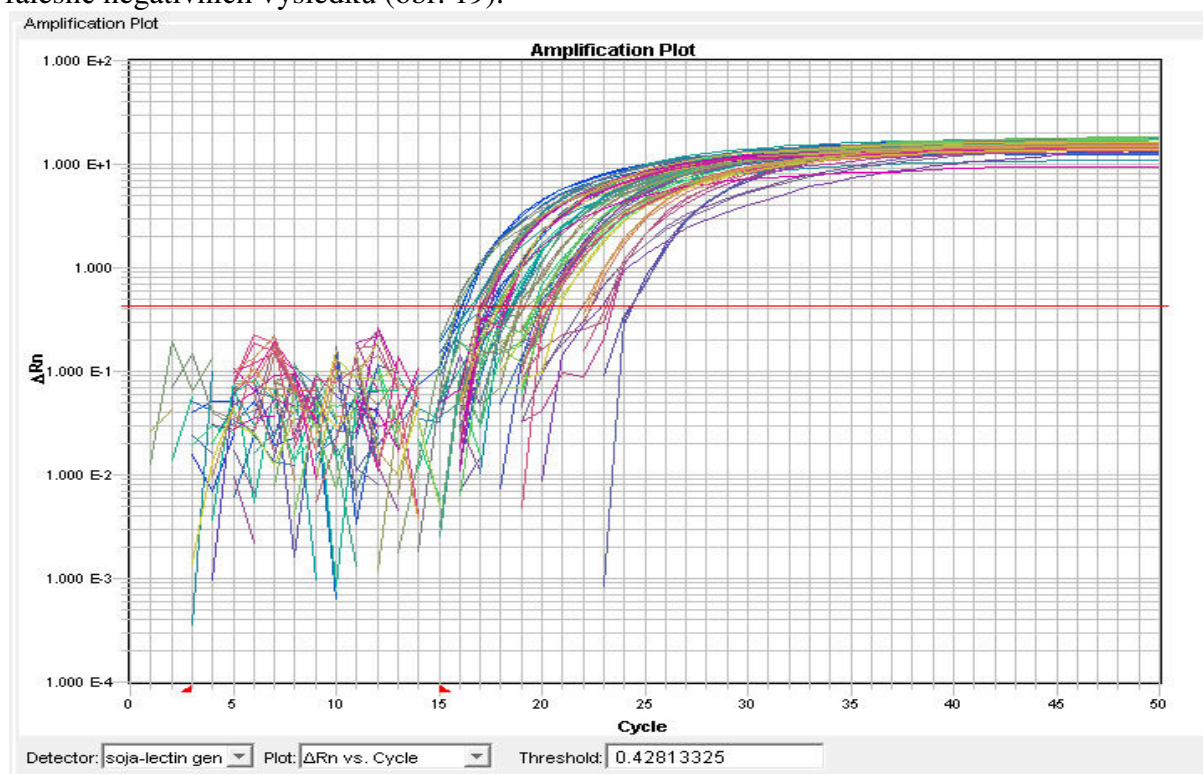
Navržená metoda detekce pistácií v potravinách a potravinářských výrobcích obstála v testech inkluзивity i exkluzivity a dosáhla potřebné citlivosti, proto byla použita k detekci pistácií v reálných vzorcích potravin. Výsledky pak byly srovnány s deklarovanými údaji na obalech těchto potravin (tab. 12).

Tabulka 12: přehled testovaných výrobků, srovnání deklarovaných údajů na obalech potravin o obsahu pistácií s naměřenými výsledky (- značí *neobsahuje*, ± značí *obsahuje stopy*, + značí *obsahuje*), průměr  $C_t$  je počítán ze tří paralelních reakcí.

vzorek	původ	deklarováno	výsledek	$\bar{C}_t$	SD
1 mandle pražené solené	ČR	-	-		
2 mandlová tyčinka Creta Mel	Řecko	-	-		
3 arašídová tyčinka Creta Mel	Řecko	-	-		
4 pistáciová tyčinka Creta Mel	Řecko	+	+	22,42	0,13
5 arašídové křupky Lorenz	Francie	-	-		
6 turecký med mandlový	Francie	-	-		

