

IDENTIFIKACE ŽIVOČIŠNÉHO DRUHU A KONKRÉTNÍHO KUSU V MASNÝCH VÝROBCÍCH PŘI VYUŽITÍ PCR

L. Přívětivá, P. Stehno, L. Putnová, J. Dvořák

Došlo: 19. dubna 2004

Abstract

PŘÍVĚTIVÁ, L., STERHNO, P., PUTNOVÁ, L., DVOŘÁK, J.: *Identification of the species and individual animals in the processed meat products by PCR – based analyses*. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., 2004, LII, No. 5, pp. 61-72

The aim of the work was to establish and optimize the molecular-genetic methods, which could be used in the Laboratory of Applied Molecular Genetics (LAMGen) at the Department of Genetics MZLU Brno for the monitoring of food products safety.

During the work, the methods of PCR reactions for the detection of cattle, porcine and chicken tissues were optimized and the presence of declared tissues in meat products from the markets was proved. Throughout the identification of individuals in the meat mixture products (after the different technological interventions), we were able to confirm the presence of the concrete head of animal. When accumulating several individuals in the meat mixture, allele composition is more numerous and variable. In this case, it can happen that the alleles, responding to the individual DNA profile, could be found even if a specific individual is not physically present in the mixture. In the meat products, made from animals with available results of fragment analysis, we confirmed the presence of microsatellite alleles corresponding to the specific individuals' data logging. On the other hand, in the products, containing tissues from the animals without available results of fragment analysis, it was in addition possible to identify the microsatellite alleles, which missed in output data logging of analyzed animals.

We concluded, that in the meat products, made from the mixture of large number of animals, the presence of the specific individual can be only excluded, not confirmed.

DNA, Identification, pig, cattle, chicken, meat

V důsledku různých krizí vyvolaných případy distribuce zdravotně závadných potravin a krmiv, včetně výskytu nebezpečných onemocnění hospodářských zvířat přenosných na člověka, je v posledních pěti letech prováděna radikální reorganizace celého systému zajištění bezpečnosti (nezávadnosti) potravin. Hlavním cílem je ujistit spotřebitele, že bezpečnost potravin je jednou ze základních priorit. Maximální pozornost je věnována tvorbě mechanismů pro rychlé provádění účinných opatření v případech, kdy v řetězci výroby a distribuce dojde ke zjištění možného ohrožení zdraví spotřebitele.

Pro velkou část konzumentů se otázka kvality surovin neomezuje pouze na hygienickou nezávadnost. Vyžadovány jsou též např. informace o přítomnosti či absenci obsažených složek (např. druhů mas ve výrobku). Důvody mohou být různé – náboženské, dietetické, obavy z přenosu onemocnění ze zvířat (BSE). Výrobce je ze zákona povinen složení výrobků uvádět na obalu. Z ekonomických, ale například i z reklamních důvodů (za trend lze považovat výrobky bez hovězího masa) hrozí, že určitá složka nebude výrobcem na obalu uvedena. Zabezpečení zdravotní nezávadnosti potravin je prvořadým úkolem producentů a

současné trvalým úkolem státních dozorových orgánů České republiky. Tento faktor je sledován na všech úrovních potravinového řetězce a stojí v centru zájmu producentů, dozorových orgánů a především spotřebitelské veřejnosti. Po roce 1989 došlo i v ČR k odpovídajícím legislativním změnám, vedoucím (zejména v posledních letech) k harmonizaci s příslušnou legislativou Evropské unie.

V roce 2003 provedli inspektoři státní zemědělské a potravinářské inspekce (SZPI) dvě kontroly, které se zaměřily na dodržování novely vyhlášky č. 326/2001 Sbírky, která předepisuje zpřísněné jakostní a smyslové požadavky na některé masné výrobky. Při obou kontrolách byly v obchodní síti nalezeny výrobky, jejichž složení neodpovídalo předepsaným kritériím a u nichž byla prokázána přítomnost nepovoleného drůbežího masa.

