

Průkaz falšování potravin na základě analýzy DNA

Bc. Jana Bruštková

Diplomová práce
2011

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav biochemie a analýzy potravin

akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jana BRUŠTÍKOVÁ**
Osobní číslo: **T090210**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Průkaz falšování potravin na základě analýzy DNA**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Popsat aspekty falšování potravin.
2. Popsat metody průkazu falšování potravin.

II. Praktická část

1. Analyzovat metodou PCR vybrané vzorky potravin se zaměřením na průkaz živočišných surovin.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] Eur Food Res Technol (2008) 227:649-665.

[2] Trends in Food Science and Technology 11 (2000) 67-77.

[3] ZEIDAN, Henry M, DASHEK, William V. Experimental approaches in biochemistry and molecular biology, Dubuque, Wm. C. Brown, 1996.

[4] PAČES, Václav, RUML, Tomáš, RUMLOVÁ, Michaela Genové inženýrství Vyd. 1. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická, 2002.

[5] Vysoká škola chemicko-technologická v Praze Bioanalytické metody Vyd. 3., přeprac. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická, 2001.

Vedoucí diplomové práce:

MVDr. Ivan Holko, Ph.D.

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

25. února 2011

Termín odevzdání diplomové práce:

20. května 2011

Ve Zlíně dne 21. března 2011


doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan




doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 11.5.2011

..... Janou Bruščíková

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce byla zaměřena na identifikaci tkání jednotlivých živočišných druhů vyskytujících se v masných výrobcích na základě analýzy DNA.

Teoretická část se zabývala problematikou falšování potravin. Byly popsány jednotlivé aspekty falšování potravin a příklady. Dále byly popsány jednotlivé metody používané k průkazu falšování potravin. Celkem byly popsány dva typy metod a to klasické metody a metody založené na analýze DNA. V praktické části bylo analyzováno dvacet vybraných vzorků masných výrobků se zaměřením na průkaz živočišných surovin tří druhů hospodářských zvířat metodou polymerázové řetězové reakce (PCR).

U většiny masných výrobků neodpovídala detekovaná DNA složení, které uváděli výrobci na obalu. U těchto výrobků bylo prokázáno falšování potravin náhradou jakostního druhu masa za surovinu méně hodnotnou. U dvaceti analyzovaných vzorků byla nejčastěji přítomna vepřová DNA, dále kuřecí DNA a pouze dva vzorky obsahovaly hovězí DNA.

V diskuzi byla hodnocena kvalita vzorků a byly popsány důvody výskytu nedeklarovaného masa ve složení výrobku.

Klíčová slova: falšování potravin, masné výrobky, DNA, PCR

ABSTRACT

This thesis is focused to identification of the various tissues of species occurring in meat products based on DNA analysis.

The theoretical part deals with the issue of food adulteration. Various aspects and examples of food adulteration are described here. Other various analytical methods used for the detection of food adulteration are also described in the thesis. In total, two types of methods, respectively classical methods and methods based on DNA analysis are included. The practical part is analyzing twenty selected samples of meat products focusing on proof of animal DNA of three kind of livestock by polymerase chain reaction method (PCR).

Determined DNA composition did not correspond with components, which were reported by manufacturer on the packaging in most meat products. These products have been adulterated by substituton of quality meat by less valuable raw material. Twenty samples mostly contained of pork DNA, as well as chicken DNA and only two samples contained beef DNA.

Quality of the samples and reasons of the presence of undeclared meat product composition were reported in the discussion.

Key words: adulteration of food, meat products, DNA, PCR

Touto cestou bych chtěla poděkovat svému vedoucímu diplomové práce MVDr. Ivanu Holkovi, Ph.D. za vynikající vedení mé práce, za cenné rady a za čas, který mi věnoval. Velké poděkování patří také celé mé rodině, která mne po celou dobu mého studia podporovala.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

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

Ve Zlíně, 11.5. 2011

Bruštková Jana

Bruštková Jana

OBSAH

OBSAH	8
ÚVOD.....	11
I. TEORETICKÁ ČÁST	13
1 POJEM FALŠOVÁNÍ POTRAVIN	14
1.1 PŘÍKLADY FALŠOVANÝCH POTRAVIN.....	15
1.1.1 MASO A MASNÉ VÝROBKY.....	15
1.1.2 MLÉČNÉ VÝROBKY	16
1.1.3 OSTATNÍ MOŽNOSTI FALŠOVÁNÍ POTRAVIN.....	17
1.2 OCHRANA SPOTŘEBITELE PŘED FALŠOVÁNÍM POTRAVIN	18
1.2.1 PŘÍSTUP EU K PROBLEMATICE FALŠOVÁNÍ POTRAVIN	18
1.2.3 LEGISLATIVA SOUVISEJÍCÍ S FALŠOVÁNÍM POTRAVIN.....	19
1.2.4 DOZOR EU NAD EKOZEMĚDĚLSTVÍM A GENETICKY UPRAVOVANÝMI POTRAVINAMI.....	20
1.3 OBCHÁZENÍ ZÁKONA ZÁMĚRNÝM NEOZNAČENÍM PŘÍTOMNOSTI ALERGENŮ A GENETICKY MODIFIKOVANÝCH ORGANISMŮ.....	21
1.3.1 SKRYTÉ ALERGENY	21
1.3.2 GENETICKY MODIFIKOVANÉ ORGANISMY	23
2 KLASICKÉ METODY PRUKAZU FALŠOVÁNÍ POTRAVIN.....	24
2.1 METODA ELISA	25
2.1.1 NEPŘÍMÁ KOMPETITIVNÍ ELISA	25
2.1.2 PŘÍMÁ NEKOMPETITIVNÍ METODA – SANDWICH.....	25
2.2 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE (HPLC).....	26
2.3 PLYNOVÁ CHROMATOGRFIE VE SPOJENÍ S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ (GC-MS).....	27
3 METODY ZALOŽENÉ NA ANALÝZE DNA.....	29
3.1 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR).....	30
3.1.1 PRINCIP METODY	31
3.2 MNOHONÁSOBNÁ PCR (MULTIPEX PCR)	33
3.3 POLYMORFISMUS DÉLKY RESTRIKČNÍCH FRAGMENTŮ (RFLP)	34
3.4 KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR (QPCR).....	35
II. PRAKTICKÁ ČÁST	37
4 MATERIÁL A METODIKA.....	38
4.1 PRACOVNÍ POMŮCKY.....	39

4.2	CHEMIKÁLIE	40
4.3	IZOLACE DNA ZE VZORKU	41
4.3.1	PRACOVNÍ POSTUP	41
4.4	ANALÝZA VZORKU METODOU MULTIPLEX PCR	42
4.4.1	PCR PRIMERY	42
4.4.2	PŘÍPRAVA REAKČNÍ SMĚSI	42
4.4.3	AMPLIFIKACE DNA	43
4.4.4	DETEKCE PCR PRODUKTU	44
4.5	PRŮKAZ JEDNOTLIVÝCH DRUHŮ V SAMOSTATNÝCH PCR.	46
5	VÝSLEDKY	48
5.1	METODA MULTIPLEX PCR.....	48
5.2	DRUHOVĚ SPECIFICKÁ PCR PRO VEPŘOVÉ MASO	49
5.3	DRUHOVĚ SPECIFICKÁ PCR PRO HOVĚZÍ MASO.....	49
5.4	DRUHOVĚ SPECIFICKÁ PCR PRO DRŮBEŽÍ MASO	50
6	DISKUZE.....	53
	ZÁVĚR.....	58
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	59
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	64
	SEZNAM OBRÁZKŮ	66
	SEZNAM TABULEK.....	67

ÚVOD

Falšování potravin a dozor nad potravinami mají své kořeny už v dávné minulosti. Nejstarší předpisy, nařízení a zákony byly vždy citlivým odrazem jisté společensko-ekonomické formace a jedním ze znaků kulturní vyspělosti národa. Z toho důvodu vždy vycházely a opíraly se o stávající obecnější zákony společnosti. Již od dávných dob jsou někteří lidé ochotni se neoprávněně obohacovat na úkor finanční ztráty a rizika poškození zdraví jiných [1].

Falšování potravinářských výrobků znamená nedodržení deklarovaného složení, uvádění nesprávného původu a stáří u zboží nebo také záměrné vydávání výrobku za jiný výrobek. Falšování je stálým problémem výroby potravin. Falšování potravin postihuje všechny komodity potravinářských výrobků, zejména drahé výrobky a výrobky, které se vyrábějí ve větších objemech, protože jejich falšování může přinést nepoctivému výrobcí nemalý zisk.

Potraviny pocházející z České republiky v žádném případě nezaostávají ve kvalitě a bezpečnosti za potravinami evropskými. V České republice má dozor nad kvalitou a bezpečností několik kontrolních organizací. Každá organizací má svůj rozsah pravomocí a působnosti. Podobně je i tomu v rámci Evropské unie. Některá ustanovení českých zákonů ve směru k výrobcům potravin mají ještě přísnější měřítko, než zákony Evropské unie.

Se zvyšující se možností falšování potravin se ovšem také rozšiřují možnosti jeho detekce a četnost případů snižuje řada nových opatření a rozvoj moderních efektivních metod. Metody detekce jsou založeny na fyzikálních, chemických a biochemických a mikroskopických metodách. Některé falšované potraviny lze prokázat snadno, horší je to například u identifikace jednotlivých druhů masa. Určování druhu masa a masných výrobků se dostává do popředí zájmu odborné i laické veřejnosti.

Metody zaměřené na identifikaci druhově specifických proteinových komponent zahrnují metody fyzikálně-chemické, imunologické a metody molekulární genetiky. Takovéto metody dokážou potvrdit konkrétní druh masa nebo také rozlišit několik druhů masa v masných výrobcích, a tím ověřit dodržování jejich receptur a deklarácí. V současné době se používá pro identifikaci jednotlivých druhů masa metoda polymerázové řetězové reakce PCR. Tato metoda je jednou z nejvíce specifických metod a nachází zde velké uplatnění. Metoda PCR je schopna rozpoznat různé druhy masa a je schopná detekovat i velmi malé množství přidaného masa [2].

Cílem diplomové práce je analyzovat metodou PCR dvacet vzorků masných výrobků se zaměřením na průkaz živočišných surovin tří druhů hospodářských zvířat (skotu, prasete a kuřete).

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 POJEM FALŠOVÁNÍ POTRAVIN

Slovo falzifikace je převzaté z latinského výrazu falzum, což je možné přeložit do českého jazyka buď jako padělek, nebo podvrh, anebo napodobenina. V dnešní době požaduje spotřebitel jasnou a přesnou informaci o složení potravin, které souvisí s módním trendem, životním stylem (vegetariánství), různým tipem zdravotních diet, náboženskými tradicemi, hrozbou geneticky modifikovaných potravin, zvyšujícím se výskytem alergií a také konzumací tradičních a exkluzivních specialit. V těchto případech je lákavé z ekonomických důvodů falšovat drahé komponenty levnějšími [3,4,5]. Falšují se zejména drahé produkty nebo produkty, které se vyrábějí ve větších objemech, neboť jejich falšování může přinést nepoctivému výrobcí obrovský zisk.

Samotný spotřebitel většinou není schopen falšovanou potravinu spolehlivě rozpoznat. Jen u některých potravin je možné falšování odhadnout podle senzorických vlastností. Bez komplexního posouzení hodnoceného vzorku v laboratořích tedy, bez nákladných laboratorních technik založených na metodách PCR, magnetické rezonanci, chromatografii a enzymové analýze by nebylo možné prokázat, zda je zkoumaný vzorek originál či padělek. Takováto kontrola patří mezi priority kontrolních orgánů, což je zejména Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI). Tato organizace se zaměřuje především na ověření pravosti a 100% podílu, ale také na ověření minimálního podílu (stanoveného předpisem nebo deklarovaného), a na správnost označování a balení [6].

Falšováním potravinových výrobků se rozumí :

- náhrada nákladné suroviny za levnou
- nedodržení deklarovaného složení
- použití jiné než deklarované technologie
- maskování nedodržení receptury
- nesprávné uvedení místa původu a stáří u zboží
- záměrné vydávání výroku za jiný výrobek
- dražší složka potravin nahrazena alergenní složkou

Falšování potravin je v současnosti velkým problémem při výrobě potravin. Se zvyšujícími se možnostmi falšování se však zároveň zvyšují možnosti jeho detekce a četnost případů redukuje řada nových opatření a rozvoj moderních efektivních metod [7].

1.1 Příklady falšovaných potravin

Ze zjištění Státní zemědělské a potravinářské inspekce (SZPI) v oblasti kontroly falšování potravin vyplývá, že mezi kritické komodity patří luxusní potraviny (lihoviny, víno, koření) a potraviny, které se prodávají ve velkém množství (masné a mléčné výrobky, tuky a oleje, káva a kakao, ovocné šťávy, zmrzliny, vaječný koňak, vaječné těstoviny) [8].

1.1.1 Maso a masné výrobky

Masné výrobky většinou obsahují více druhů svaloviny jatečných zvířat, koření a různé druhy přídatných látek. Falšování masa a mezidruhová záměna surovin pro výrobu masných výrobků je společným problémem mnoha zemí.

Mezi nejčastější způsoby falšování patří:

- nahrazení levnějšího druhu masa, než je uvedeno na etiketě
- snižování podílu masa v masných výrobcích, náhradou masa jinými surovinami (tuk, kůže, voda, mouka, sójová bílkovina apod.)
- používání rostlinných bílkovin pokud nejsou uvedeny ve složení na etiketě
- různé maskování vad masa pomocí barviv, koření a konzervačních prostředků
- použití mechanicky separovaného masa místo masa vykostěného
- úmyslné odstranění složky masa nebo nahrazení specifické součásti nspecifickou součástí [9]

Důvody pro takovéto chování jsou nejčastěji ekonomické, protože se nahrazuje surovina dražší a méně dostupná surovinou levnější a dostupnější. Pro kontrolu složení masných výrobků bylo vypracováno několik metod, díky kterým lze nepoctivé jednání výrobců odhalit. Jednou z nejvíce specifických metod pro zjištění falšování potravin je metoda PCR

(polymerázová řetězová reakce) umožňující přesnou identifikaci surovin biologického původu. PCR je schopna rozlišit jednotlivé druhy mas použitých v masném výrobku a detekovat již 5% přídavek masa. Metoda PCR se provádí většinou na speciálních, dobře vybavených pracovištích a je finančně náročná. Další používanou metodou pro detekci falšovaného masa je imunochemická metoda ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Princip metody ELISA je založen na detekci přítomných živočišných bílkovin pomocí specifických protilátek. Použití metody je limitováno stupněm denaturace bílkovin, která se vytváří při tepelném opracování masných výrobků, záleží především na výši teploty a době, po kterou na výrobek působí [10].