vzorek	původ	deklarováno	výsledek	Ø Ct	SD
7 pistáciová čokoláda Cote d'Or	Belgie	±	-		
8 čokoláda Lindt s vlašskými ořechy	Švýcarsko	-	-		
9 čokoláda Lindt s pomerančem	Švýcarsko	-	-		
10 bonbon s lískovým ořechem	Polsko	±	±	36,57	0,78
11 Raffaello	Polsko	-	-		
12 mozartovy koule Reber	Rakousko	+	+	27,61	0,18
13 čokoláda s pist. marcipánem Zotter	Rakousko	+	+	24,55	0,18
14 bazalkový ovčí sýr			-		
15 kachní paštika se švestkami ENTE	Rakousko	-	-		
16 pistáciová čokoláda Lindt	Švýcarsko	+	+	24,96	0,22
17 ořechová čokoláda Zotter	Rakousko	±	-		
18 pistáciová čokoláda Finessa	Rakousko	+	+	26,75	0,24
19 kuličky Mirabell	Německo	+	+	26,96	0,13
20 Ferrero Rocher	Itálie	-	-		
21 marcipánová čokoláda Finessa	Rakousko	±	-		
22 kuličky Mirabell Mozart Taler	Rakousko	+	+	28,71	0,18
23 nugátová čokoláda Reber	Německo	±	-		
24 čokoláda Mozart Reber	Německo	+	+	29,67	0,08
25 paštika WILD	Rakousko	+	+	32,22	0,50
26 lískové ořechy v čokoládě	Belgie	-	-		
27 Ferrero Garden kokosové	Německo	±	±	34,98	1,09
28 játrová telecí paštika	Rakousko	-	-		
29 pistáciový puding Jello	USA	+	+	32,28	0,47
30 Ferrero Garden pistáciové	Německo	+	+	26,51	0,09
31 pistáciový puding Wal-Mart	USA	+	-		
32 Ferrero Garden mandlová	Německo	±	±	35,58	1,15
33 pekanová čokoláda	Francie	±	-		
34 oříšková čokoláda	Francie	±	-		
35 turecký med mandlovo-malinový	Francie	-	-		
36 Ferrero Garden lískové ořechy	Německo	±	-		
37 mandlový bonbon	Polsko	±	-		
38 kaštanová čokoláda Zotter	Rakousko	±	-		
39 turecký med pistáciový	Francie	+	±	35,80	0,02
40 Ferrero Garden jahody-maliny	Německo	±	-		
41 pistáciový bonbon 1	Polsko	+	+	31,32	0,04
42 banánový puding 1	USA	-	-		
43 vanilkový puding 1	USA	-	-		
44 pistáciový bonbon 2			+	31,05	0,21
45 banánový puding 2			-		
46 vanilkový puding 2			-		
47 pekanové sušenky	Francie	-	-		
48 bonbon kapučíno	Polsko	±	-		

Naměřené výsledky se většinou shodovaly s údaji deklarovanými výrobcem na obalech příslušných potravin. Některé výrobky neobsahovaly pistácie, i když výrobce deklaroval na obale, že pistácie obsahuje (číslo 31). U potravin, u nichž byla deklarována stopová přítomnost pistácií, se tato u některých potvrdila (10, 27, 32), u jiných nepotvrdila (7, 17, 21, 33, 34, 36, 37, 38, 40, 48). Vzorky obsahující stopová množství ( $C_t > 35$ ) často vykazovala velkou míru nepřesnosti (10, 27 a 32), protože obsah pistácie byl na hranici detekčního limitu navržené metody. Testem amplifikovatelnosti byla ověřena kvalita DNA pro vyloučení falešně negativních výsledků (obr. 19).



Obrázek 19: ověření kvality DNA použité při zjišťování přítomnosti pistácií v potravinách.

## Mandle

Cílem bylo vyvinout metodu, která by byla schopna detekovat mandle v potravinách a potravinářských výrobcích tak, aby splňovala všechny nároky kladené na kvalitativní analýzu, tj. potřebná citlivost, stoprocentní inkluzivita i exkluzivita. Zatím nebyla publikována žádná metoda, která by to vše splňovala. Komerčně dostupný kit SureFood® Almond na detekci mandlí v potravinách od firmy Congen sice vykazuje dostatečnou citlivost, splňuje i 100 % exkluzivitu, ale nemá 100 % inkluzivitu. Největším problémem při vývoji detekční metody pro mandle je velká neúplnost databází se sekvencemi genů jak mandlí, tak příbuzných druhů (broskve, meruňky, švestky atd.), takže se pak obtížně hledají vhodné markery skutečně selektivní pro mandle.

Tabulka 13: přehled testovaných metod, výsledky inkluзивity a exkluzivity.