Metody zaměřené na identifikaci druhově specifických proteinových komponent zahrnují metody fyzikálně-chemické, imunologické, metody založené na analýze tuků, histologické a metody molekulární genetiky. Tyto metody jsou schopny potvrdit konkrétní druh masa nebo rozlišit několik druhů masa v masných výrobcích, a tím ověřovat dodržování receptur a deklarací. Stejně tak je možno tyto metody využít k identifikaci druhů masa u výrobků neznámého nebo pouze předpokládaného složení. Dnes již existuje velké množství molekulárně-genetických metod k identifikaci druhově specifických sekvencí DNA, z nichž většina je založena na polymerázové řetězové reakci (PCR; Saiki a kol., 1988). Amplifikaci je většinou podroben specifický úsek v mitochondriální DNA (Matsunaga a kol., 1999; Partis a kol., 2000; Unseld a kol., 1995; Wolf a kol., 1999) nebo jaderné DNA (Janssen a kol., 1998; Matsunaga a kol., 1998). Pro kvantifikaci DNA jsou vyvíjeny metody založené na kompetitivní PCR (Wolf a Lüthy, 2001). Multiplex PCR reakci založenou na identifikaci definovaného úseku mitochondriálního genu pro cytochrom b, využili např. Obrovská a kol. (2002) k rozlišení vepřového, hovězího, kuřecího a koňského masa v tepelně neopracovaných, tepelně opracovaných a sterilovaných masných výrobcích. Identifikaci konkrétního kusu zvířete lze provést na základě zhodnocení polymorfních variant mikrosatelitních markerů (MS) nebo vyhodnocením jednonukleotidových polymorfismů (SNP) vybraných genů.

Naším cílem bylo v Laboratoři aplikované molekulární genetiky (LAMGen) Ústavu genetiky MZLU v Brně aplikovat a ověřit metody pro druhovou identifikaci masa a pokusit se identifikovat konkrétní kus dobytka ve směsných masných výrobcích po různých technologických zásazích. Dohledatelnost jednotlivých kusů dobytka z důvodu možnosti případného stažení výrobků, obsahujících tkáň konkrétních – hledaných kusů, by v rámci programu bezpečných

potravin měla být prioritou. Může se jednat o kusy pocházející ze stáda, v němž například došlo k výskytu BSE, slintavky a kulhavky či jiného onemocnění. Nemusí se jednat přímo o nemocné kusy, ty jsou zjištěny již samotnou veterinární kontrolou. Spíše by mělo jít o preventivní opatření, jež by systém kontroly potravin doplňovalo.

Metody molekulární genetiky jsou založeny na analýze relativně stabilních a vlivům tepelného opracování odolávajících nukleových kyselin. Pro průkaz falšování potravin a tím i pro druhovou identifikaci masa je metoda enzymatického zmnožení nukleových kyselin jednou z nejspecifičtějších metod. Tato metoda je schopna rozlišit různé druhy masa a je schopna detekovat i nízké procento masa jiného živočišného druhu. Nejedná se pouze o identifikaci tepelně neošetřeného masa, ale i svaloviny pocházející z tepelně ošetřených nebo fermentovaných masných výrobků.

Vývoj v oblasti druhové identifikace jde velmi rychle vpřed a směřuje k zavedení takových metod, které by byly schopny identifikovat maso z jakéhokoli zvířete, včetně masa rybích druhů. V současné době firma Affymetrix přichází s technologií DNA-čipů, které budou hlídat kvalitu masa. Vzhledem k vysoké ceně je využívání této technologie zatím omezeno. Dá se ovšem předpokládat, že v průběhu času dojde ke zlevnění a tím k většímu rozšíření této metody. Zejména proto, že při použití DNA-čipů je možné identifikovat najednou velké množství živočišných druhů (<http://osel.cz/index.php?clanek=642&music=&x=>).

MATERIÁL A METODY

MATERIÁL

Pro určení živočišného druhu i konkrétního kusu skotu byl použit genetický materiál získaný izolací z biologických materiálů, kterými byly krev, maso. Izolace byla s úspěchem uskutečněna také z materiálů směsných – potraviny.

Určení druhu masa v potravinovém řetězci

Z volného trhu byly odebrány vzorky, u kterých byla ověřována přítomnost deklarovaných druhů tkání. Přehled analyzovaných vzorků je uveden v Tab. I.

Identifikace konkrétního kusu dobytka

Vzorky pro identifikaci konkrétního kusu byly postupně odebírány během technologického zpracování jednotlivých kusů zvířat. Při porážce zvířat byly odebrány vzorky krve a při bourání byly u stejných kusů odebírány vzorky svaloviny. Následující den, kdy byly námi sledované kusy zapracovány do masných výrobků, byly z díla a následně z hotového masného výrobku odebrány další vzorky. Byly vybrány ty masné výrobky, které prošly největším počtem technologických zásahů. Přehled analyzovaných vzorků skotu a prasat je uveden v Tab. II a Tab. III.