1.1.2 Mléčné výrobky

Tradiční mléčné výrobky se vyrábějí z mléka a jakýkoliv nedeklarovaný přídavek nemléčných bílkovin je zakázán. Při falšování mléčných výrobků se často používá sójová bílkovina jako náhražka mléčné bílkoviny. Tento způsob falšování je velmi atraktivní z hlediska konečné ceny mléčných výrobků, neboť sójové bílkoviny jsou ve srovnání s mléčnými bílkovinami podstatně levnější. Stanovení sójové bílkoviny v mléčných výrobcích není jednoduché, obzvláště tehdy, pokud jsou rostlinné bílkoviny použity jen v malé míře. Podmínky výroby potravin modifikují strukturu sójových bílkovin a to ztěžuje jejich stanovení.

Ke stanovení sójových bílkovin v mléčných výrobcích byly vyvinuty a používají se různé analytické metody: imunologické, elektroforetické a chromatografické. Ve Španělsku byla vyvinuta rychlá metoda pro stanovení přídavku sójových bílkovin do vybraných mléčných výrobků pomocí perfuzní chromatografie s reverzními fázemi. Příprava vzorku k analýze spočívá ve směšování vzorku s vhodným rozpouštědlem a v odstředování. K separaci sójových bílkovin od mléčných dochází za méně než 4 minuty [11].

Falšování spočívá také v záměně mléka od různých druhů živočichů. Existují různé metody, které dokážou identifikovat přítomnost proteinů skotu, ovcí a koz v mléku a mléčných výrobcích. Pro tuto analýzu se používají markery kaseinových frakcí například α 1-kaseinu pro kravské mléko. Frakce para- κ -kaseinu se používá pro stanovení procentuálního podílu kravského, ovčího a kozího mléka v sýrech. Pro odhalení falšovaného mléka byla vyvinuta metoda RP-HPLC-UV, pomocí které je možné separovat a kvantifikovat

jednotlivé frakce α , β a κ kaseinů. Pomocí metody SE-HPLC se prokazuje falšování sušeného odstředěného mléka, to nesmí obsahovat pevné látky ze syrovátky nebo podmáslí [12].

V Itálii bylo zjištěno falšování sýru mozzarella. U tohoto sýru byla nahrazena dražší surovina (buvolí mléko) levnější surovinou (kravské mléko). Takovýmto počínáním si výrobce přijde na nemalý zisk a doplatí na to spotřebitelé. Pro posouzení pravosti produktů a zjištění možných podvodů se využívají metody k detekci proteinu skotu v mléčných výrobcích, které jsou založeny na izoelektrické fokusaci (IEF). Další metoda, která se dnes používá je imunologická metoda ELISA založena na imunoenzymatické reakci. Nepravost výrobku, lze také prokázat pomocí metod HPLC a PCR [13].

Další způsoby falšování mléka:

- vydávání kravského mléka za mléko jiných hospodářských zvířat
- přidavek sójového mléka do mléka
- přidavek vody do mléka
- přidavek rostlinných tuků do mléčných výrobků
- přidavek syrovátky do mléka a mléčných výrobků
- nedodržení deklarovaného způsobu ošetření mléka [14]

1.1.3 Ostatní možnosti falšování potravin

- Ve víně a burčáku je voda; případně obsahují víc cukru, než je povoleno
- Jako portské nebo šampaňské víno může být označeno jen to, které pochází z příslušných oblastí: šampaňské z francouzského Champagne a portské z Portugalska
- Bílá vína jsou barvená na momentálně žádanější červená
- Kečupy obsahují menší podíl rajčat, než stojí na etiketě
- Džemy - uváděné ovoce je někdy nahrazeno jablečnou drtí
- Káva bývá "nastavována" náhražkami - čekankou, sladem, fíky nebo obilovinami
- 100% ovocné šťávy - zahrnují někdy přídavky vody, cukru, silic, kyselin, barviv a dalších levnějších surovin

- Tvrdý alkohol - k jeho výrobě bývá použit syntetický líh
- Olivový olej může být ve skutečnosti vyroben ze směsi jiných rostlinných olejů (nebo slunečnicový olej ze sóje)
- V medu jsou nepovolené cukry nebo sirupy
- V salámech je maso, jaké tam vůbec nemá být [15]

1.2 Ochrana spotřebitele před falšováním potravin

1.2.1 Přístup EU k problematice falšování potravin

Evropská unie se čím dál tím víc zabývá právy spotřebitelů. Chrání je v podobě nařízení, které zajišťuje bezpečnost potravin, zjistitelnost původu potravin a také falšování, nahrazování a jiných forem nesprávného a často záměrně klamavého nabízení potravin.

Díky rozvoji nových a složitějších metod sloužících k ověření pravosti potravin, se zlepšuje spokojenost spotřebitelů.

Tab. 1 Podíl jednotlivých komodit z hlediska falšování potravin [3].

Komodita	%
Oleje, tuky	31
Mléko, mléčné výrobky	24
Ovocné nápoje	12
Maso, masné nápoje	9
Víno	8
Koření, aromata	7
Med	5
Káva, čaj	2
Lihoviny	2
Čokoláda, cukrovinky	1

1.2.2 Autority nesoucí zodpovědnost za prodej falšovaných potravin

- Národní a evropská legislativa
- Státní dozor nad potravinami
- Sdružení výrobců, vlastní kontrolní mechanismy
- Společenské organizace a instituce
- Podpora v této oblasti z pozic státu finanční (dotace pro rozvoj testování a průzkumu trhu) morální, organizační a koncepční (řízení a tvorba legislativy)
-

1.2.3 Legislativa související s falšováním potravin

Povinnosti pro výrobce, dovozce, prodejce potravin

Cílem potravinového práva je chránit zájmy spotřebitelů a poskytovat spotřebitelům základ, který jim umožní vybírat se znalostí potraviny, které konzumují. Jeho cílem je také bránit podvodným praktikám, falšování potravin a jakýmkoli jiným praktikám, které mohou spotřebitele uvést v omyl.

Zákon o potravinách a tabákových výrobcích č. 110/1997

- § 10 ukládá zákaz uvádět do oběhu potraviny jiné než zdravotě nezávadné a potraviny klamavě označené nebo nabízené ke spotřebě klamavým způsobem.
- § 11 ukládá všem podnikatelům, kteří uvádějí potraviny do oběhu neprodleně vyřadit potraviny z oběhu, které jsou klamavě označené nebo nedostatečně a nesprávně označené [16].

Státní dozor nad potravinami:

Zákon o Státní zemědělské a potravinářské inspekci SZPI č. 146/2002 Sb., který uvádí, že inspekce kontroluje jestli nedochází ke klamání spotřebitele, zda jsou výrobky, potraviny, suroviny a tabákové výrobky, které jsou uváděny na trh bezpečné. Dále zda nedochází k porušování práva osob jimž svědčí ochrana zapsaného označení původu nebo zeměpisného označení potravin nebo tabákových výrobků.

Kontrolu jakosti zemědělských produktů a potravin v České republice v různých fázích prvovýroby, zpracování, skladování, prodeje a služeb vykonávají tyto čtyři státní organizace:

- Státní zemědělská a potravinářská inspekce
- Státní veterinární správa ČR
- Ministerstvo zdravotnictví ČR
- Česká obchodní inspekce

Speciální zákony vytvořené pro komodity s vysokým daňovým zatížením nebo zvláštní tradicí:

Zákon č. 61/1997 Sb. o lihu

Zákon č. 321/2004 Sb. o vinohradnictví a vinařství

Zákon 4. 452/2001 Sb. o ochraně označení původu a zeměpisných označení

1.2.4 Dozor EU nad ekozemědělstvím a geneticky upravovanými potravinami

Falšovatelé stále více využívají rostoucí poptávku spotřebitelů po ekologicky vyprodukovaných zemědělských potravinách, i přesto, že bývají o hodně dražší. Někteří producenti a obchodníci tak vydávají běžně vypěstované druhy za produkty ekologického zemědělství. Díky moderní technice už lze i tady provést kontrolu týkající se falšování potravin. V Evropě existuje Společné výzkumné středisko Evropské komise (EK), které využívá nejnovější technologie - například analýzu DNA pro identifikaci hospodářských zvířat. Pomocí družicových snímků zase lze ověřit velikost osevních ploch, které jsou označované pro využití v ekozemědělství.

EU také zavedla soubor přísných postupů pro schvalování pěstování, dovozu nebo používání geneticky modifikovaných potravin a potravinových přísad. Kontrolu provádí síť 24 laboratoří v různých zemích, které poskytují podporu Společnému výzkumnému středisku EK při regulaci a zjišťování geneticky modifikovaných organismů (GMO) ve vzorcích potravin a krmiv. Inspektoři EU tyto vzorky testují na přítomnost DNA nebo proteinů, které signalizují jejich genetickou modifikaci. Pokud se při zkoumání prokáže přítomnost jednoho nebo více GMO, musí se podle nařízení EU stanovit jejich množství [17].

1.3 Obcházení zákona záměrným neoznačením přítomnosti alergenů a geneticky modifikovaných organismů.

1.3.1 Skryté alergený

Objev alergie na určité složky potravin je starý několik století, ovšem zájem o detekci těchto látek v potravinách je novější. Díky zapojením mezinárodních obchodních trhů se stává tok potravinového řetězce složitějším a proto je nutné zvýšit kontrolu bezpečnosti potravin. Schopnost detekovat skryté alergený znamená pro potravinářský průmysl ekonomický důsledek, protože tyto potraviny musí být staženy z trhu. Pro citlivé spotřebitele můžou takovéto potraviny znamenat přímé zdravotní riziko (dokonce i smrt).

Pojem „skryté alergený“ znamená potenciální alergenní materiál, který by se neměl běžně vyskytovat v potravinách. Problém detekce skrytých alergenů v potravinách je v současné době velkým problémem jak pro potravinářský průmysl, tak pro spotřebitele. Existují specifické protilátky proti různým složkám potravin, jsou to například arašídý, sója anebo sezam. K detekci a identifikaci široké škály potravinových složek jsou v současné době používány dvě skupiny metod. Jedna skupina je zaměřená na detekci proteinů a druhá na detekci příslušných biologických druhů na základě detekce jejich DNA. První skupina metod využívá na detekci proteinů většinou imunoanalytické metody (ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay). Druhá skupina metod využívá především polymerázovou řetězovou reakci (PCR), vyšší efektivnost a praktická využitelnost této metody byla dosažena zavedením PCR s průběžným monitorováním fluorescence (tzv. real-time PCR). Obě uvedené skupiny metod pro identifikaci alergenů v potravinách mají své klady i zápory. U metod využívaných na detekci alergenních proteinů bývá často nedostatečná selektivita, dochází ke křížové reaktivitě s jinými podobnými proteiny z jiných biologických druhů. Problém může také nastat změnou proteinů při tepelném opracování potravin, což může vést k tomu, že nebudou stanovitelné ovšem nadále budou alergenní. Na druhou stranu se na bázi DNA přímo nedetekuje přítomnost alergenů, ale jen přítomnost daného biologického druhu. PCR metody vynikají vysokou selektivitou, ovšem jejich nevýhodou v tomto případě je nižší citlivost. Pro důkaz biologických druhů obsahujících alergený bylo vyvinuto více PCR metod, ovšem kvůli jejich nižší citlivosti jsou doporučeny především jako dodat-

kové, nezávisle potvrzovací metody nebo se využívají v případech, kdy není možné provést imunochemické metody [18-21].

1.3.1.1 Důvody výskytu skrytých alergenů v potravinách

- Netušená, ale oprávněná přítomnost materiálu v potravinách, který není uveden na etiketě
- Náhodná kontaminace surovin nebo produktu a to buď ve výrobě nebo v průběhu vaření
- Chybná klasifikace surovin
- Žádaná kontaminace způsobená falšováním surovin a výrobků z ekonomických důvodů

Řešením některých těchto problémů může být zvýšení informovanosti spotřebitele (jakých pokroků bylo dosaženo v posledních letech). Skryté alergenů jsou převážně rostlinného původu. Velkým a významným krokem je objevení metod pomocí kterých je možné detekovat jednotlivé alergenů jako je kravské mléko, arašídů nebo sezam [22].

1.3.1.2 Příklady skrytých alergenů

K nejsilnějším alergenům patří arašídů (podzemnice olejná, *Arachis hypogaea*), už jen malé stopy příslušných alergenů představují nebezpečí. Z toho důvodu je velmi důležité zvýšení citlivost dostupných metod. Dalším velmi rozšířeným rostlinným druhem obsahující alergenů je sója (*Glycine max*). Sója patří mezi alergenní přísady a její použití ve výrobcích musí být podle směrnice EU č. 2000/13/ES o značení potravin uvedeno na etiketě výrobku [21]. Sójové proteinové koncentráty se používají při falšování masných výrobků jako náhrada části masa. Jako falšovanou potravinu, lze označit potravinu jen tehdy, pokud výrobce neoznačí přítomnost sóji ve výrobku. Současné metody, které jsou založeny na bázi DNA neumožňují kvantifikaci sóji v masných výrobcích [23,24].

1.3.2 Geneticky modifikované organismy

Podle zákona č. 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty v plném znění, se jedná o organismus, kromě člověka, jehož dědičný materiál byl změněn genetickou modifikací.

Jedná se o cílenou změnu malé části dědičné informace metodou genového inženýrství. Provedené změny dědičné informace se přenášejí i na potomstvo.

Během posledních deseti let došlo díky rozvoji biotechnologií a zavedení geneticky modifikovaných organismů (GMO) k převratu v zemědělství. Jedná se o novou technologii, u které je předpoklad, že bude poskytovat výhody pro spotřebitele, ale je na ni často vzhlíženo s nedůvěrou spotřebitelů, kteří mají pochybnosti o její bezpečnosti. Z toho důvodu EU věnuje zvláštní pozornost zákazníkovi a dbá na povinném označení potravinářských výrobků, které obsahují více než 0,9% GMO. Uvedení GMO do oběhu, znamenalo také zvýšení náročností analytických metod pro detekci GMO [25].