Vzorka	COX		thau		nsLTP		pru1		PRD	
	PCR	Ct	PCR	Ct	PCR	Ct	PCR	Ct	PCR	Ct
dulcis	+	35,2	-	-	+	35	-	-	+	37,6
dulcis Abdul Wahdi	+	32,6	+	37,2	+	32	±	40,0	+	32,0
dulcis Eagle's Beak	+	34,5	+	38,7	+	33	+	38,0	+	33,5
dulcis Tarrangonna	+	32,2	+	34,3	+	32	+	35,0	+	31,6
dulcis Tetenyi Kemenyheju	+	32,0	-	-	+	28,5	+	35,0	+	31,4
dulcis Tuono	+	31,5	+	33,7	+	30	+	35,4	+	30,7
dulcis Turkmenskii Otlichitel	+	31,0	+	26,6	+	29,5	+	35,0	+	31,4
dulcis unknown	+	32,0	+	33,8	+	32	+	38,0	+	32,4
almond bitter 1	-	-	+	29,5	-	-	-	-	-	-
almond bitter 2	+	25,8	+	32,0	+	28	+	27,8	+	25,8
almond sweet	+	26,5	+	27,0	+	25	+	28,7	+	25,5
almond sweet 2	+	28,7	+	26,0	+	26	+	29,5	+	26,8
mandla 1	+	27,3	+	24,5	+	24	+	29,2	+	26,8
mandla 2	+	25,8	+	20,7	+	23	+	26,9	+	24,8
mandla MN-VS-1	+	27,2	+	26,7	-	-	-	-	+	27,6
mandla Vama	+	26,8	+	29,7	+	25	+	31,4	+	26,9
Casa Nova	+	27,5	+	24,5	+	24,2	+	25,6	+	26,7
Ferraduel	+	26,4	+	27,0	+	25,6	+	25,3	+	25,8
Ferragnes	+	28,7	+	30,5	+	26,5	+	27,3	+	28,6
Ferrastar	+	28,2	±	42,6	+	26,2	+	26,3	+	26,8
Gloriette	+	32,8	+	30,2	+	29,9	+	29,5	+	30,2
Marcelina	+	24,9	+	36,5	+	24,9	+	24,9	+	24,9
Marcona	+	28,5	+	30,7	+	26,7	+	26,6	+	26,6
Orelha de Mula	+	26,3	+	32,0	+	24,7	+	25,7	+	30,5
Orelha de Mula 2	+	36,5	+	22,8	+	29,9	+	30,2	+	27,3
Pegarinhos	+	27,1	+	37,2	+	25,9	+	26,5	+	27,6
Pegarinhos 2	+	28,7	±	40,7	+	29,2	+	26,9	+	28,5
Refego	+	26,4	+	21,9	+	26,5	+	25,8	+	26,4
broskev 2	-	-	-	-	-	-	+	29,0	+	35,6
broskev Alberta	-	-	-	-	+	38	+	23,0	+	23,7
broskev Luna	-	-	-	-	+	38	+	22,0	+	23,2
broskev Red heaven	-	-	-	-	+	38,5	+	22,0	+	23,9
třešeň Vistuk	-	-	-	-	-	-	+	27,5	+	28,0
třešeň VUP	-	-	-	-	±	40,5	+	27,0	+	27,9
meruňka 1	-	-	-	-	-	-	+	30,0	+	34,0
meruňka 2	-	-	-	-	-	-	+	28,5	+	32,4
meruňka Bulida	-	-	±	45,0	-	-	+	24,0	+	26,8
meruňka Karola	-	-	-	-	-	-	+	27,0	+	27,9
meruňka Madarska	-	-	-	-	-	-	+	25,0	+	27,8
meruňka Veharda	-	-	-	-	-	-	+	25,5	+	28,7
meruňka Velkopavlovická	-	-	-	-	-	-	+	26,5	+	29,2
meruňka Vesprima	-	-	+	41,0	-	-	+	26,5	+	32,3
pološvestka	-	-	-	-	±	40	+	24,0	+	23,5
ringle	-	-	+	36,0	±	43	+	24,5	+	28,0
švestka Bystricka	-	-	-	-	+	38	+	24,5	+	23,9
švestka Laetitia	-	-	-	-	+	39	+	25,0	+	25,5
švestka Stanley	-	-	±	40,0	+	38	+	25,5	+	25,5
švestka Vistuk	-	-	-	-	±	40	+	26,0	+	26,4
višeň Vistuk	-	-	-	-	±	41,5	+	27,0	+	29,5

Z tabulky (tab. 13) jasně vyplývá, že naše snaha o vyvinutí metody na detekci mandlí v potravinách nevedla k úspěchu. Ze všech testovaných metod se nejlépe jeví systém s primery COX, tedy komerční kit SureFood<sup>®</sup>. Tento systém měl jediný nedostatek, při testu inkluzivitu neamplifikoval mandli Almond bitter 1.

V rámci vývoje bylo navrženo vícero dalších nových primerů, například na gen nsLTP tři forward primery a čtyři reverse primery, ani jedna jejich kombinace ale nebyla úspěšná.

Problematické vzorky byly sekvenovány (např. mandle Almond bitter 1), resp. úseky příslušného genu, aby bylo možno určit příčinu neamplifikace. Při přípravě na sekvencování se ale vyskytla řada problémů, nedařilo se naamplifikovat příslušnou DNA v potřebném množství a kvalitě, proto výsledky ze sekvenování byly zmatené a tím nepoužitelné. Pravá příčina neamplifikace DNA mandle Almond bitter 1 tak zůstala neodhalena.

## DISKUSE

Cílem práce bylo navrhnout, vyvinout a otestovat metody na detekci potravinových alergenů rostlinného původu. Tyto alergeny lze analyzovat dvěma metodami, přímo a nepřímo. Přímá metoda je orientována na konkrétní proteiny způsobující alergii. V důsledku různých procesů při výrobě potravinářských produktů jako například změny teploty, pH, iontové síly a podobně, se mění rozpustnost proteinů a jejich detekce je obtížná. Nepřímá metoda je orientována na jiný, stabilnější a odolnější marker – DNA. K analýze DNA se používá PCR a její různé varianty. V naší práci jsme proto zvolili jako marker pro detekci alergenů DNA, konkrétně specifické úseky vybraných genů příslušných alergenů.