I: Přehled vzorků odebraných z trhu (označení, výrobce a deklarované druhy masa)

Označ. vz.	Název výrobku	Výrobce	Deklarované druhy masa
T1	Dunajská klobása	výrobce č. 1.	vepřové, hovězí
T2	Teplické párky	výrobce č. 2.	vepřové, hovězí
T3	Polský párek se sýrem	výrobce č. 3.	vepřové, hovězí
T4	Štýrský kabanos	výrobce č. 4.	vepřové, hovězí
T5	Holický kabanos	výrobce č. 5.	vepřové, hovězí
T6	Slovenský točený	výrobce č. 6.	vepřové, hovězí
T7	Debrecínské párky	výrobce č. 7.	vepřové, hovězí
T8	Čertovy párky	výrobce č. 8.	vepřové
T9	Kladrubský kabanos	výrobce č. 9.	vepřové, hovězí
T10	Libové párky	výrobce č. 10.	vepřové, hovězí
T11	Gothajský salám	výrobce č. 11.	vepřové, hovězí, koňské

II: Označení vzorků pro identifikaci konkrétního kusu – skot

Označ. vz.	Kategorie
1	krev
2	krev
3	krev
4	krev
4M	maso
HS	syrové dílo (debrecínka)
HU	uvařený párek (debrecínka)

III: Označení vzorků pro identifikaci konkrétního kusu – prasata

Označ. vz.	Kategorie
28	krev
29	krev
30	krev
31	krev
32	krev
33	krev
28M	maso
D1, P1	dílo a párek – Párky k loupání
D2, P2	dílo a párek – Vídeňský párek se sýrem
D3, P3	dílo a párek – Ďábelské viržínko
D4, P4	dílo a párek – Cigára

METODY

Určení druhu masa v potravinovém řetězci

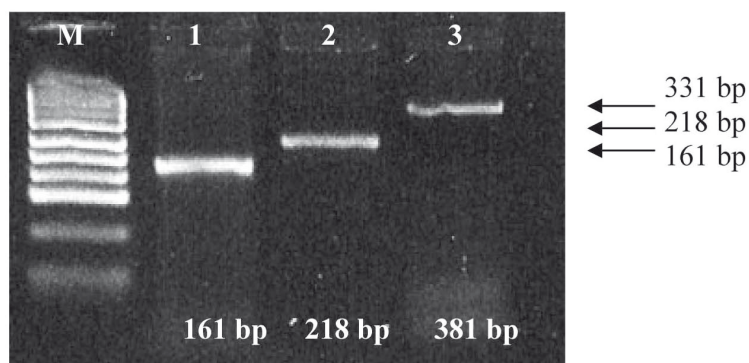
K identifikaci druhové DNA byla využita PCR reakce a elektroforetická separace v agarózovém gelu.

Pro naše laboratorní podmínky byly zavedeny PCR reakce k amplifikaci fragmentů specifických pro DNA prasete, skotu a kura. Získané produkty měly velikosti 161 bp, 218 bp a 381 bp (Obr. 1). Pro ově-

ření citlivosti reakce s primery skotu byla provedena PCR reakce (specifická pro skot) směsí kuřecí svaloviny pouze s malým přídavkem eidamského sýra, který obsahoval nepatrné množství DNA pocházející ze somatických buněk skotu. Intenzita signálu tohoto amplifikátu byla porovnána proti intenzitě signálů

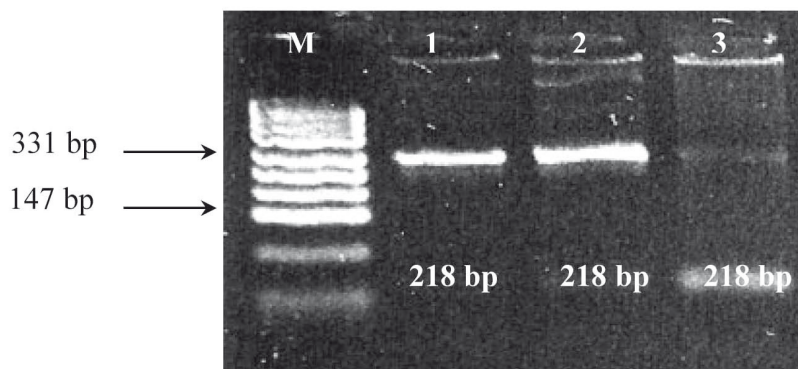
produktů PCR reakce při použití DNA izolované z krve a svaloviny skotu (Obr. 2).

Jako kontrolní vzorek byla při všech analýzách používána DNA získána izolací z krve daného živočišného druhu.