V současné době se vyrábí geneticky modifikovaná sója, tento materiál obsahuje gen, který zajišťuje odolnost vůči herbicidům. Pomocí tohoto herbicidu se zvýší výnosy plodin a sníží se náklady na výrobu sóji. Druhý typ genu propůjčil sóji odolnost vůči antibiotikům.

Při detekci GMO se zaměřuje především na dva typy molekul a to bílkoviny a nukleové kyseliny. Využívají se techniky založené především na detekci DNA a to z důvodu větší stability DNA ve srovnání s proteiny [25].

1.3.2.1 Rizika sledovaná u geneticky modifikovaných organismů

Výskyt signálních a selekčních genů, toxické účinky, alergenní účinky, nutriční účinky a patogenita. Velmi velké obavy vyvolává možnost alergenních účinků. Alergická reakce může být vyvolána již malými dávkami proteinů nebo jejich částí. Proto je zásadní aby posuzovatelé sledovali schopnost nového GMO tvořit proteiny, které nebyly v původním organismu a u nich pak hodnotit alergenní potenciál [26].

2 KLASICKÉ METODY PRUKAZU FALŠOVÁNÍ POTRAVIN

Doposud bylo shromážděno dostatečné množství poznatků a metodik pro vhodnou identifikaci a kontrolu složení potravin. Kromě detekce falšování vstupních surovin, ze kterých byly vyrobené potraviny, je důležité identifikovat přítomnost cizorodých látek jakou jsou antibiotika, pesticidy, herbicidy a alergeny ve finálním výrobku. Pro takovouto identifikaci se využívají různé techniky chemické analýzy, nejvíce chromatografie, kde dominuje vysoceúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) nebo spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-.MS) [27]. Některé analyty je možné stanovit i pomocí imunoanalytických metod (alergeny, zbytky veterinárních léčiv, vitamíny, toxiny, patogeny). Kromě těchto složitějších metod se v praxi uplatňuje i klasická Kjeldahova metoda založená pro stanovení celkového dusíku, který se pak přepočítá na obsah proteinů.

V případě identifikace rostlinných a živočišných druhů potřebných pro ověření pravosti drahých potravin – lahůdek z masa, zvěře, ryb a sýrů, je nutné použít pro chemickou analýzu daleko složitější metody. Na jejich rozboru byly použity různé chemické a fyzikální metody jako infračervená spektroskopie, hmotnostní spektroskopie, nukleární magnetická rezonance [3, 28, 29]. I přes složitou instrumentaci a pracnost, detekční limity jsou značně vysoké. Podle chromatografické a elektroforetické analýzy (polyakrylamidová gelová elektroforéza, izoelektrická fokusace) prokázaly potenciál, ale výsledek nebyl uspokojivý. Nedostačujících výsledků se získalo především v případech, kdy se jednalo o fylogeneticky blízké druhy a v případech, kdy použité vzorky byly z tepelně upravených potravin [4, 30-33].

Dominantní metodou v problematice falšování potravin jsou metody založené na imunologických vlastnostech proteinů, které byly původně vyvinuty na stanovení kvality surového materiálu (masa, mléka). Největším problémem je výběr vhodného a dostatečně druhově specifického antigenu [3, 28, 34]. I přes velmi dobré limity detekce (1 - 0,1%), všestrannost imunochemických metod zhoršuje termolabilita proteinů, která komplikuje jejich detekci v tepelně opracovaných potravinách [1, 4, 35]. Pro specifickou detekci proteinů velmi blízkých druhů jsou nevyhnutné kvalitní a extrémně specifické protilátky proti diskriminujícím antigenům [36]. Z těchto důvodů je tento přístup v praxi značně nespolehlivý a na trhu je k dostání jen limitované množství komerčních kitů, no ani ty nesplňují kritéria „US Food and Drug Administration’s Center“ [3, 4].

2.1 Metoda ELISA

Tato metoda využívá interakce antigenu se specifickými protilátkami *in vitro* za tvorby imunokomplexu antigen – protilátka. Stanovit tento komplex lze navázáním vhodného enzymu na jednoho z imunoreaktantů.

Výhodou metod ELISA je dostatečná citlivost, specifická a reprodukovatelnost. Pro tuto metodu není nutné vybavení pro izotopové pracoviště a komplikovaná měřicí technika gamma nebo beta záření. Současné systémy jsou plně automatické. Výhodou je i dlouhá expirační doba souprav a také cena.

ELISA metody získaly využití v imunologické laboratoři kde se využívají především ke stanovení proteinů (protilátek), které se vyskytují v séru v nízkých koncentracích a jsou tedy pod detekční mezí nefelometrických metod. ELISA metody se využívají také ke stanovení autoproti látek o známé specifitě, protilátek proti očkovacím antigenům a proti infekčním činitelům mikrobiálním, parazitárním i virovým.

Základním vybavením pro ELISA metody je tzv. ELISA reader. Jedná se o modifikovaný spektrofotometr umožňující měření barevné reakce při různých vlnových délkách s možností odečítání z mikrotitračních destiček [37].

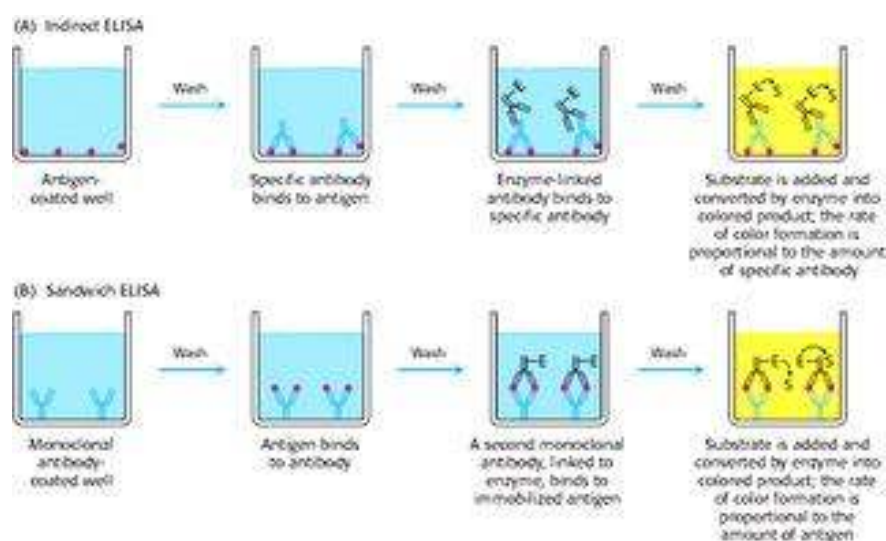
2.1.1 Nepřímá kompetitivní ELISA

Je založena na soutěžení zakotveného antigenu na pevném nosiči a stanovovaným antigenem ve vzorku o určitý počet vazebných míst na molekulách protilátky. Čím více antigenu obsahuje analyzovaný vzorek tím méně protilátky se naváže na zakotvený antigen. Nena vázané složky se odstraní a poté se přidá enzymem značená sekundární protilátka proti navázané protilátce. Na závěr je uskutečněna detekce na základě enzymové reakce za vzniku barevného produktu. Intenzita zabarvení je měřena spektrofotometricky a je nepřímo úměrná koncentraci antigenu ve vzorku. Výhodou této metody je možnost využití již komerčně připravených značených protilátek.

2.1.2 Přímá nekompetitivní metoda – SANDWICH

Metoda se využívá pro stanovení polyvalentních antigenů, jsou to antigeny, které mohou vázat dva a více protilátek. Analyt je vázán mezi dvěma specifickými protilátkami a proti-

látka je vždy v nadbytku. Nejprve jsou na pevnou fázi imobilizovány protilátky, poté je přidán antigen, který interaguje s navázanými protilátkami. Následuje odstranění nenavázaných složek a následně aplikace protilátky značené enzymem. Nejčastěji se jedná o peroxidásu, alkalickou fosfatásu, beta-galaktosidásu a glukoso oxidásu. Množství navázané značené protilátky je úměrné množství analytu ve vzorku. K detekci se využívá enzymová reakce, při které je bezbarvý substrát změněn na barevný [38].



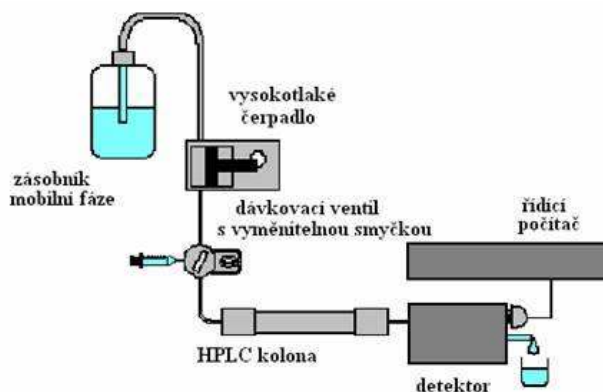
Obr. 1 Princip metody ELISA [38].

2.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) je zařazena mezi nejčastěji používané separační metody. Tato metoda má vysokou účinnost, dobrou opakovatelnost a robustnost. HPLC je vhodná pro dělení netěkavých látek a polárních látek, protože analýza takovýchto látek pomocí plynové chromatografie je často obtížná. Metoda je založena na separaci analytů na základě jejich distribuce mezi stacionární a mobilní fází. Při separaci dochází k různým typům interakcí. Uplatňují se interakce analytů s mobilní fází, interakce mobilní fáze se stacionární fází a sorpce analyz na stacionární fází.

K účinné separaci se používají mikroparticulární sorbenty (5-10 μm), jenž kladou prostupující kapalině značný odpor, proto je potřeba pracovat za vyššího tlaku. Při těchto pod-

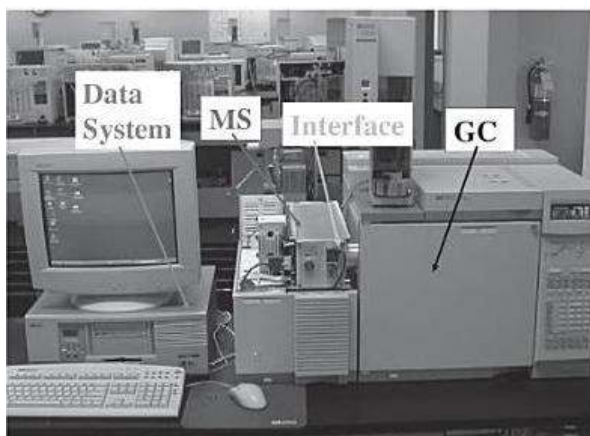
mínkách dochází na koloně k výraznému chromatografickému rozlišení látek v širokých oblastech molekulárních hmotností [39].



Obr. 2 Schéma HPLC [40].

2.3 Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS)

Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií je analytická metoda, která kombinuje vysokou separační schopnost kapilární plynové chromatografie s detekcí vysoce specifickou pro daný analyt a zároveň také umožňuje získat informace o struktuře neznámých látek. Dnes jsou GC-MS systémy nezbytnou součástí většiny analytických laboratoří. Tato metoda se využívá v různých odvětvích např. při zkoumání životního prostředí, v potravinářském, chemickém, farmaceutickém průmyslu a dalších [41].



Obr. 3 Uspořádání přístrojů při GC-MS [41].

Hmotnostní spektra pracují ve třech etapách jenž jsou zařazeny v sérii. V první etapě dochází k převedu studené látky do plynného stavu, v druhé fázi dochází k ionizaci vzniklé plynné fáze a konečnou etapou je její rozdělení podle hmotnosti iontů. V průběhu ionizace dochází k tvorbě iontů z neutrálních prvků nebo molekul v iontovém zdroji, které se dále štěpí na fragmentové ionty, radikály a neutrální částice. Nabitě částice jsou separovány v analyzátoru podle poměru efektivní hmotnosti ionizované částice na relativní intenzitě (m/z) a dále jsou zaznamenány detektorem. Neutrální částice většinou nejsou zaznamenány, protože nepodléhají působení elektrického a magnetického pole.

Iontová past jako hmotnostně-specifický detektor je zařízení, ve kterém probíhá ionizace plynné fáze, tak dělení iontů podle jejich hmotností. Ionty se v pasti pohybují v kruhových drahách zvýšením amplitudy napětí na středové elektrodě se dostanou do nestabilní dráhy a opouští prostor pasti směrem k detektoru. Detektor detekuje ionty opouštějící analyzátor, základními typy jsou elektronový násobič nebo fotonový násobič. Z detektoru přechází data do datasystému, což je většinou počítač, který umožňuje nastavení a kontrolu všech funkcí systému a různé zpracování naměřených hodnot.

3 METODY ZALOŽENÉ NA ANALÝZE DNA

Z různých důvodů (univerzálnost, jednoduchost, reprodukovatelnost, limit detekce) je v současné době stále více upřednostňována analýza DNA, která překonala spolu s vývojem technik manipulace s DNA velký rozvoj [42]. Především se využívají genotypizační metody, které jsou založeny na identifikaci bodových mutací v úsecích DNA, které jsou specifické pro daný biologický druh [43]. V porovnání s počáteční identifikací živočišných druhů je v současnosti dostupných mnoho variant pro analýzu DNA mas a také masných a mléčných výrobků. Je to například hybridizace se specifickými DNA sondami, RFLP (restriction fragment length polymorphism), RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), AFLP (amplified fragment length polymorphism), SSCP (single-stranded conformation polymorphism analysis), SSR (short sequence repeats) nebo VNTR (variable number tandem repeat) a analýzy mitochondriální DNA. Všechny uvedené metody mají své klady a zápory, především co se týče pracnosti (SSCP-duplex PCR) nebo přesnosti (citlivost na reakční podmínky RAPD PCR, SSCP-duplex PCR).

Dnes jsou především žádány postupy vhodné na běžnou analýzu. Všechny postupy jsou založeny na PCR a detekci charakteristických a druhově specifických změn v jednom nukleotidu. Tyto změny se mohou identifikovat po amplifikaci úseků DNA a následném štěpení vhodnými restrikcními endonukleázami (CAPS – „cleavable amplifiable polymorphic sequences“) [44]. Jednodušším způsobem detekce je přímá detekce polymorfních oblastí pomocí ARMS-PCR „Amplification Refractory Mutation System PCR. Variabilita druhů nebo i jedinců se dá detekovat také na základě výskytu krátkých, opakovaných úseků DNA podle SLPs – „sequence length polymorphisms“. Amplifikace těchto úseků produkuje fragmenty DNA, jejíž velikost je druhově specifická.