Zaměřili jsme se na tři potravinové alergeny – soju, mandle a pistácie. Pro soju bylo cílem vyvinout kvantitativní metodu, pro mandle a pistácie kvalitativní metodu.

Pro detekci soje v masových výrobcích jsme navrhli primery a sondu orientované na gen *lec* kódující lektin specifický pro soju. Nejdříve byly testovány kvalitativní parametry metody a poté byly vyvíjeny postupy kvantifikace.

První kvalitativní parametr – teoretický detekční limit – ukázal míru citlivosti metody v ideálních podmínkách. Výsledný limit detekce 2,75 pg, tedy 2,43 genomových ekvivalentů *Glycine max*, je srovnatelný s jinými publikovanými metodami určenými na detekci sóje v potravinách.

Další parametr – inkluzivita – byl testován na různých odrůdách soje původem z Kanady, Francie a Japonska. Test prokázal amplifikaci u všech vzorek, byl tedy 100 %.

Exkluzivita jako další kvalitativní parametr byla testována na vzorcích DNA příbuzných druhů a také DNA potravinových matric, které by se mohly vyskytovat v masových výrobcích společně se sojou. Některé vzorky byly sice amplifikovány, ale až při vysokých hodnotách Ct (nad 38), takže byly pod detekčním limitem navržené metody, proto mohly být považovány za negativní. Exkluzivita byla tedy 100 %.

Praktický detekční limit byl testován pomocí modelových vzorků s definovanými obsahy soje. Vzorek s nejmenším hmotnostním podílem soje, který byl ještě amplifikován, byl 0,02 % (w/w), což odpovídá hodnotě 200 mg/kg.

Metoda pak byla testována na reálných vzorcích potravin z běžné maloobchodní sítě. Naměřené výsledky byly konfrontovány s údaji deklarovanými na obalech příslušných potravin.

Jelikož navržená metoda splnila všechny parametry kvalitativní analýzy, bylo přistoupeno k možnosti kvantifikace metody. Byly připraveny tři řady modelových vzorků s definovanými obsahy soje, každá s jiným sojovým preparátem. Izolovaná DNA byla použita na real-time PCR a byly tak vytvořeny tři kalibrační křivky závislosti prahového cyklu na logaritmu koncentrace. Optimalizací výsledků bylo dosaženo takových parametrů jednotlivých křivek, že lze tyto křivky považovat téměř za shodné. To také ukazuje, že obsah sojové DNA v různých sojových preparátech je téměř shodný, zřejmě technologický proces přípravy těchto preparátů má nulový nebo jen minimální vliv na obsah DNA ve výsledných produktech.

Po aplikování kalibračních křivek na výpočet obsahu soje v reálných vzorcích potravin poskytovaly tyto přibližně stejné výsledky. Ukázalo se tak, že nejvíce soje se přidává do párků, obsah soje byl až 6 %.

Korelační koeficienty těchto kalibračních křivek by se možná daly vylepšit delší a pečlivější přípravou modelových vzorků, aby se dosáhlo co nejlepší homogenity matrice, také by možná pomohlo připravovat jednotlivé vzorky ve velkém objemu. Daly by se tak eliminovat chyby při navažování, které se více projevují při práci s malými objemy.

Kvantitativních metod na detekci alergenů založených na real-time PCR je zatím velmi málo, jsou to zatím spíše pokusy o kvantifikaci [24], [25]. Srovnávat tedy navrženou metodu na detekci soje v masových výrobcích zatím není s čím.

Pro detekci pistácií v potravinách byly navrženy primery a sonda orientované na gen *COR* kódující stresový protein dehydrin. Cílem bylo vyvinout a otestovat kvalitativní metodu, která by v budoucnu byla použitelná na kvantifikaci nebo multiplexovou analýzu. Byly testovány kvalitativní parametry důležité pro etablování metody.

Detekční limit byl stanoven na hodnotě 3,5 pg. Vzhledem k tomu, že molekulová hmotnost genomu pistácie není známa, nelze detekční limit vyjádřit jako počet genomových ekvivalentů.

Inkluzivita byla testována na 22 odrůdách pistácie, byly úspěšně amplifikovány všechny vzorky.

Exkluzivita byla ověřována na příbuzných druzích a také na dalších druzích potravinových matric, které by se mohly vyskytovat dohromady s pistáciemi. Kromě pozitivní kontroly byly všechny vzorky negativní, nedošlo tedy k jejich amplifikaci. Exkluzivita tak byla 100 %.