1: Elektroforetická separace PCR produktů ze tří druhů masa:

fragmenty byly separovány v 3% agarózovém gelu barveném ethidium bromidem. M: marker M23 - 501/489, 404, 331, 242, 190, 147, 111/110, 67 bp (Fermentas INC., Hanover, USA), 1: DNA prasete, 2: DNA, 3 skotu: DNA kura.



2: Elektroforetická separace PCR produktů při ověřování specifčnosti primerů skotu:

fragmenty byly separovány v 3% agarózovém gelu barveném ethidium bromidem. M: marker M23 - 501/489, 404, 331, 242, 190, 147, 111/110, 67 bp (Fermentas INC., Hanover, USA), 1: DNA skotu – krev, 2: DNA skotu – svalovina, 3: DNA izolována z kuřecí svaloviny s přídavkem sýra (obsahuje i DNA skotu).

Identifikace konkrétního kusu dobytka

K identifikaci konkrétního kusu bylo sledováno kompletní zpracování čtyř hovězích a šesti vepřových kusů od porážky přes bourání, přípravu díla pro drobné masné výrobky až po výrobek samotný. V průběhu zpracování byl po každém technologickém zásahu odebrán vzorek. Po analýze vzorků bylo posuzováno, zda je za použití dané techniky možné potvrdit (vy-

vrátit) přítomnost či absenci konkrétního kusu ve výrobku.

Délkový polymorfismus mikrosatelitů byl testován pomocí multiplexové PCR reakce a fragmentační analýzy amplifikovaných fragmentů s využitím automatického sekvenátoru. Při identifikaci skotu bylo použito a hodnoceno 11 mikrosatelitů (MS): TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115,

TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225 a BM1824 (Obr. 6). Pro identifikaci prasat byl využit panel deseti mikrosatelitních markerů: SW24, S0107, S0068, SW936, SW353, S0386, S0355, SW72, TNFB a S0070 (Obr. 8).

Genomová DNA byla izolována z krve pomocí kitu NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Izolace DNA z tkáně byla prováděna pomocí kitu Invisorb® Spin Tissue Mini Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) a prostřednictvím kitu FastDNA® Kit (Bio101, Carlsbad, CA, USA).

Určení druhově specifické DNA v potravinovém řetězci

Identifikace DNA prasete

Vycházeli jsme z práce autorů Calvo a kol. (2001). S využitím primerů (VEP1: 5'- GGATCCGGCATTGCCGTT -3'; VEP2: 5'- GTCTTTTTTTTGCCATTCTTGG -3') byl amplifikován fragment o velikosti 161 bp typu SINE repetice (short interspersed repeat element). Byly upraveny podmínky PCR reakce. Reakční mix o celkovém objemu 25 µl obsahoval: 1x PCR pufr, 120 µM směs dNTP, 80 pmol každého primeru, 2,5 mM MgCl₂, 1 U Taq DNA polymerázy a 50-100 ng templátové DNA. Cyklování probíhalo v Peltier termálním cykleru (PTC 200) podle následujícího protokolu: predenaturace 95 °C/4min; 30 cyklů (denaturace 94 °C/30s, hybridizace 54 °C/30s, elongace 72 °C/30s), závěrečná elongace 72 °C/5min. Elektroforetická separace probíhala po dobu 30 min při 94 V za použití 3% agarózového gelu barveného ethidium bromidem.

Identifikace DNA skotu

Bylo vycházeno z práce autorů Zhang a kol. (1999). S využitím primerů (SM A: 5'- TGTACGAAGAAA-TGTGCGG -3'; SM B: 5'- TCAATGCAAAGGACAAGCCTGC -3') na základě sekvence satelitní DNA publikované Skowronskim a kol. (1984). Modifikovány byly podmínky PCR reakce a byla uskutečněna amplifikace fragmentu o velikosti 218 bp. Reakční mix o celkovém objemu 25 µl obsahoval: 1x PCR pufr, 160 µM směs dNTP, 20 pmol každého primeru, 2 mM MgCl₂, 0,5 U Taq DNA polymerázy a 150-200 ng templátové DNA. Cyklování probíhalo v Peltier termálním cykleru (PTC 200) podle následujícího protokolu: 35 cyklů (denaturace 94 °C/30s, hybridizace 60 °C/30s, elongace 72 °C/30s), závěrečná elongace 72 °C/5min. Elektroforetická separace probíhala po dobu 30 min při 94 V ve 3% agarózovém gelu barveném ethidium bromidem.