Pomocí druhově specifických primerů byli různé varianty polymorfizmu v mitochondriální DNA využité pro identifikaci druhů v mléčných a masných výrobcích [45-49] a také v krmivech pro psi a kočky.

Metody molekulární genetiky jsou založeny na analýze nukleových kyselin. Výhodou těchto metod je relativní stabilita molekuly DNA, odolnost vlivů tepleného zpracování a také všudypřítomnost – lze analyzovat všechny druhy tkání. Metody molekulární genetiky jsou nejvíce specifické metody, mají schopnost rozlišit různé druhy masa a také jsou schopny detekovat i malé množství přídavku určitého masa.

Nejčastěji využívané metody druhové identifikace:

- PCR
- multiplex PCR
- PCR-RFLP
- real-time PCR

3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Tato metoda je založena na amplifikaci DNA. DNA je velmi stabilní biologická molekula a je mnohem více odolnější vůči vysokým teplotám než samotné proteiny. Toho se využívá u různých analýz výrobků, u kterých během zpracování došlo k znehodnocení ostatních látek. Navíc DNA je přítomna ve všech částech organismu, což značně usnadňuje identifikaci jakéhokoliv biologického vzorku bez ohledu na jeho původ [42].

PCR reakce byla vyvinuta v r. 1985 v Cetus Corporation Emeryville v Kalifornii a jejím autorem je Kary Mullis. Objevení této metody znamenalo revoluci v metodice molekulární biologie. Dnes je PCR základní technikou molekulární diagnostiky a manipulace s geny vůbec. Tato metoda poskytuje až 10^6 násobné pomnožení DNA během 2-3 hodin. Jedná se o enzymovou metodu, která slouží k syntéze definovaného úseku DNA *in vitro*, pro něž jsou k dispozici oligonukleotidové primery komplementární k 3' a 5' - koncovým sekvencím úseku jenž má být amplifikován. Syntéza nových komplementárních vláken je katalyzována termostabilní DNA polymerázou (např. Taq DNA-polymeráza). Opakování kroků, které zahrnují denaturaci, annealing - připojení primerů a extensi DNA polymerázou, má za výsledek syntézu segmentu s konci definovanými primery, které jsou inkorporovány do nově vznikajících molekul. Fragmenty této délky tvoří hlavní produkt reakce. Při reakci vznikají i delší fragmenty DNA, jejich množství se v průběhu reakce snižuje. V prvním reakčním cyklu vznikají delší fragmenty než odpovídá vzdálenost vymezená zvolenými primery. V dalším cyklu poskytují tyto nově vzniklé molekuly už fragmenty DNA požadované délky, jejich počet exponenciálně roste v dalších cyklech reakce. Celková doba zdvojení odpovídá jednomu cyklu denaturace templátu, připojení a extenze primeru [50].

3.1.1 Princip metody

3.1.1.1 Denaturace templátové DNA

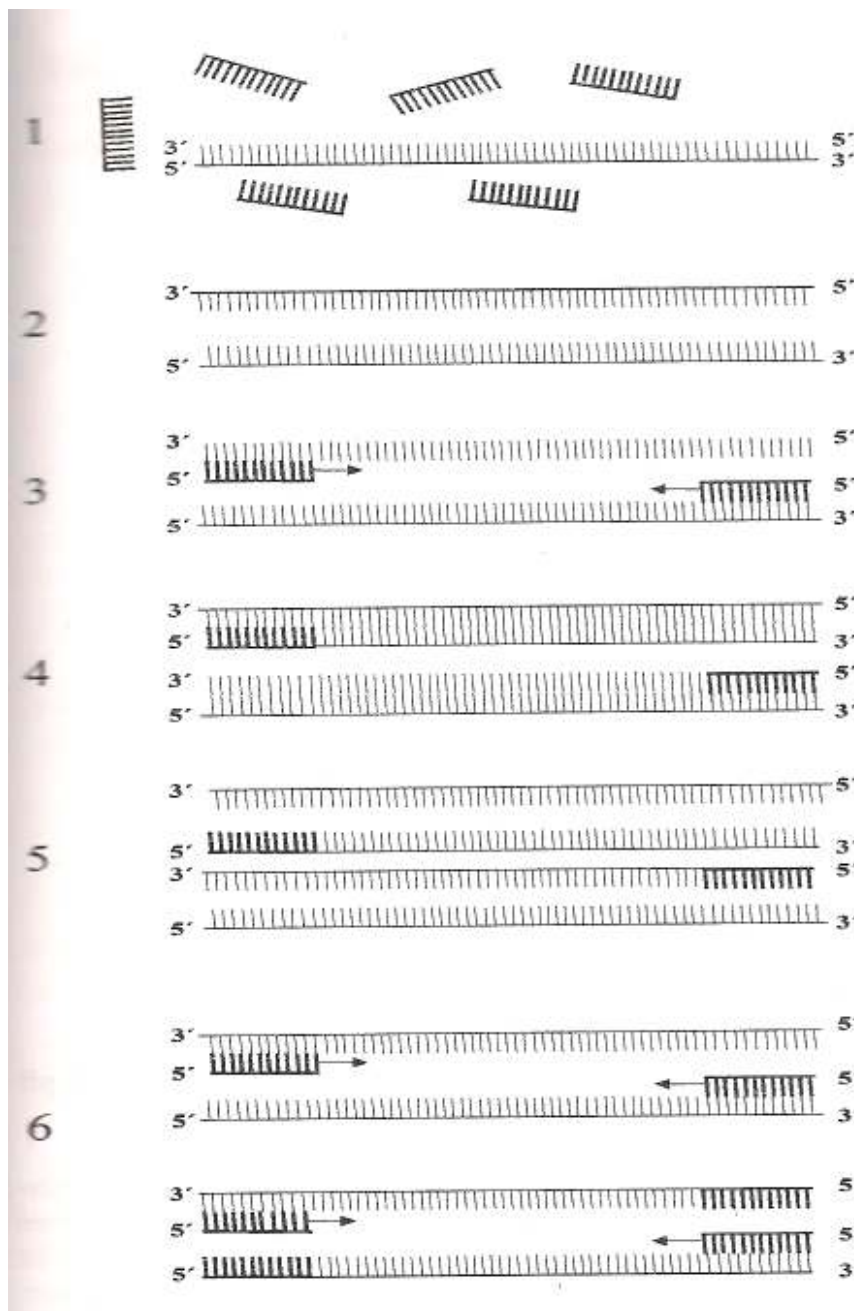
Tohoto efektu se dosáhne zahřátím roztoku DNA na teplotu 95 °C. Teplota by neměla být vyšší, protože hrozí riziko ztráty enzymové aktivity polymerázy. DNA je denaturována 1-5 minut. Dojde k rozštěpení vodíkových můstků a výsledkem je vznik jednořetězcových molekul DNA. Je důležité aby denaturace proběhla kompletně, aby se oddělily obě vlákna. Při nedokonalé denaturaci by mohlo dojít k velmi rychlé denaturaci celé molekuly, což by pak zabránilo interakci s primery.

3.1.1.2 Připojení primerů (*annealing*)

V druhém kroku dojde k ochlazení reakční směsi na teplotu 45-72 °C, to umožní vytvoření krátkého dvouřetězcového úseku s volnou 3' hydroxylovou skupinou, což je nutné pro zahájení syntetické fáze. Při připojování primerů dochází k nasednutí primerů na komplementární místa v templátové DNA. Teplota a čas pro tuto reakci závisí na délce oligonukleotidů a na zastoupení jednotlivých bází A-T a G-C párů. Optimální teplotu většinou uvádí přímo výrobce primerů. Při nedodržení vhodné teploty – použití příliš nízkých teplot může způsobit nespecifické připojení primerů, což má za následek vznik nespecifických produktů.

3.1.1.3 Syntetická fáze

V tomto kroku dochází k extenzi připojených primerů DNA polymerázou. Jednotlivé deoxynukleotidy jsou připojovány ve směru 5'→3'. K této reakci je nutno zahřát templátovou DNA s navázanými primery na teplotu, která je optimální pro zahájení enzymatické reakce termostabilní DNA polymerázy. Při použití *Tag* polymerázy je ideální teplota 72 °C. Doba syntetické fáze závisí na délce syntetizovaného řetězce, povaze templátové DNA, koncentraci a také na již zmíněné teplotě. Výtěžek je závislý na vhodných reakčních podmínkách, které je nutné často optimalizovat. Především závisí na koncentraci hořčnatých iontů a na teplotě použité při připojování primerů [50].



Obr. 4 Jednotlivé kroky při PCR [50].

1.Reakční směs: primer, templát DNA, Tag DNA polymeráza, směs deoxynukleotidů, 2.Denaturace DNA – vznik jednořetězcových molekul templátu, 3.Připojení primerů na specifická komplementární místa a polymerační reakce – extenze primerů připojováním deoxynukleotidů ke komplementárním pozicím templátu, 4.Konec prvního cyklu – dvě dvojřetězcové DNA, 5 a 6 představuje opakování kroků 2 a 3 a následuje extenze a další opakování.

V prvním cyklu je replikovaný úsek zdvojnásoben. V dalších cyklech slouží i nově nasyn-
tetizované molekuly DNA jako templáty a po několika málo cyklech začnou v roztoku pře-
važovat amplifikované molekuly, které jsou z obou stran ohraničeny primery. Pro amplifi-
kaci se většinou používá 30 až 35 cyklů a v každém cyklu dojde ke zdvojnásobení množ-
ství molekul oproti předchozímu cyklu. Z celé molekuly DNA, která je použita pro reakci,
je amplifikován pouze úsek mezi dodanými primery, protože DNA polymeráze pro iniciaci
replikace na jiném místě chybí primery.

Komponenty nutné pro PCR reakci

- templátová DNA (matrice)
- primery
- DNA polymeráza
- směs nukleotidů dNTP
- reakční pufr
- přístrojové vybavení

3.2 Mnohonásobná PCR (multiplex PCR)

Tato metoda byla poprvé odskoušena v roce 1988. V multiplexní PCR je použito více párů
specifických primerů komplementárních k různým cílovým sekvencím v jedné amplifikač-
ní reakci. Současná amplifikace několika cílů najednou se provádí s několika záměry. Mo-
hou být sledovány změny v rozsáhlých oblastech DNA, mohou být sledovány různé seg-
menty cílového genomu, může být zahrnuta vnitřní kontrola amplifikovatelnosti vzorku a
mohly by být vyvinuty cenově efektivní panely testů pro detekci více patogenů v jediném
vzorku. Tato metoda se používá v mnoha oblastech DNA testování , včetně analýzy mutací
a polymorfismů nebo na kvantitativní testy a reverzní transkripce PCR. Nejčastěji se pou-
žívá pro genotypizaci, kde je využito simultánní analýzy více markerů, dále také pro detek-
ci patogenů nebo geneticky modifikovaných organismů (GMO).

Výhody a nevýhody mnohonásobné PCR

Hlavní výhodou této metody jsou nižší cenové náklady než při samostatných amplifikacích, a proto se používá pro nacházení změn na dlouhých úsecích DNA, testování vzájemně nesouvisejících oblastí na DNA a především pro amplifikaci vnitřních kontrol současně se vzorky [51]. Hlavními nevýhodami metody PCR-multiplex je nízká reprodukovatelnost a nízká efektivita amplifikace u různých temlátů.

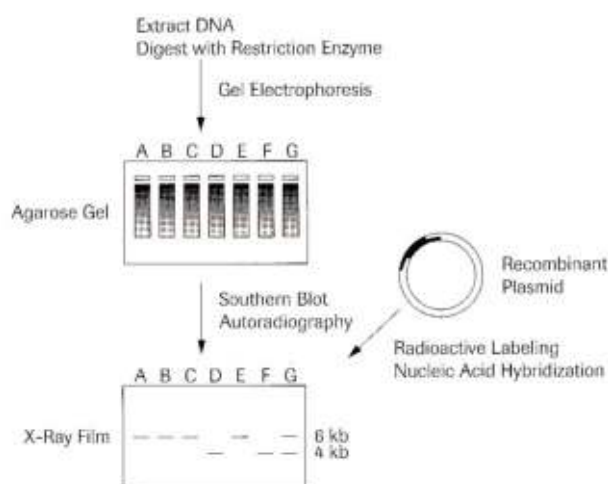
3.3 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)

Metoda RFLP využívá délkového polymorfismu restrikčních fragmentů analyzované DNA, který je, po provedení elektroforetické separace a přenosu fragmentů z gelu na pevný nosič (nylonovou nebo nitrocelulózovou membránu), detekován pomocí hybridizace s homologním fragmentem DNA – specifickou sondou.

Působením určitou restriktázou na izolovanou DNA jedinci dochází k jejímu rozštěpení na fragmenty, které jsou rozdílné délky podle umístění cílových sekvencí štěpení pro danou restriktasu. Délka fragmentů DNA může být od různých jedinců stejného druhu buď shodná nebo rozdílná. Pokud jsou nalezeny fragmenty rozdílné délky od stejného druhu jedinců za použití téže restriktázy, potom mluvíme o polymorfismu v délce restrikčních fragmentů.

Příčinou vzniku polymorfismů jsou mutace v původních restrikčních místech, pomocí nichž dochází ke ztrátě, nebo také ke vzniku nového restrikčního místa. RFLP analýza je závislá na dostupnosti specifických sond pro detekci homologních sekvencí. Specifické sondy jsou jednořetězcové, většinou naklonované úseky DNA popř. uměle nesyntetizované oligonukleotidové sekvence, určité části genomu. Tyto sondy musí být vybírány s ohledem na dostatečný polymorfismus cílových míst a jednoznačnost hybridizace [52].

Při mutaci v restrikčním místě dojde ke změně velikosti restrikčních fragmentů a tedy i velikosti proužků po hybridizaci. RFLP markery na jaderné DNA jsou používány v genetické analýze pro sestavování RFLP map. Ve srovnání s metodami postavenými na amplifikační strategii tato metoda vyžaduje velké množství čisté DNA. Celý postup od izolace přes restrikci až k hybridizaci je poměrně časově náročný. Metoda RFLP se současně používá k identifikaci různých genotypů, včetně lidského, a je hojně používána v soudním lékařství nebo k určování paternity.



Obr. 5 Detekce u RFLP [52].