Pomocí modelových vzorek s definovaným obsahem pistácií byl určen praktický detekční limit navržené metody. Vzorek s nejmenším hmotnostním podílem pistácií, který byl ještě amplifikován, byl 0,002 % (w/w), což odpovídá hodnotě 20 mg/kg.

Metoda pak byla testována na reálných vorech potravin z běžné maloobchodní sítě. Naměřené výsledky byly konfrontovány s údaji deklarovanými na obalech příslušných potravin.

U mandlí bylo cílem vyvinout kvalitativní metodu, která by splňovala všechny parametry. Ve světě je problém spolehlivé detekce mandlí stále nevyřešen, i když je dostupná souprava na detekci mandlí, náš výzkum prokázal, že ani tento kit není stoprocentní. Bylo testováno vícero publikovaných metod orientované na různé geny, sami jsme také několik primerů a sond navrhli, bohužel ani jedna varianta neposkytuje uspokojivé výsledky.

## **ZÁVĚR**

Vzrůstající počet potravinových alergií je stále vážnějším zdravotnickým problémem. Výzkumné studie poukazují na rostoucí počet alergií u světové populace, proto je potřebné věnovat této problematice odpovídající pozornost.

Při předcházení alergickým reakcím mají pacienti jen jednu možnost a to úplně vyloučit konzumaci potravin obsahujících daný alergen. Spotřebitel musí být tedy informován o všech složkách potravin, které jsou dostupné v obchodní síti. Pro výrobce potravin vyplývá povinnost označovat všechny složky nacházející se v potravinářském výrobku. To vede k potřebě tyto údaje na obalech ověřovat testováním potravin, jsou tedy nutné citlivé a spolehlivé metody na detekování jednotlivých alergenů v potravinách a potravinářských výrobcích. První takové metody se zaměřovaly na analýzu proteinů, nyní je v centru zájmu vhodnější marker – DNA. Ta je přítomna v každém živočišné i rostlinné tkáni, specifické určení přítomnosti alergenu je tak možné i tehdy, když se v technologickém procesu

zpracování suroviny poškodí alergenicí složka. K analýze DNA slouží především PCR a její různé varianty.

Polymerázová řetězová reakce je metoda na rozmnožení definovaného úseku DNA v podmínkách *in vitro*. Proces amplifikace je analogický replikaci DNA probíhající v živých organizmech. Pomocí PCR je možné vytvořit desítky milionů kopií úseku DNA v průběhu několika desítek minut.

V posledních letech se ve výzkumu a analytické praxi čím dál více používá real-time PCR, což je PCR s průběžným monitorováním fluorescence. Zdrojem fluorescence je komplex DNA s interkalačním barvivem, nebo různé označené sondy nebo primery. K hlavním výhodám real-time PCR patří minimalizace rizika kontaminace laboratorního prostředí amplifikovanými fragmenty DNA díky uzavřenosti systému a možnosti kvantifikace specifického fragmentu DNA na základě průběhu amplifikačních křivek. Mezi další výhody patří zkrácení celkového času potřebného na analýzu a vyloučení manipulace s elektroforetickými gely.

V mé práci jsem se zaměřil na tři potravinové alergeny rostlinného původu – soju, pistácie a mandle. Byly navrženy primery a sondy orientované na specifické geny jednotlivých alergenů. Testovaly se základní kvalitativní parametry, jako je detekční limit, inkluzivita, exkluzivita a praktický detekční limit. Metody pak byly aplikovány na reálné vzorky potravin z běžné obchodní sítě.

Podařilo se vyvinout kvantitativní metodu detekce soje v masových výrobcích při zachování vysoké citlivosti a dalších kvalitativních parametrů. Metoda vykazovala dobrý detekční limit, 100% inkluzivitě i exkluzivitě. Také praktický detekční limit ověřený na modelových vzorcích byl dobrý. Kvantifikace byla založena na třech kalibračních křivkách ze tří řad modelových vzorků s různými sojovými preparáty.

Také se podařilo vyvinout kvalitativní metodu na detekci pistácií v potravinách, její detekční limit byl dobrý, inkluzivita i exkluzivita byly 100%, také praktický detekční limit určený za pomoci modelových vzorků potravin s definovaným obsahem pistácií byl velmi dobrý. Metodu tak jistě bude v budoucnosti možné použít na kvantifikaci nebo multiplexovou analýzu, jelikož je metoda orientována na jednokopiový gen.

Vyvinout kvalitativní metodu na detekci mandlí se nepodařilo. I ve světě zůstává tento problém nevyřešen.

## LITERATURA


- [1] Al Soud, W. A., Lantz, P. G., Backman, A., Olcen, P., Rådström, P.: A sample preparation method which facilitates detection of bacteria on blood cultures by the polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods*, 32, 1998, s. 217-224.
- [2] Al Soud, W. A., Rådström, P.: Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1998, s. 3748-3753.
- [3] Allmann, M., Candrian, U., Höfelein, C., Lüthy, J.: Polymerase chain reaction (PCR). A possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 196, 1993, s. 248-251.
- [4] Altwegg, M.: General problems associated with diagnostic applications of amplification methods. *J. Microbiol. Met.* 23, 1995, s. 21-30.
- [5] Astwood, J. D., Leach, J. N., Fuchs RL (1996). Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nature Biotechnology*, 14, s. 1269—1273.
- [6] Bergerová, E., Brežná, B., Kuchta, T.: A novel method with improved sensitivity for the detection of peanuts based upon single-tube nested real-time polymerase chain reaction. *Eur Food Res Technol.* 232, 2011, s. 1087-1091
- [7] Beyer, K., Grishina, G., Bardina, L., Grishin, A., Sampson, H. A.: Identification of an 11S globulin as a major hazelnut food allergen in hazelnut-induced systemic reactions. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 110(3), 2002, s. 517-23.
- [8] Bertheau, Y., Diolez, A., Kobilinsky, A., Magin, K.: Detection methods and performance criteria for genetically modified organisms. *Journal of AOAC International*, 85, 2002, s. 801-808.
- [9] Breiteneder, H., Radauer, C.: A classification of plant food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113 (5), 2004, s. 821-830
- [10] Brežná, B., Hudecová, L., Kuchta, T.: Detection of pea in food by real-time polymerase chain reaction (PCR). *Eur. Food Res. Technol.*, 222, 2006, s. 600-603.
- [11] Brežná B., Dudánová H., Kuchta T.: A novel real-time polymerase chain reaction method for the qualitative detection of pistachio in food. *Eur Food Res Technol*, 2008, s. 197–203
- [12] Costa J., Mafra I., Oliveira B.: High resolution melting analysis for the detection of Pru du 5 almond allergen in foods. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2011, 30 s.
- [13] Crevel, R. W., Kerkhoff, M. A., Koning, M. M.: Allergenicity of refined vegetable oils. *Food Chemical Toxicology*, 38 (4), 2000, s. 385-393.

- [14] Dahinden, I., von Büren, M., Lüthy, J.: A quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for coeliac patients. *Eur. Food Res. Technol.*, 212, 2001, s. 228–233.
- [15] DeFillipes F. M.: Decontaminating the PCR. *BioTechniques* 10, 1991, s. 26-30
- [16] Directive 2003/89/EC of the European Parliament and of the Council of 10 November 2003 amending Directive 2000/13/EC as regards indication of the ingredients present in foodstuffs. *Off J Eur Union L* 308, 15-18
- [17] Espy, M. J., Smith, T. F., Persing, D. H.: Dependence of PCR product inactivation protocols on amplicon length and sequence composition. *J. Clin. Microbiol.* 31, 1993, s. 2361-2365.
- [18] Fredricks D. N., Relman D. A.: Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. *Clin. Infect. Dis.*, 29 (1999), pp. 475–478
- [19] Greisen, K., Loeffelholz, M., Purohit, A., Leong, D.: PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 1994, s. 335-351.
- [20] Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., Williams, P. M.: Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6, 1996, s. 986-994.
- [21] Herman, L., De Block, J., Viane, R. Detection of hazelnut DNA traces in chocolate by PCR. *Int. J Food Sci. and Technol.* 38, 2003s 633–640.
- [22] Koch, P., Schächli, G. F., Poms, R. E., Wüthrich, B., Anklam, E., Battaglia, R.: Comparison of commercially available ELISA kits with human sera-based detection methods for peanut allergens in foods. *Food Additives and Contaminants*, 20 (9), 2003, s. 797-803.
- [23] Koppelman, S. J., Hefle, S. L.: Detecting allergens in food. *Woodhead publishing Anglicko*, 2006, ISBN-10: 1-84569-055-9, 412 s.
- [24] Köppel R., Dvorak V., Zimmerli F., Breitenmoser A., Eugster A., Waiblinger H.: Two tetraplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from eight allergens in food. *European Food Research and Technology*, 2010, Volume 230, Issue 3, pp 367-374
- [25] Köppel R., van Velsen-Zimmerli F., Bucher T.: Two quantitative hexaplex real-time PCR systems for the detection and quantification of DNA from twelve allergens in food, *European Food Research and Technology*, 2012, Volume 235, Issue 5, pp 843-852