3.4 Kvantitativní real-time PCR (qPCR)

Touto metodou lze sledovat průběh polymerázové řetězové reakce pomocí fluorescenčních sond nebo barviv které detekují množství PCR produktu vytvořené během reakce zvýšením své fluorescenční aktivity. Pomocí této metody lze určit množství (počet molekul) DNA ve vzorku. Real-time PCR umožňuje sledovat shromažďování specifických produktů průběžně během cyklu. Data jsou sbírána na termocykleru, který umožňuje teplotní cyklování a také detekci fluorescence v každém cyklu. Fluorescenční substrát se váže na syntetizovanou DNA a úroveň detekované fluorescence potom odráží množství nasyntetizované nukleové kyseliny.

Tato metoda dokáže přesně stanovit výchozí počet kopií templátové sekvence DNA pomocí matematické analýzy amplifikačních křivek.

Výhodou real-time PCR je vysoká citlivost, schopnost rozlišení široké škály koncentrací vzorků, snadné zpracování vzorků, ovšem toto zařízení je poměrně nákladné [53].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 MATERIÁL A METODIKA

Výzkumná část práce byla provedena v laboratoři molekulární biologie na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně. Zkoumaným předmětem byly masné výrobky (šunky, šunkové salámy), zakoupené především ve větších obchodních řetězcích. Jednotlivé vzorky byly uchovány až do vyšetření ve zmrazeném stavu. Účelem bylo u vybraných vzorků identifikovat obsažené druhy masa a detekované druhy porovnat s deklarovanými surovinami uvedenými výrobcem ve složení na obalu. U těchto masných výrobků nebylo uvedeno ve složení kuřecí maso, bylo deklarováno pouze vepřové, popřípadě hovězí a krůtí maso. Vzorků pro zkoumání bylo celkem 20. U všech vzorků byla provedena molekulární analýza zahrnující izolaci DNA, testování 3 živočišných druhů (hovězí, vepřové, kuřecí) ve vzorcích masných výrobků metodou PCR dle MATSUMAGA A KOL.(1999) a zhodnocení pomocí elektroforézy na agarózovém gelu.

Tab. 2 Seznam analyzovaných vzorků č. 1-10.

Číslo vzorku	druh vzorku	složení deklarované výrobcem	země původu
1	delikátní vařená šunka	vepřové maso 90%	Německo
2	dušená šunka	vepřové maso 80%	Česká republika
3	dušená šunka	vepřové maso 95%	Německo
4	šunka od kosti	vepřové maso 90 % hovězí maso 15 %	Česká republika
5	dušená šunka	vepřové maso 65 % hovězí maso 8 % krůtí maso 7 %	Polsko
6	delikátní dušená šunka	vepřové maso 95 %	Maďarsko
7	zauzená šunka	vepřové maso 77 %	Česká republika
8	dušená šunka	vepřové maso 60 %	Česká republika
9	opavský šunkový salám	vepřové maso 69 % hovězí maso 5 %	Česká republika
10	dušená vepř. šunka pro děti	vepřové maso 75 %	Česká republika

Tab. 3 Seznam analyzovaných vzorků č. 11-20.

Číslo vzorku	druh vzorku	složení deklarované výrobcem	země původu
11	vepřová šunka	vepřové maso 80 %	Česká republika
12	šunkový salám	vepřové maso 60 %	Česká republika
13	pečeně pikant	vepřové maso 60 %	Česká republika
14	šunkový salám	vepřové maso 63 %	Česká republika
15	debrecínská pečeně	vepřové maso 72 %	Česká republika
16	moravské uzené	vepřové maso 73 %	Česká republika
17	vepřová šunka	vepřové maso 70 %	Česká republika
18	šunkový salám	vepřové maso 60 %	Česká republika
19	dušená šunka	vepřové maso 70 %	Česká republika
20	dušená šunka	vepřové maso 60 %	Česká republika

4.1 Pracovní pomůcky

- chladicí box
- mrazicí box
- laboratorní váha
- centrifuga HERMLE Z 300K
- termocykler BIO-RAD (Peltier Thermal Cycler)
- termostat BIO-TDB-100
- mikrovlnná trouba
- zařízení pro elektroforézu – Consort EV 245
- dokumentační zařízení SYNGENE (Syngene, Švédsko)
- sada mikropipet
- špičky k mikropipetám
- erlenmayerova baňka

- eppendorfovy zkumavky 1,5 ml
- tenkostěnné mikrozukavky pro PRC 0,2 ml
- sterilní skalpel
- plynový kahan
- stojany
- sterilní rukavice

4.2 Chemikálie

- TE pufr (TRIS – EDTA)
- SDS (20 %) (sodium dodecil sulfat) (SERVA, Nemecko)
- proteináza K (20 mg/ml) (SIGMA, USA)
- fenol – chloroform – isoamylalkohol 25:24:1 (SIGMA, USA)
- etanol 96 %
- redestilovaná H₂O
- DNA primer cattle (IDT, Nemecko) CTA-GAA-AAG-TGT-AAG-ACC-CGT
- DNA primer chicken (IDT, Nemecko) AAG-ATA-CAG-ATG-AAG-AAG-AAT
- DNA primer pig (IDT, Nemecko) GCT-GAT-AGT-AGA-TTT-GTG-ATG
- DNA primer spol. (IDT Nemecko) GAC-CTC-CCA-GCT-CCA-TCA-AAC
- PCR pufr (NEB, USA)
- *Tag* DNA polymeráza (5U/μl) (NEB, USA)
- dNTP směs (10mM) (NEB, USA)
- TAE pufr (TRIS, acetate, EDTA)
- Agaróza (Lonza Rockland, USA)
- ethidium bromid – zásobní roztok 10 mg/ml, výsledná koncentrace 0,5 μl/ml (SIGMA, USA)
- nanášecí pufr – gel loading Dye Blue (6x) (NEB, USA)

4.3 Izolace DNA ze vzorku

Izolace DNA ze vzorku byla provedena fenol-chloroformovou metodou. Jedná se o straší metodu, ale nadále často využívanou. Pomocí centrifugace dojde k oddělení roztoku obsahujícího fenol a vodní fáze, dále pak k rozdělení jednotlivých buněčných složek na základě jejich hydrofilních nebo hydrofobních vlastností. Mezi oběma fázemi se tvoří prstenec, který tvoří denaturované bílkoviny. Následovně se odebere požadovaná fáze a dojde ke strážení DNA, oddělení peletu, promývání, popřípadě k rozpuštění požadované DNA. Pro zbavení se zbytků fenolu v roztoku se používá chloroform ve směsi s isoamylalkoholem [54].

Izolovaná DNA se před použitím obvykle zředí vodou a zásobní koncentrovaný roztok se uchová v mrazícím boxu. Zředěné vzorky, které se používají častěji, mohou poměrně dlouhou dobu setrvat v lednici [55].

4.3.1 Pracovní postup

- Pomocí sterilního skalpelu (sterilizace v plameni plynového kahanu) byl odřezán 1g vzorku. Vzorek byl vložen do 1,5 ml eppendorfovy zkumavky.
- Pomocí mikropipet bylo přidáno 300 μ l TE pufru, 100 μ l 20% SDS a 10 μ l protei-názy K, vše bylo promícháno a přes noc inkubováno při teplotě 55 °C.
- Bylo přidáno 600 μ l směsi fenol-chloroform-isoamylalkohol a vše bylo promícháno a následně centrifugováno 10 minut při 12 000 ot./min. Horní vodní fáze s DNA byla opatrně odebrána do čisté eppendorfovy zkumavky. Bylo důležité aby nebyla porušena proteinová mezivrstva.
- Po přidání 96 % etanolu se znovu provedla centrifugace 5 minut při 8 000 ot./min. Supernatant byl opatrně odebrán a zbylý sediment byl dosušen v termobloku při 55°C a následně rozpuštěn v 100 μ l redestilované vody
- Takto připravená izolovaná DNA se nechala zamrazit pro další aplikaci.

4.4 Analýza vzorku metodou multiplex PCR

4.4.1 PCR primery

Pro analýzu byly použity níže uvedené primery, které bylo potřeba naředit redestilovanou H₂O.

- IDT 25 nmole DNA Oligo
 - pig 5' - GCT-GAT-AGT-AGA-TTT-GTG-ATG
 - smícháno s 308 µl redestilované H₂O
- IDT 25 nmole DNA Oligo
 - cattle 5' - CTA-GAA-AAG-TGT-AAG-ACC-CGT
 - smícháno s 252 µl redestilované H₂O
- IDT 25 nmole DNA Oligo
 - chicken 5' - AAG-ATA-CAG-ATG-AAG-AAG-AAT
 - smícháno s 263 µl redestilované H₂O
- IDT 25 nmole DNA Oligo
 - společný primer 5' - GAC-CTC-CCA-GCT-CCA-TCA-AAC
 - smícháno s 272 µl redestilované H₂O

4.4.2 Příprava reakční směsi

Všechny komponenty PCR reakce byly před použitím zkontrolovány a jemně promíchány. Následně byly seřazeny do stojanu v pořadí, jakém byly pipetovány. Do čisté eppendorfkové zkumavky bylo pomocí mikropipet napipetováno 105 µl PCR pufru (10x), 42 µl dNTP (10 mM), 21 µl primeru Spol, 1,8 µl primeru cattle, 1,8 primeru pig, 63 µl primeru chicken, 8,4 µl Taq polymerázy, 722,4 µl dd H₂O. Po přidání DNA – polymerázy je žádoucí pracovat velmi rychle (ovšem stále přesně a obezřetně), protože polymeráza je citlivá na změny teplot a dochází k její degradaci. Aby se zabránilo ohřátí DNA – polymerázy, byla reakční směs připravována v mrazícím stojánku. Po přidání každé složky byla směs pořádně pro-

míchána. Takto připravená směs byla společná pro všech 20 vzorků. Směsi bylo připraveno více, pro případ, že by došlo k nepřesnému pipetování.

Do každé z dvaceti nových eppendorfkových mikrozkuhavek o objemu 200 μl bylo napietováno 47 μl master mixu a 3 μl izolované DNA. Byly použity tenkostěnné mikrozkuhavky, aby byla umožněna rychlá změna teplot u vzorku při amplifikaci. Takto připravená směs byla krátce centrifugována a následně připravena pro provedení amplifikace DNA.

Tab. 4 Složení PCR směsi pro multiplex PCR.

	Pro 1 vzorek (μl)	Pro 21 vzorků (μl)
PCR pufr (10x)	5	105
dNTP (10 mM)	2	42
primer Spol	1	21
primer cattle	0,6	12,6
primer pig	0,6	12,6
primer chicken	3	63
Taq polymeráza	0,4	8,4
dd H ₂ O	34,4	722,4
Σ	47	987

4.4.3 Amplifikace DNA

Amplifikační reakce byly provedeny v termocykleru značky PTC 100 MJ Research (Bio-Rad), které má vyhřívané víko, takže ke vzorku není potřeba přidávat minerální olej. Termocykler byl spuštěn podle nastaveného programu. Amplifikační reakce byla provedena za těchto podmínek: Počáteční denaturace (tzv. horký start) při teplotě 95 °C po dobu 5 minut. Poté následovalo 35 cyklů, ve kterých probíhala postupně denaturace při teplotě 95 °C po dobu 30 sekund, annealing při teplotě 60 °C po dobu 30 sekund a syntéza řetězce DNA při teplotě 72 °C po dobu 30 sekund. Po proběhnutí 35 reakčních cyklů proběhla ještě závěrečná extenze při teplotě 72 °C po dobu 5 minut.

4.4.4 Detekce PCR produktu

PCR produkty byly detekovány pomocí agarózové gelové elektroforézy. Elektroforéza je separační metoda, využívající schopnosti pohybu nabitých částic v elektrickém poli.

Pentózafosfátová kostra všech nukleových kyselin nese stejně velký záporný náboj, budou fragmenty v elektrickém poli migrovat vždy k anodě a rychlost této migrace bude závislá výhradně na jejich velikosti. Použitím primerů se multiplikuje různě dlouhý fragment. Tato metoda je poměrně rychlá a jednoduchá. Používá se na izolaci, identifikaci a pročištění fragmentů DNA. K jejím výhodám patří také přímá detekce fragmentů DNA v agarózovém gelu o různé hustotě s použitím vhodných standardů (tzv. DNA marker s fragmenty DNA známé délky). DNA zobrazíme pomocí vazby na barvivo s fluorescenčním interakčním činidlem, ethidium bromid, který následně pod UV zářením vyvolá zobrazení jednotlivých frakcí v agarózovém gelu už 10 ng DNA. Rychlost pohybu fragmentů závisí na těchto parametrech: na molekulové hmotnosti DNA, koncentraci agarózového gelu, konformaci DNA, velikosti použitého napětí a na složení elektrolytických roztoků a teplotě dělení [56]. Vhodnou volbou typu a koncentrace gelu lze zajistit vhodné podmínky pro dělení fragmentů v různých rozmezích molekulových hmotností viz. tabulka č. 5.

Tab. 5 Rozmezí molekulových hmotností DNA separovaných v agar. gelu o různých koncentracích agarózy [57].

Koncentrace agarózy (% w/v)	Rozmezí molekulových hmotností separace lineárních molekul DNA (kb)*
0,3	5 – 60
0,6	1 – 20
0,7	0,8 – 10
0,9	0,5 – 7
1,2	0,4 – 6
1,5	0,2 – 3
2,0	0,1 – 2

*kb (kilobase) – běžné označení pro počet nukleotidů

Pro agarózovou elektroforézu byl použit elektroforetický tlumivý roztok Tris-acetátový v koncentraci 50 mM. Koncentrovaný tlumivý roztok byl naředěn a použit pro přípravu agarózového gelu a také jako vodivé médium po dobu elektroforetického dělení.

4.4.4.1 Příprava tlumivého roztoku

Pracovní koncentrace tlumivého roztoku 1 x TAE:

0,04 M Tris-acetát

0,001 M EDTA

Zásobní koncentrovaný roztok 50 x TAE (navážky na litr):

242 g Tris báze

57,1 ml ksy. octové

100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0

4.4.4.2 Příprava agarózového gelu

Bylo naváženo 2 g agarózy do erlenmayerovi baňky, poté bylo přidáno 200 ml TAE pufru. Agaróza byla rozpuštěna v mikrovlnné troubě a roztok byl ochlazen na teplotu kolem 60 °C a přidán ethidium bromid, v tomto kroku bylo nutné pracovat s gumovými rukavicemi, protože ethidium bromid je silně toxická a mutagenní látka. Následně byla sestavena elektroforetická aparatura na přípravu gelu, bylo nutné aby aparatura dobře těsnila. Na podnos byly umístěny hřebeny na vytvoření jamek pro nanášení vzorku. Připravený roztok agarózy byl vlit do připraveného podnosu (od šířky zubů použitého hřebene a tloušťky gelu závisel objem nanášeného vzorku DNA) a gel se nechal vychladnout při laboratorní teplotě asi 30 minut. Ze ztuhlého gelu byl opatrně vysunut hřeben, podnos s gelem byl vložen do elektroforetické aparatury a následně byl zalit 1 x koncentrovaným elektroforetickým tlumivým roztokem TAE, tak aby roztok přesahoval gel do výšky alespoň 5 mm.

4.4.4.3 Nanášení vzorku a průběh agarózové gelové elektroforézy

Příprava vzorku pro následné nanášení na agarózový gel spočívala ve smíchání 20 µl vzorku s 5 µl nanášecího pufru. Ke zhodnocení přítomnosti DNA byly vzorky nanášeny

v celovém objemu 10 μl a to vždy ve směru zleva doprava, přičemž do první a poslední jamky bylo nanášeno 10 μl směsi markeru s nanášecím pufrem (50 μl markeru a 10 μl nanášecího pufru). Aparatura byla připojena na zdroj napětí, elektroforetické dělení probíhalo při 120V při laboratorní teplotě do doby kdy modrá startovací čára nedosáhla alespoň $\frac{3}{4}$ délky gelu. Po skončení elektroforézy, byl gel umístěn na transiluminátor kde po prosvícení UV o vlnové délce 305 nm bylo možné sledovat fluorescenci získaných PCR produktu. Na závěr byl gel zdokumentován. Při každé manipulaci s gelem bylo nutné použít gumové rukavice [56].

4.5 Průkaz jednotlivých druhů v samostatných PCR.

Pro analýzu byla použita izolovaná DNA. Byla použita metoda druhově specifická PCR. Složení reakční směsi jsou uvedeny v tabulce č. 6, 7 a 8.

Tab. 6 PCR směs pro analýzu DNA vepřového masa.

	Pro 1 vzorek (μl)	Pro 21 vzorků (μl)
PCR pufr (10x)	5	105
dNTP (10 mM)	2	42
primer spol.	1	21
primer pig	0,6	12,6
Taq polymeráza	0,4	8,4
dd H ₂ O	38	798
Σ	47	

Tab. 7 PCR směs pro analýzu DNA hovězího masa.

	Pro 1 vzorek (μl)	Pro 21 vzorků (μl)
PCR pufr (10x)	5	105
dNTP (10 mM)	2	42
primer Spol	1	21
primer cattle	0,6	12,6
Taq polymeráza	0,4	8,4
dd H ₂ O	38	798
Σ	47	

Tab. 8 PCR směs pro analýzu DNA kuřecího masa.

	Pro 1 vzorek (μl)	Pro 21 vzorků (μl)
PCR pufr (10x)	5	105
dNTP (10 mM)	2	42
primer Spol	1	21
primer chicken	3	63
Taq polymeráza	0,4	8,4
dd H ₂ O	35,6	747,6
Σ	47	

Po smíchání reakční směsi bylo nepipetováno do každé z 20 nových mikrozkušavek 47 μl reakční směsi a 3 μl příslušného DNA templátu . Po promíchání následovala amplifikace. Podmínky cyklování byly: 95/5 min – (95/30s – 60/30s – 72/30s)35x – 75/5 min.

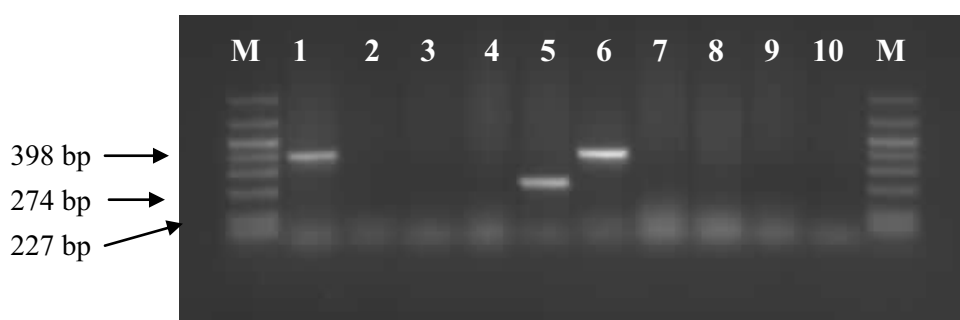
Gel byl připraven smícháním 3g agarózy s 200 ml pufru TAE. Po ochlazení bylo přidáno 20 μl ethidium bromidu a následně se nechal gel ztuhnout při laboratorní teplotě na předem sestaveném tácu s hřebeny. Po ztuhnutí byl gel zalit pufrům TAE a do první jamky bylo nejprve naneseno 10 μl směsi markeru a nanášecího pufru, následně bylo do dalších jamek naneseno vždy 10 μl směsi vzorku a nanášecího pufru.

Po provedení elektroforézy byly vzorky vyhodnoceny a zdokumentovány v UV transluminátoru pomocí digitálního fotoaparátu.

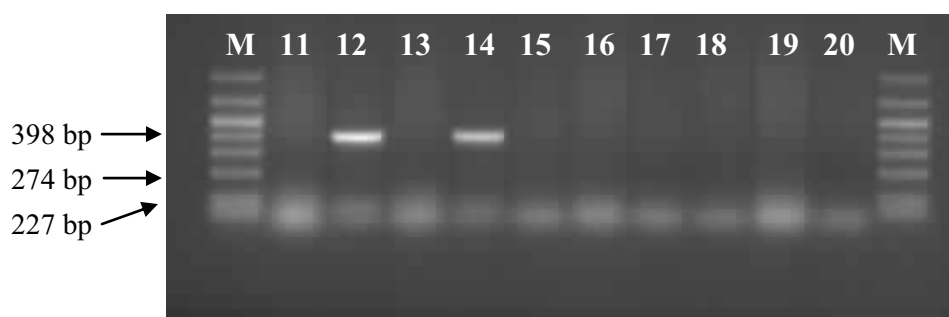
5 VÝSLEDKY

Výsledky gelové elektroforézy jsou znázorněny na následujících obrázcích. Každý agarózový gel obsahuje celkem 12 drah. Na první a poslední dráze je nanesen DNA marker s fragmenty DNA známé délky dělenými po 100 bp.

5.1 Metoda multiplex PCR.



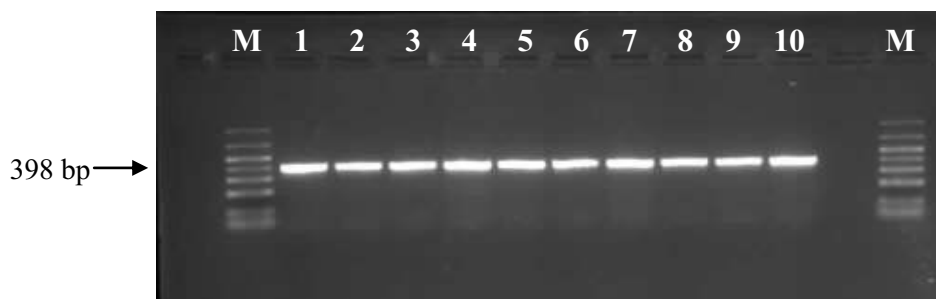
Obr. 6 Agarózová gelová elektroforéza druhově specifické PCR (227, 274, 398 bp), vzorky 1-10.



Obr. 7 Agarózová gelová elektroforéza druhově specifické PCR (227, 274, 398 bp), vzorky 11-20.

U metody multiplex nevyšly validní výsledky, protože se nepodařilo prokázat přítomnost DNA vepřového masa, která by měla být přítomna ve všech vzorcích. Mohlo to být způsobeno špatným namícháním reakční směsi, špatným výběrem primerů nebo nepřesným pipetováním. Z důvodu nevhodných výsledků nebyla už dále používána metoda PCR – multiplex.

5.2 Druhově specifická PCR pro vepřové maso



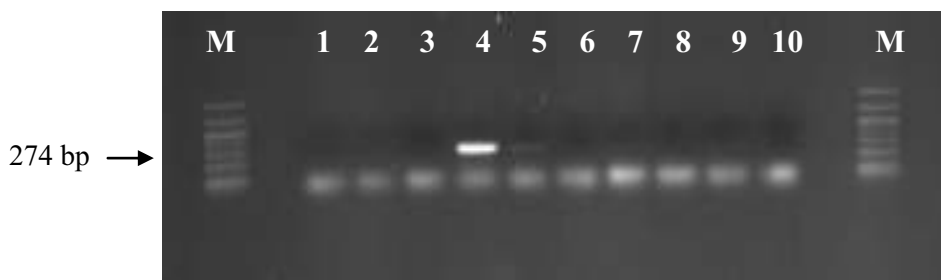
Obr. 8 Agarózová gelová elektroforéza druhově specifické PCR (398 bp), vzorky 1-10.



Obr. 9 Agarózová gelová elektroforéza druhově specifické PCR (398 bp), vzorky 11-20.

Na obrázku č. 8 a 9 byly viditelné proužky u všech vzorků. Což dosvědčuje, že izolace byla provedena správně a že všechny vzorky obsahovaly vepřové maso.

5.3 Druhově specifická PCR pro hovězí maso



Obr. 10 Agarózová gelová elektroforéza druhově specifické PCR (274 bp), vzorky 1-10.

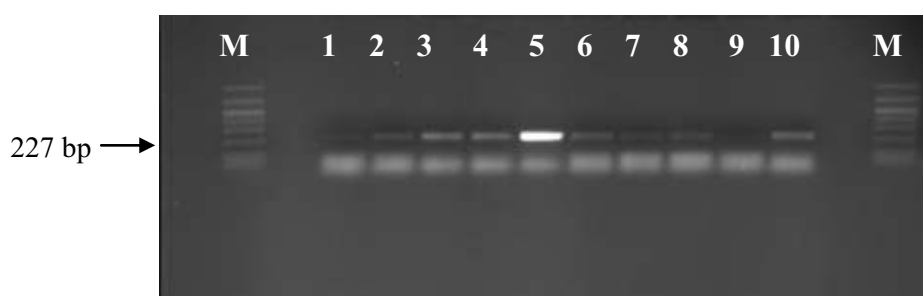


Obr. 11 Agarózová gelová elektroforéza druhově specifické PCR (274 bp), vzorky 11-20.

Podle viditelných proužků na agarózovém gelu jenž jsou zobrazeny na obrázku č. 10 a 11 bylo hovězí maso přítomno celkem ve 2 vzorcích, a to ve vzorcích č. 4 a 5. Menší intenzita záření byla ve vzorku č. 5, což svědčilo o menším množství hovězího masa ve výrobku v porovnání s ostatními vzorky. Podle složení uvedeného na obalech, které je uvedené v tabulkách č. 2 a 3 by hovězí maso měly obsahovat vzorky č. 4, 5, 9. U vzorku č. 9 nebyla přítomnost hovězího masa potvrzena.

5.4 Druhově specifická PCR pro drůbeží maso

Určení přítomnosti kuřecí DNA:



Obr. 12 Agarózová gelová elektroforéza druhově specifické PCR (227 bp), vzorky 1-10.



Obr. 13 Agarózová gelová elektroforéza druhově specifické PCR (227 bp), vzorky 11-20.

Podle obrázku č.12 a 13 byla drůbeží DNA přítomna v 19 vzorcích, její koncentrace byla různá. U vzorků č. 1, 9, 11, 12, 16, 18 byla koncentrace drůbeží DNA minimální. Nejvyšší koncentraci drůbeží DNA měl vzorek č. 5, jenž měl jako jediný ve složení deklarováno krůtí maso. U ostatních vzorků nebylo ve složení na obale drůbeží maso deklarováno, což svědčí o možném falšování masných výrobků.

Tab. 9 Přehled identifikovaných živočišných druhů v testovaných masných výrobcích, vzorky 1-10.

Vzorek č.	vepřové DNA	hovězí DNA	kuřecí DNA
1	+	-	+ (velmi slabé)
2	+	-	+
3	+	-	+
4	+	+	+
5	+	+ (slabé)	+ (velmi silné)
6	+	-	+
7	+	-	+
8	+	-	+
9	+	-	+ (velmi slabé)
10	+	-	+

Tab. 10 Přehled identifikovaných živočišných druhů v testovaných masných výrobcích, vzorky 11-20.

Vzorek č.	vepřové DNA	hovězí DNA	kuřecí DNA
11	+	-	-
12	+	-	+ (velmi slabé)
13	+	-	-
14	+	-	+
15	+	-	+
16	+	-	+ (velmi slabé)
17	+	-	+
18	+	-	+
19	+	-	-
20	+	-	+

PCR produkt detekován +

PCR nedetekován -

6 DISKUZE

Masné výrobky jsou potravinářské výrobky zhotovené z různých částí zvířecích těl, nejvíce z masa a vnitřností. Kromě masa se k výrobě masných výrobků používají i různé přísady a pochutiny (koření, voda, aj.) [58]. Podle zákona o potravinách má každý, kdo uvádí potraviny do oběhu, povinnost je řádně a pravdivě označit. Na obalu masných výrobků musí být uvedeno, jaké druhy masa byly použity k výrobě. Výrobce však nemusí uvádět, z jaké části zvířete. Tedy vepřové maso může znamenat jak svalovinu, tak vnitřnosti.

Práce byla zaměřena na ověření pravdivosti údajů, týkajících se přítomnosti jednotlivých druhů masa, uvedených na obchodním obalu výrobků. Identifikace druhů masa v masných výrobcích zahrnovala testování masných výrobků tepelně opracovaných. Pomocí metody PCR byly u všech testovaných výrobků identifikovány jednotlivé druhy masa ve svých charakteristických velikostech produktů PCR – pro maso drůbeží 227 bp, hovězí 274 bp a vepřové 398bp (počet párů bází). Díky rozdílným velikostem produktů PCR lze jednotlivé druhy masa snadno deklarovat. Jen málo vzorků masných výrobků odpovídalo svým složením deklaraci uvedené výrobcem na obale, většina vzorků však tomuto deklarovanému složení neodpovídaly. Je možné tedy předpokládat, že došlo k záměrné druhové výměně masa, čímž byla porušena deklarovaná receptura. Jednalo se o náhradu jakostního druhu masa za maso méně hodnotné.