- [26] Kuchta, T., Kacálková, E., Oravcová, K.: Contained detection of food-borne pathogenic bacteria by 5'-nuclease polymerase chain reaction and end-point fluorimetry. In: *Riley, A. P.: Food policy, control and research*. Hauppauge : Nova Science Publishers, 2005.
- [27] Kuchta, T.: Metódy identifikácie geneticky modifikovaných organizmov. In: Timko, J. - Siekel, P. - Turňa, J.: *Geneticky modifikované organizmy*. Bratislava: *Veda*, 2004, s. 75-78.
- [28] Kuchta, T.: Metódy na dôkaz alergénnych zložiek potravín polymerázovou reťazovou reakciou. *Slovenský veterinársky časopis*, 4, 2004, s. 29-30.
- [29] Leidinger C.: Entwicklung von Real Time PCR-Methoden zur Bestimmung von Mandel und Haselnuss in Lebensmitteln. 2009, 149 s.
- [30] Levin, R. E.: The application of real-time PCR to food and agricultural systems. A review. *Food Biotechnology*, 18, 2004, s. 97-133.
- [31] Livak, K. J., Flood, S. J., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K.: Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and Applications*, 4, 1995, s. 357-362.
- [32] Longo, M. C. - Berninger, M. S. - Hartley, J. L.: Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*, 93, 1990, s. 125-128.
- [33] Mari A, Rasi C, Palazzo P.: Allergen databases: Current status and perspectives. *Current Allergy and Asthma reports*, 9 (5), 2009, s. 376-383.
- [34] Meier, A., Persing, H. D., Finken, M., Bottger, E. C.: Elimination of contaminating DNA within PCR reagents: implications for a general approach to detection of uncultured pathogens. *J. Clin. Microbiol.*, 31, 1993, s. 646-652.
- [35] Nogva, H. K., Rudi, K.: Potential influence of the first PCR cycles in real-time comparative gene quantifications. *BioTechniques*, 37, 2004, s. 246-253.
- [36] Pardigol, A., Guillet, S., Pöpping, B.: A simple procedure for quantification of genetically modified organisms using hybrid amplicon standards. *European Food Research and Technology*, 216, 2003, s. 412-420.
- [37] Píknová, L., Kuchta, T., Drahovská, H., Pangallo, D.: Determinazione del tasso di recupero del DNA dagli alimenti. *Industrie Alimentari*, 43, 2004, s. 1129-1132.
- [38] Prince, A. M., Andrus, L.: PCR: How to kill unwanted DNA. *BioTechniques*, 12, 1992, s. 358-360,

- [39] Poms, R. E., Klein, C. L., Anklam, E.: Methods for allergen analysis in food: a review. *Food additives and contaminants*, 21 (1), 2004, s. 1-31.
- [40] Pöpping, B.: The application of biotechnological methods in authenticity testing. *Journal of Biotechnology*, 98, 2002, s. 107-112.
- [41] Rossen, L., Norkov, P., Holmstrom, K., Rasmussen, O. F.: Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*, 17, 1992, s. 37-45.
- [42] Röder M., Vieths S., Holzhauser T.: Sensitive and specific detection of potentially allergenic almond (*Prunus dulcis*) in complex food matrices by Taqman® real-time PCR in comparison to commercially available protein based ELISA. *Analytica Chimica Acta*, 2010, ACA-10-1882
- [43] Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 1988, s. 487-491.
- [44] Saiki, R. K., Scharf, S. J., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N.: Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230, 1985, s. 1350-1354.
- [45] Sarkar, G. - Sommer, S.: Shedding light on PCR contamination. *Nature*, 343, 1990, s. 27.
- [46] Schoder, D., Schmalwieser, A., Schauburger, G., Kuhn, M., Hoorfar, J., Wagner, M.: Physical characteristics of six new thermocyclers. *Clinical Chemistry*, 49, 2003, s. 960-963.
- [47] Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžicková, V., Koptíková, J.: *Metody molekulární biologie*. 1. vydání Brno: muniPRESS, 2010. 188 s. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [48] Thisted Lambert, S., Ballagi-Pordány, A., Lindqvist, R.: A mimic as internal standard to monitor PCR analysis of food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 1998, s. 9-11.
- [49] Turňa, J., Stuchlík, S., Drahovská, H., Gálová, Z., Timko, J.: *Techniky rekombinantných molekul*. Bratislava. *Veda*, 2004, 152 s.
- [50] van Ree, R.: Carbohydrate epitopes and their relevance for the diagnosis and treatment of allergic diseases. *Int. Arch. Allergy Immunol*, 129, 2002, s. 189-197.
- [51] Yang, S., Rothman, R. E.: PCR-based diagnostics for infectious diseases: Uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infectious Diseases*, 4 (6), 2004, s. 337-348.

## ŽIVOTOPIS AUTORA

OSOBNÍ INFORMACE		
Jméno a příjmení	Jiří Šmíd	
Adresa	Nebovidy 88, 664 48 pošta Moravany	
Telefon	728 987 931	
E-mail	ing.jirismid@seznam.cz	
Národnost	česká	
Datum narození	26. 5. 1984	
ZAMĚSTNÁNÍ, VZDĚLÁNÍ A KURZY		
Vysoká škola	VUT Brno, Fakulta Chemická – titul Bc.	2003 – 2007
Státní zkouška z:	organická chemie, bioinženýrství, biotechnologie a potravinářské technologie, biochemie a mikrobiologie	
Vysoká škola	VUT Brno, Fakulta Chemická – titul Ing.	2007 – 2009
Státní zkouška z:	potravinářská chemie a biochemie, potravinářské technologie a biotechnologie	
Vysoká škola	VUT Brno, Fakulta Chemická – doktorské studium	2009 –
Státní zkouška z:	analýza potravin, pokročilá molekulární biotechnologie, pokročilá biochemie	
<b>Certifikáty</b>	Interní auditor ISO 9001 a HACCP	2009
	Vybraný posuzovatel	2013
<b>Kurzy</b>	Zásady správného pipetování	2010
	Inovace PhD studia pro biotechnologické aplikace	2012
<b>Stáže</b>	Presenting scientific content professionally	2012
	Senzorická analýza	2013
	Universidade do Porto – Faculdade de farmácia	3 měsíce
	BioVendor – Laboratorní medicína a.s.	9 měsíců
	Výskumný ústav potravinářský, Bratislava	3 roky a 9 měsíců
<b>Zaměstnání</b>	Bioveta a.s. Ivanovice na Hané	1.10.2013 až 31.1.2014
	vedoucí úseku farmaceutické výroby	
	Pěkný-Unimex s.r.o. technolog	23.6.2014 -

<b>JAZYKY</b>	
Čeština	výborně
Angličtina	velmi dobře
Němčina	základy
<b>SCHOPNOSTI A DOVEDNOSTI</b>	
Řidičský průkaz	B
Práce s počítačem – Excel, Word, PowerPoint, internet, plynová a kapalinová chromatografie, HPLC	VUT, Pěkný – Unimex s.r.o.
elektroforéza, izotachoforéza, izoelektrická fokusace	VUT
atomová spektrometrie: AAS, AES, AFS	VUT
nukleární magnetická rezonance	VUT
hmotnostní a infračervená spektrometrie	VUT
Práce s PCR	BioVendor
Kultivace buněk	BioVendor
Izolace a purifikace DNA – GeneSpin	BioVendor
Gelová elektroforéza	BioVendor
Transfekce buněk	BioVendor
Práce s fluorimetrem a spektrofotometrem	VÚP
Práce s real-time PCR	VÚP
Izolace a purifikace DNA – CTAB, Wizard Magnetic	VÚP
Transformace buněk	VÚP
<b>PUBLIKAČNÍ ČINNOST</b>	
Bakalářská práce	Metody stanovení fluoru v biologickém materiálu
Diplomová práce	Vývoj protokolu pro transientní transfekci buněčné linie HEK293 EBNA1
Pojednání k disertační práci	Identifikace DNA rostlinných a živočišných druhů v potravinách použitím polymerázové řetězové reakce
odborný článek v Journal of Food and Nutrition Research (1. autor)	Semi-quantitative estimation of soya protein-based additives in meat products using real-time polymerase chain reaction
odborný článek v Molecular and Cellular Probes (2. autor)	In silico and experimental evaluation of DNA-based detection methods for the ability to discriminate almond from other Prunus spp.

<b>ÚČAST NA KONFERENCÍCH</b>	
Chemistry and Life – VUT Brno, Fakulta Chemická – 2012	poster
XLI. symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin - Skalský Dvůr u Bystřice nad Pernštejnem – 2011	přednáška
Stretnutie mladých vedeckých pracovníkov v potravinárstve – Košice – 2011	poster
Tématické odborné semináře – VÚP Bratislava – 2009-2013	účastník
<b>REFERENCE</b>	
Mojmír Ševčík, PhD. – BioVendor, sevcik@biovendor.com, tel.: 549 124 187	
RNDr. Tomáš Kuchta, DrSc. – VÚP Bratislava, kuchta@vup.sk, tel.: 02/50237111, kl. 167	
Isabel Mafra, PhD – Universidade do Porto, isabel.mafra@ff.up.pt	
Mgr. Michal Janča, PhD. – Bioveta a.s., janca.michal@bioveta.cz, tel.: 517 318 594	
Barbara Loter-Krystek – Prymat (Pěkný-Unimex), bloterkrystek@prymat.pl, tel: +48/324 733 144	

## **SOUHRN PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI AUTORA**

### **Odborné články**

Šmíd, J., Godálová, Z., Píknová, L., Siekel, P., Kuchta, T.: **Semi-quantitative estimation of soya protein-based additives in meat products using real-time polymerase chain reaction** - *Journal of Food and Nutrition Research*. 2015, 165 – 170

Brežná B., Šmíd J., Costa J., Radvanszky J., Mafra I., Kuchta T.: **in silico and experimental evaluation of DNA-based detection methods for the ability to discriminate almond from other *Prunus* spp.** – *Molecular and Cellular probes*. 2014, 1 – 17

### **Konferenční příspěvky**

#### **Přednášky**

Šmíd J., Godálová Z., Píknová L., Kuchta T.: **Identifikace sóje v potravinářských výrobcích metodou real-time PCR** – *Sborník příspěvků - XLI. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin 23. – 25. 5. 2011 Skalský Dvůr*, 2011

#### **Postery**

Šmíd J., Godálová Z., Píknová L., Kuchta T.: **Identification of soybean in foodstuff by real-time PCR method** – *Chemické listy*, 105, 2011, 1037-1038