Nejprve byla aplikována jedna z modifikací metod PCR, metoda mnohonásobné PCR. Do reakční směsi bylo přidáno několik párů primerů rozpoznávajících několik rozdílných cílových sekvencí, což umožnilo analýzu několika úseků DNA současně v jedné reakční směsi. Hlavní výhodou této metody jsou nižší cenové náklady a kratší pracovní doba než při samostatných aplikacích. Po provedení metody mnohonásobné PCR byly detekovány nereálné výsledky. Každý z primerů má svou optimální teplotu annealingu, proto je nutno u metody PCR multiplex zajistit vhodnou teplotu, která bude optimální pro všechny primery. Důvodem nereálných výsledků mohla být špatně zvolená teplota – příliš nízká teplota, která mohla způsobit nspecifické připojení primerů a tím vznik nspecifických produktů. Dalším důvodem mohlo být nesprávně sestavené složení reakční směsi, nesprávná volba primerů nebo také nepřesné pipetování. Metodu multiplex PCR je vhodnější aplikovat pro analýzu výrobku, který obsahuje pouze jeden druh masa a úkolem je identifikovat tento živočišný druh. Z důvodu záporných výsledků (vepřová DNA) bylo nutno buď metodu správně optimalizovat nebo použít jinou metodu.

Z toho důvodu byla dále použita klasická PCR metoda z jedním párem primerů. V tomto případě byl do reakční směsi přidán pár primerů, které mají schopnost rozpoznat pouze určitou cílovou sekvenci DNA jednoho druhu zvířete. Pro analýzu každého zvířecího druhu bylo nutno připravit novou reakční směs a provést novou reakci. Tato metoda byla časově náročnější, ovšem výsledky byly validní.

Jako první v pořadí byla provedena druhově specifická PCR na detekci vepřového masa, protože všech dvacet analyzovaných vzorků masných výrobků od různých výrobců, které byly odebrány z různých obchodních sítí, měly ve složení uveden obsah vepřového masa. Výsledky DNA analýzy prokázaly, že všechny výrobky obsahovaly vepřové maso. Podle intenzity proužků viditelných na agarózovém gelu se koncentrace vepřové DNA u jednotlivých vzorků moc nelišila, jen u vzorku č. 19 byla intenzita nižší. V tomto případě tedy nebylo prokázáno falšování potravin a byl potvrzen údaj v deklarovaném složení výrobku.

V dalším kroku byla provedena druhově specifická PCR na detekci hovězího masa. Bylo analyzováno opět dvacet vzorků masných výrobků. Podle složení uvedeném na obale jednotlivých výrobků, mělo být hovězí maso obsaženo ve třech vzorcích a to ve vzorcích s číslem 4, 5 a 9. Výsledky analýzy prokázaly přítomnost hovězího masa ve dvou vzorcích a to vzorky označeny čísly 4 a 5. Vzorek č. 4 byla dušená šunka od kosti vyrobená v České republice, ve složení na obale bylo deklarováno 15 % hovězího masa. Vzorek č.5 byla dušená šunka vyrobena v Polsku, na obale bylo deklarováno 8 % hovězího masa. Viditelnost proužků na agarózovém gelu byla u vzorku č.4 mnohem více intenzivnější v porovnání se vzorkem 5, což svědčí o vyšší koncentraci hovězí DNA ve vzorku č.4. U vzorku č. 9 tedy opavského šunkového salámu vyrobeného v České republice se analýzou nepotvrdila přítomnost hovězího masa. Zde by se mohlo jednat o falšovanou potravinu, nakolik nebylo dodrženo deklarované složení výrobku.

Jako poslední byla provedena druhově specifická PCR na detekci drůbežího masa. Zde bylo předpokládáno, že se v zakoupených výrobcích bude vyskytovat kuřecí maso, kterým se nejčastěji falšují masné výrobky. Ze 20 zkoumaných vzorků obsahovalo 19 vzorků drůbeží DNA v různých koncentracích a to i přes to, že u žádného z 20 vzorků nebyla u 19 na obale deklarována přítomnost kuřecího masa. Nejvyšší intenzitu záření v agarózovém gelu mě vzorek s číslem 5, jednalo se o dušenou šunku pocházející z Polska, která měla obsahovat kromě 74 % vepřového masa také 7% masa krůtího. Námi použita metoda však není schopna odlišit krůtí a kuřecí DNA. Poměrně intenzivní proužky byly také u vzorků: č. 3

(dušená šunka, původ Německo), č. 4 (šunka od kosti původ ČR), č. 6 (delikátní dušená šunka ,původ Maďarsko), č. 10 (dušená vepřová šunka pro děti, původ ČR), č. 15 (debrečínská pečeně, původ ČR), č. 17 (vepřová šunka, původ ČR), č. 19 (dušená šunka, původ ČR). U ostatních vzorků byla prokázána přítomnost kuřecí DNA jen v nízkých koncentracích.

Důvodů výskytu nedeklarovaného masa ve výrobku je několik, především je to snaha některých výrobců ušetřit a nahradit dražší maso, levnější a lépe dostupnou surovinou a tím snížit náklady na výrobu. Snaha výrobců uvádět nesprávné složení na obale výrobku vede ke klamání spotřebitele. Klamavé označení masných výrobků má negativní dopad na spotřebitele tedy konzumenta, pro něhož může znamenat nesprávné označení výrobku v lepším případě ztrátu důvěry v horším případě i mnohá zdravotní rizika. Správné složení masných výrobků je velmi důležité pro různé náboženské komodity, které uctívají zákaz konzumace některých živočišných druhů.

Definice falšování potravin zatím není zákonem stanovena, ale spotřebitelé jsou chráněny před falšováním zákonem č. 110/1997 Sb., zákonem o potravinách a tabákových výrobcích. Tento zákon upravuje podmínky pro splnění požadavků jakosti a zdravotní nezávadnosti, na označení potravin a doložení země původu, na výrobu, skladování, uvádění do oběhu, ukládání pokut a další manipulace s potravinami a tabákovými výrobky za účelem ochrany zdraví a ekonomických zájmů spotřebitele. Podle tohoto zákona jsou výrobci povinni uvádět celé složení výrobku na obalu a v případě prodeje nebalených potravin je nutno mít tyto informace na prodejně.

Příčinou neoznačení správného a zároveň dražšího druhu masa na obale výrobku může být zpracování masa s neznámým původem. Každé jateční zvíře musí před porázkou podstoupit prohlídku vykonanou veterinárním lékařem, pokud zvíře nevyhovuje požadavkům pro zdravé zvíře nesmí být použito pro výrobu potravin určených k lidské spotřebě a ihned musí být odevzdáno k likvidaci. Směrnice Rady 2002/99/ES, kterou se stanoví veterinární předpisy pro produkci, zpracování, distribuci a dovoz produktů živočišného původu určených k lidské spotřebě, stanovuje, že produkty živočišného původu musejí být získány ze zvířat, které nepocházejí z hospodářství, zařízení, z území nebo části území, na něž se vztahují příslušná veterinární omezení. Při falšování tedy může docházet ke zpracování takto získaných živočišných produktů a nahrazení jimi jiný živočišný produkt, přičemž

živočišný produkt získaný za nejasných okolností bude na obsahu složení výrobku opomenut.

Přítomnost DNA z jiného živočišného druhu než je uvedeno na obale nesvědčí vždy o přítomnosti masa toho druhu v masném výrobku a nemusí se tedy hned jít o záměrné falšování. Mnoho výrobců přidává do masných výrobků bílkovinné pojivové tkáně ve formě kůží, které obsahují velké množství kolagenu. I to však nic nemění na povinnosti označit přítomnost suroviny jiného původu ve výrobku. Někteří výrobci používají kolagen jako náhražku tuku do zpracovaných masných výrobků [59].

Dalším odůvodněním přítomnosti jiného živočišného druhu než je uvedeno ve složení na obale výrobku může být přítomnost strojně odděleného masa (SOM). Jedná se o produkt získaný strojním oddělením zbytků masa, které zůstaly po vykostění na kostech. Při zpracování takového masa dochází ke změně struktury svalových vláken, maso je zrnité a podobá se mletému masu. Pro zacházení s takovýmto SOM jsou stanovena velmi přísná pravidla v nařízení 853/2004/ES o hygieně živočišných produktů (nesmějí používat drůbeží běháky, kůže z krku, hlava, atd.) SOM se může používat do tepelně ošetřených výrobků, pokud to u některých není výslovně zakázáno (v ČR je vyhláškou 326/2001 zakázáno použít separát například do šunkového či gothajského salámu). Při označování masných výrobků se separát uvádí ve výčtu složek, ale není zahrnut do přepočteného a uvedeného podílu obsaženého masa. Pokud přítomnost separátu není uvedena na obale, tak se výrobce dopouští falšování. Hlavním důvodem takového jednání je snížení nákladů výrobku.

Dalším vysvětlením přítomnosti jiné DNA v masných výrobcích může být nedostatečná hygiena a čistota strojního zařízení. Výroba masných výrobků spočívá v řadě na sobě navazujících operací. Z důvodu kontaminace jiným masem jsou nejdůležitější operace mletí a míchání, které se provádí na strojním zařízení zvaném kutr. V případě, že byly na kutru po sobě zpracovány masa různých živočišných druhů, mohlo dojít ke kontaminaci jednoho druhu, druhým druhem masa. V tomto případě by byla koncentrace přítomného nedeklarovaného živočišného druhu poměrně malá a nejednalo by se o záměrné falšování masných výrobků.

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je jednou z nepoužívanějších metod pro průkaz falšování potravin. Vyšetření přítomnosti nedeklarovaných složek kuřecího, vepřového a hovězího masa bylo provedeno pomocí metod PCR založené na druhé specifitě primerů. Díky

zjednodušení metod sekventování DNA se čím dál více používají postupy identifikace druhů založené na porovnávání změn v této informační molekule - receptu na vlastnosti determinující fenotyp organismu. U živočichů se čím dál víc prosazuje princip nazývaný „DNA čárový kód“ [60-62], kde na základě porovnání sekvencí kolem 560 bp dlouhého amplifikovaného úseku *cox1* genu se s pomocí rostoucí databáze dá jednoznačně určit biologický druh.

Pro identifikaci falšování potravin se v praxi využívá nejvíc amplifikace DNA pomocí druhově specifických primerů. Podstatou testu je schopnost nativní Tag polymerázy syntetizovat výhradně DNA z primerů s výborným párováním bází na 3' konci. To znamená, že primer komplementární ke specifickému úseku DNA jednoho druhu nebude amplifikovat úsek DNA ostatních zvířat. LOCKLEY a BARDSLEY (2000) se zmiňuje, že DNA je termostabilnější než proteiny a navíc je přítomna ve většině buněk organismu, což usnadňuje identifikaci jakéhokoliv vzorku. MARTÍN a kol. (2007) popisuje, že čím je ve vzorku nižší procento zastoupení hledané příměsi, tím je detekce amplifikovaných produktů slabší, což bylo potvrzeno i u 20 námi zkoumaných vzorků. MURUGAIAH a kol. (2009) tvrdí, že intenzita produktů není závislá jenom na koncentraci, ale také na přítomném druhu ve vzorku. Z výsledku našich analýz se jeví, že vepřová DNA má silnější viditelnost amplifikovaných produktů na agarózovém gelu než kuřecí nebo hovězí DNA, což ale nesouvisí s menší intenzitou amplifikace u zmíněných druhů, ale s jejich surovinovým podílem v zkoumaném výrobku případně s obsahem inhibitorů polymerázy ve vzorcích.

Podle LOCKLEY a BARDSLEY (2000) testy založené na PCR mohou být prováděny s mnohem nižším množstvím počátečního materiálu díky amplifikaci, kterou tato metoda umožňuje. Tepelné procesy nad 100 °C mohou způsobit spontánní fragmentaci DNA, což je velmi důležitým kritériem pro spolehlivost prováděných testů. U mikrobiologických metod je nutné pro získání dobrých výsledků alespoň 5 g vzorku, u PCR metod postačí 0,4 g vzorku. Při identifikaci živočišných druhů v krmivu bylo v této práci použito 1 g vzorku, toto množství obsahovalo dostatečné množství DNA pro PCR amplifikaci.

ZÁVĚR

V mnoha případech je falzifikát potravin na první pohled k nerozeznání od originálu a jen pomocí drahých analytických metod prováděných v laboratořích lze prokázat záměnu použitých surovin, nebo také jiných surovin, než deklaruje výrobce na etiketě výrobku. Spotřebitelé by měli být chráněni proti takovýmto případům, tak aby obsah zboží které si zakoupí odpovídalo údajům uvedeným na obale. Povinnost zajišťovat kontrolu správného označování v oblasti potravin ukládá řada evropských směrnic, které byly zapracovány do zákona o potravinách a tabákových výrobcích.

Falšováním potravinářských výrobků se rozumí především náhrada jakostnější suroviny za méně hodnotnou, čímž dojde ke zvýšení zisku výrobce na úkor spokojenosti spotřebitelů. V případě falšování masa a masných výrobků dochází nejčastěji k záměně druhu masa, případně živočišné a rostlinné bílkoviny.

Pro kontrolu složení masných výrobků bylo vypracováno několik metod, díky kterým lze nepoctivé jednání výrobců odhalit. Jednou z nejvíce specifických metod pro zjištění falšování potravin je metoda PCR (polymerázová řetězová reakce) umožňující přesnou identifikaci surovin živočišného původu. PCR je schopna rozlišit jednotlivé druhy mas použitých v masném výrobku a detekovat již 1% přídavek masa.

Cílem diplomové práce bylo prokázat falšování potravin na základě analýzy DNA. Výzkumná část práce byla provedena v laboratoři molekulární biologie na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně. Zkoumaným předmětem byly masné výrobky, zakoupené především ve větších obchodních řetězcích. Účelem bylo analyzovat metodou PCR dvacet vzorků masných výrobků se zaměřením na průkaz živočišných surovin tří druhů hospodářských zvířat (skot, prase, kuře).

Nejprve byla izolována DNA ze dvaceti vzorků a následně byla provedena analýza různých živočišných druhů v masných výrobcích metodou PCR. Vepřové maso bylo prokázáno u všech vzorků, což odpovídalo složení na etiketě. Hovězí maso bylo prokázáno ve dvou vzorcích, ovšem podle složení uvedeného na obale, měly hovězí maso obsahovat tři výrobky. Kuřecí maso bylo prokázáno u většiny zkoumaných vzorků i když ani jeden z výrobků neměl na obale deklarováno kuřecí maso (pouze jeden výrobek měl deklarováno krutí maso). Na základě těchto nálezů, lze konstatovat, že bylo prokázáno falšování potravin.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ANONYM. Problematika falšování potravin. [on-line] 8.7.2002 Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1001148&docType=ART&nid=11342> .
- [2] OBROVSKÁ I., STEINHAUSEROVÁ M., NEMOLA M., KRKOŠKA L., Identifikace druhů masa v masných výrobcích. Veterinářství 2002; 52:421-423. Dostupné na <http://web.vetweb.cz/projekt/clanek.asp?pid=2&cid=1558>
- [3] LEES M., (2003). Food autenticity and traceability. Woodhead Publishig Limited. Cambridge UK.
- [4] BALLIN N.Z., VOGENSEN F.K., KARLSSON A.H., (2009) Species determination – Can we detect and quantify meat adulteration? Meat Science 83, 165-174.
- [5] DENNIS J. M. (1998) Recent developments in food authentication, Analyst 123, 151R-156R.
- [6] KOUKAL M., Věda pátrá po falešných potravinách. [online] 21.01.2010 Dostupné na: <http://www.21stoleti.cz/view.php?cisloclanku=2010012120>.
- [7] OBROVSKÁ I., STEINHAUSEROVÁ M., NEMOLA M., KRKOŠKA L., Identifikace druhů masa v masných výrobcích. Veterinářství 2002; 52:421-423. Dostupné na <http://web.vetweb.cz/projekt/clanek.asp?pid=2&cid=1558>
- [8] KVASNIČKOVÁ A., Falšování potravin a jeho prokazování, zajímavé příklady. [on-line] 2.8.2004 Dostupné na: <http://bezpecnostpotravin.cz/%5CIndex.aspx?ch=552&typ=1&val=786&ids=0>
- [9] Vyhláška MZ č.169/2009 Sb. – stanovuje požadavky pro maso, masné výrobky, ryby, ostatní vodní živočichy a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich
- [10] LEPEŠKOVÁ I., Využití molekulárních metod při druhové identifikaci masa. [on-line] 18.1.2002 Dostupné z: <http://agronavigator.cz/default.asp?ids=161&ch=13&typ=1&val=3957>
- [11] KVASNIČKOVÁ A., Falšování mléčných výrobků. [on-line] 8.6.2006 Dostupné z: <http://bezpecnostpotravin.cz/%5CIndex.aspx?ch=552&typ=1&val=80406&ids=0>
- [12] NOLLET L. (2004) Food authentication by HPLC. As Publisher in LPI.

- [13] COZZOLINO R., PASSALACQUA S., SALEMI S., GAROZZO D. (2002) Identification of adulteration in water buffalo mozzarella and in ewe cheese by using whey proteins as biomarkers and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry.
- [14] ŠKOPEK, B. (1998) Praktická příručka výrobce a prodejce potravin, Praha: Verlag Dashofer, číslo 10, díl 5, ISBN 80-86229-05 .
- [15] FRÁNEK T., Na pultech přibývá falšovaných potravin. [on-line] 9.3.2006 Dostupné z : <http://aktualne.centrum.cz/domaci/spolecnost/clanek.phtml?id=98681>
- [16] Vyhláška č. 110/1997 Sb. Zákon o potravinách a tabákových výrobcích.
- [17] SKÁLOVÁ V., Jak věda pátrá po falšovaných potravinách? [on-line] 24.8.2010 Dostupné z: <http://www.ronnie.cz/c-7597-jak-veda-patra-po-falesnych-potravinach.html>
- [18] ALLMANN M., CANDRIAN U., HÖFELEIN C., LÜTHY J. (1993) Polymerase chain reaction (PCR) A possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, 196, s. 248-251.
- [19] BUSH R.K., HEFLE S. L. (1996) Food allergens. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 36, s. 119-163.
- [20] POMS R.E., ANKLAM E., KUHN M. (2004) Polymerase chain reaction techniques for food allergen detection. Journal of AOAC International, 87, s. 1391-1397
- [21] PÖPPING B., HOLZHAUSER T. (2004) Nachweisverfahren für Nahrungsmittelallergene. Deutsche Lebensmittel – Rundschau, 100, s. 285-293.
- [22] BRETT GM, BULL VJ, MORGAN MRA. (1998) Identification of hidden allergens within foods. Allergy, 53, s. 109-110.
- [23] MOLSPEC-ID online database (MSDB) 1.0 [on-line]. Berlin: Bundesinstitut für Risikobewertung, 2005 [cit. 15.5.2005] Dostupný z: www.molspec.org
- [24] PIKNOVÁ L., ŠTEFANOVIČOVÁ A., FARKAŠ P., PANGALLO D., KUČHTA T. (2002) Rivelazione di soia in prodotti di carne mediante PCR e analisi degli steroli. Industrie Alimentari, 41, s. 163-166.
- [25] Eur food Res Technol (2008), 22t, s. 649-665.
- [26] RUPRICH P. (2006) Geneticky modifikované organismy. Sborník přednášek ze semináře pořádaného Ministerstvem zemědělství ČR a Českou zemědělskou univerzitou v Praze (on-line) Praha.
- [27] PERIS, M., ESCUDER-GILABERT, L. (2009) A 21st century technique for food control : Electronic noses Analytica Chimica Acta 638, s.1-15.

- [28] SUN D. W., (2008) Modern Techniques for Food Authentication Book Description . Elsevier, Burlington, USA.
- [29] ANDRASKO J., ROSEN B., (1994) Sensitive identification of hemoglobin in blood-stains from different species by high performance liquid chromatography with combined UV and fluorescence detection. *J. Forensic Sci.* 39, s. 1018-1025.
- [30] DE LA FUENTE MA, JUÁREZ M., (2005) Food authentication by PCR- based methods. *Crit Rev Food Sci Nut* 45, s. 563-585
- [31] BORKOVÁ M., SNÁŠELOVÁ J., (2005) Possibilities of different animal milk detection in milk and dairy products: a review. *Czech Journal of Food Sciences* 23, s. 41-50
- [32] AMIGO L., RAMOS M., CALHAU L., BARBOSA M., (1992). Comparison of electrophoresis, isoelectric-focusing, and immunodiffusion in determinations of cows and goats milk in serra-da-estrela cheeses. *Lait*, 72, s. 95-101.
- [33] ADDEO F., MOIO L., CHIANESE L., NOTA G., (1989). Evaluation of bovine and water buffalo milk in mixtures of liquid milk and mozzarella cheese by gel isoelectric focusing. *Ital. J. Food. Science* 1, s. 71-80.
- [34] BONWICK G.A., SMITH C.J., (2004) Immunoassays: their history, development and current place in food science and technology. *International Journal of Food Science and Technology* 39, s. 817-827.
- [35] WOOLFE M., PRIMROSE S., (2004). Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *TRENDS in Biotechnology* 22, s. 222-226.
- [36] HURLEY I., P., H. Elyse Ireland, H., E., COLEMAN R., C., WILLIAMS J., H., H., (2004) Application of immunological methods for the detection of species adulteration in dairy products. *International Journal of Food Science and Technology* 39, s. 873-878.
- [37] PAULÍK M., BARTUŠKOVÁ J. (2005) *Vyšetřovací metody v imunologii*, s.56.
- [38] ANONIM, Dostupný z: http://biomikro.vscht.cz/groups/lab255/html/ELISA_cz.html.
- [39] KAZAKEVICH Y., LOBRUTTO R. (2007) *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, John Wiley and Sons
- [40] JANČÁŘOVÁ I., JANČÁŘ L. (2003) *Analytická chemie*, MZLU Brno, s. 195.

- [41] McNAIR H.M. and MILLER J.M. (2009) Basic gas chromatography, by John Wiley and Sons, Inc. s. 166.
- [42] LOCKLEY A., K., BARDSLEY R., G. (2000) DNA-based methods for food authentication. Trends Food Sci. Technol. 11, s. 67-77.
- [43] KWOK PY., (2001) Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. Annu Rev Genomics Hum Genet2., s. 235-258.
- [44] MEYER R., HOFELIN C., LÜTHY J., CANDRIAN U. (1995) Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple methods for species identification in food. J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int. 78, s. 1542-1551.
- [45] MATSUNAGA T., CHIKUNI K., TANABE R., MUROYA S., SHIBATA K., YAMAMDA J., and SHINMURA Y., (1999) A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. Meat Science 51, s. 143-148.
- [46] TARTAGLIA M., SAULLE E., PESTALOZZA S., MORELLI L., ANTONUCCIG., BATTAGLIA P.A. (1998) Detection of bovine-derived materials. J. Food Prot. 61, s. 513-518.
- [47] MONTIEL-SOSA, J.F., RUIZ-PESINI E., MONTOYA J., RONCALES P., LOPEZ-PEREZ M.J., PEREZ-MARTOS A.,(2000) Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA. J. Agric. Food Chem. 48, s. 2829-2832.
- [48] CALVO J.H., ZARAGOZA P., OSTA R. (2001) A quick and more sensitive method to identify pork in processed and unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment. J. Anim. Sci. 79, s. 2108-2112.
- [49] BANIA J., UGORSKI M., POLANOWKI A., ADAMCZYK E. (2001) Application of polymerase chain reaction for detection of goats milk adulteration by milk of cow, J. Dairy Res. 68, s. 333-336.
- [50] PAČES V., RUML T., RUMLOVÁ M. (2002) Genové inženýrství. Vyd.. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická. s. 83-84, ISBN 8070804998.
- [51] BARÁNEK M., MORAVCOVÁ K., PIDRA M. (2006) Biotechnologie v zahradnictví, MZLU v Brně. ISBN 80-7157-937-8.

- [52] EIDAN M., DASHEK W. (1996) Experimental approaches in biochemistry and molecular biology. Dubuque: WM. C. Brown. ISBN 0697167356.
- [53] TURNER P., McLENNAN A., BATES A. and WHITE M. (2005) Molecular biology, Taylor and Francis Group, s. 171. ISBN: 0-4153-5167-7.
- [54] JANOCHOVÁ J. (2004) Izolace DNA: Výťažnost a kvalita, Brno: Masarykova univerzita, s. 48. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta.
- [55] ZIMA, J.(2004) Genetické metody v zoologii. Praha, Karolinum, s. 240.
- [56] VÍGLASKÝ V., ČIKOŠ Š., PRISTAŠ P., JAVORSKÝ P. (2000) Praktikum z biochemie nukleových kyselin, Přírodovědecká fakulta UPJŠ, s. 20.
- [57] KRÁLOVÁ B., FUKAL L., RAUCH P., RUMML T. (2001) Bioanalytické metody. Vyd. 3., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 8070804491.
- [58] ČERNÝ L. (2007) Co je s masem, 1. vyd. Brno: TeMi, s. 120. ISBN 978-80-903873-6-2.
- [59] COLMENERO F.J. (2004) Non-meat proteins. Encyclopedia of Meat Science, 1. vyd., Elsevier Ltd, s.271-278. ISBN 0-12-464970-X.
- [60] HEBERT, P.D.N., CYWINSKA A., BALL S.L., deWAARD J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 270, s. 313-321.
- [61] KRESS J.W., ERICKSON D.L. (2008) DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. Proc Natl Acad Sci USA 105, s. 2761-2762.
- [62] RATNASINGHAM S., HEBERT P.D.N. (2007) BOLD: the barcode of life data system. Molecular Ecology Notes 7, s. 355-364.
- [63] MARTÍN I., GACRÍA T., FAJADRO V., LÓPEZ-CALLEJA I.,HERNÁNDEZ P.E., GONZÁLEZ I., MATRÍN R. (2007) Species-specific PCR for the identification of ruminant species in feedstuffs, Meat Science 75, s.120-127.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AFLP	amplified fragment length polymorphism
bp	páry bází
CAPS	cleavable amplifiable polymorphic sequencific
dATP	deoxyadenosin trifosfát
dCTP	deoxycytidin trifosfát
ddH ₂ O	redestilovaná voda
dGTP	deoxyguanozin trifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dTTP	deoxythymidin trifosfát
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GC-MS	plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
GMO	geneticky modifikované organismy
HLPC	vysoceúčinná kapalinová chromatografie
IEF	izoelektrická fokusace
kb	kilobase
mtDNA	mitochondriální deoxyribonukleová kyselina
PCR	polymerázová řetězová reakce
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RAPD	randomly amplified polymorphic DNA
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
SDS	dodecylsulfát sodný
SSCP	single-stranded conformation polymorphism analysis

SZPI	Státní zemědělská a potravinářská inspekce
TAE	Tris-acetát-EDTA
TE	Tris-EDTA
VNTR	variable number tandem repeat

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1 Princip metody ELISA [38].</i>	26
<i>Obr. 2 Schéma HPLC [40].</i>	27
<i>Obr. 3 Uspořádání přístrojů při GC-MS [41].</i>	27
<i>Obr. 4 Jednotlivé kroky při PCR [50].</i>	32
<i>Obr. 5 Detekce u RFLP [52].</i>	35
<i>Obr. 6 Agarózová gelová elektroforéza druhově specifické PCR.</i>	48
<i>Obr. 7 Agarózová gelová elektroforéza druhově specifické PCR.</i>	48
<i>Obr. 8 Agarózová gelová elektroforéza druhově specifické PCR.</i>	49
<i>Obr. 9 Agarózová gelová elektroforéza druhově specifické PCR.</i>	49
<i>Obr. 10 Agarózová gelová elektroforéza druhově specifické PCR.</i>	49
<i>Obr. 11 Agarózová gelová elektroforéza druhově specifické PCR.</i>	50
<i>Obr. 12 Agarózová gelová elektroforéza druhově specifické PCR.</i>	50
<i>Obr. 13 Agarózová gelová elektroforéza druhově specifické PCR.</i>	51

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Podíl jednotlivých komodit z hlediska falšování potravin [3].....	18
Tab. 2 Seznam analyzovaných vzorků č. 1-10.....	38
Tab. 3 Seznam analyzovaných vzorků č. 11-20.....	39
Tab. 4 Složení PCR směsi pro multiplex PCR.	43
Tab. 5 Rozmezí molekulových hmotností DNA separovaných v agar. gelu o různých koncentracích agarózy [57].....	44
Tab. 6 PCR směs pro analýzu DNA vepřového masa.....	46
Tab. 7 PCR směs pro analýzu DNA hovězího masa.	46
Tab. 8 PCR směs pro analýzu DNA kuřecího masa.	47
Tab. 9 Přehled identifikovaných živočišných druhů v testovaných masných.....	51
Tab. 10 Přehled identifikovaných živočišných druhů v testovaných masných.....	52