Identifikace DNA kura

Vycházeli jsme z publikace autorů Lockley a Bardsley (2002). S využitím primerů (KUR1: 5'- GACCATCAGCTGATGAGCCAAG -3'; KUR2:

5'- TTTGCGGATCCACATCTGCTGGAAG -3') byl amplifikován fragment o velikosti 381 bp. Jednalo se o úsek kardiálního α-aktinového genu, jehož sekvenci publikovali Eldridge a kol. (1985). Reakční mix o celkovém objemu 25 µl obsahoval: 1x PCR pufr, 160 µM směs dNTP, 20 pmol každého primeru, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 U Taq DNA polymerázy a 120-160 ng templátové DNA. Cyklování probíhalo v Peltier termálním cykleru (PTC 200) podle následujícího protokolu: 30 cyklů (denaturace 95 °C/30s, hybridizace 68 °C/60s, elongace 72 °C/60s), závěrečná elongace 72 °C/3min. Elektroforetická separace probíhala po dobu 30 min při 94 V ve 3% agarózovém gelu barveném ethidium bromidem.

Identifikace konkrétního kusu dobytka

Metodika identifikace individuálního původu tkání skotu a prasat ve výrobcích byla založena na multiplexové PCR reakci, za použití termálního cykleru GeneAmp™ PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Testování polymorfismu bylo prováděno prostřednictvím fragmentační analýzy DNA založené na laserovém skenování fluorescenčně značených DNA fragmentů na automatickém sekvenátoru ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Separace PCR fragmentů kapilární elektroforézou v polyakrylamidovém gelu probíhala spolu s interním DNA markerem. Určení genotypů v konkrétních mikrosatelitech (MS) proběhlo vyhodnocením velikostí DNA fragmentů softwarovými programy GeneScan® a Genotyper®.

K identifikaci konkrétního kusu skotu byl použit kit StockMarks® Bovine Paternity PCR Typing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Multiplex PCR, reakce pomocí které byla uskutečněna amplifikace všech 11 MS sekvencí najednou, probíhala dle dostupného protokolu (<http://docs.appliedbiosystems.com/pebi/docs/04327973.pdf>). Identifikace konkrétního kusu z tkání prasete ve výrobcích byla prováděna dle metodiky autorů Putnová a kol. (2003). Prostřednictvím multiplex PCR reakce byla uskutečněna současná amplifikace deseti mikrosatelitních markerů.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Určení druhu masa v potravinovém řetězci

Při analýzách odebraných vzorků jsme zjistili, že DNA skotu byla přítomna u vzorků T1–T7, T9–T11 a u kontrolního vzorku (Obr. 3). Hovězí maso nebylo prokázáno jen u vzorku T8. DNA prasete byla přítomna u všech vzorků z trhu i u kontrolního vzorku (Obr. 4). U žádného z analyzovaného vzorku nebyla přítomna DNA kura. Pozitivní byl jen kontrolní vzorek (Obr. 5).

V rámci záměru, který jsme sledovali, se nám podařilo aplikovat a ověřit druhově specifické PCR reakce

pro DNA kura, prasete a skotu. Vysoká citlivost reakcí byla prokázána i tím, že ve vzorku izolovaném ze směsi kuřecí svaloviny pouze s malým přídavkem eidamského sýra (po technologických zásazích mělnění, plnění, vaření), se podařilo pozitivně amplifikovat (za použití druhově specifických primerů pro skot) DNA fragment skotu odpovídající velikosti. Druho-

vou identifikaci jsme prováděli u jedenácti vzorků odebraných z tržní sítě. Při porovnávání těchto vzorků byla zjištěna identita mezi deklarovanými a nalezenými druhy masa. Výsledky jsou shrnuty v Tab. IV. Technologické zásahy neměly na výsledky druhové identifikace vliv.

IV: Porovnání uvedených a nalezených druhů DNA u vzorků z trhu

Označ. vz.	Název výrobku	Uvedené druhy masa	Nalezené druhy masa
T1	Dunajská klobása	vepřové, hovězí	vepřové, hovězí
T2	Teplické párky	vepřové, hovězí	vepřové, hovězí
T3	Polský párek se sýrem	vepřové, hovězí	vepřové, hovězí
T4	Štýrský kabanos	vepřové, hovězí	vepřové, hovězí
T5	Holický kabanos	vepřové, hovězí	vepřové, hovězí
T6	Slovenský točený	vepřové, hovězí	vepřové, hovězí
T7	Debrecínské párky	vepřové, hovězí	vepřové, hovězí
T8	Čertovy párky	Vepřové	vepřové
T9	Kladrubský kabanos	vepřové, hovězí	vepřové, hovězí
T10	Libové párky	vepřové, hovězí	vepřové, hovězí
T11	Gothajský salám	vepřové, hovězí, koňské	vepřové, hovězí

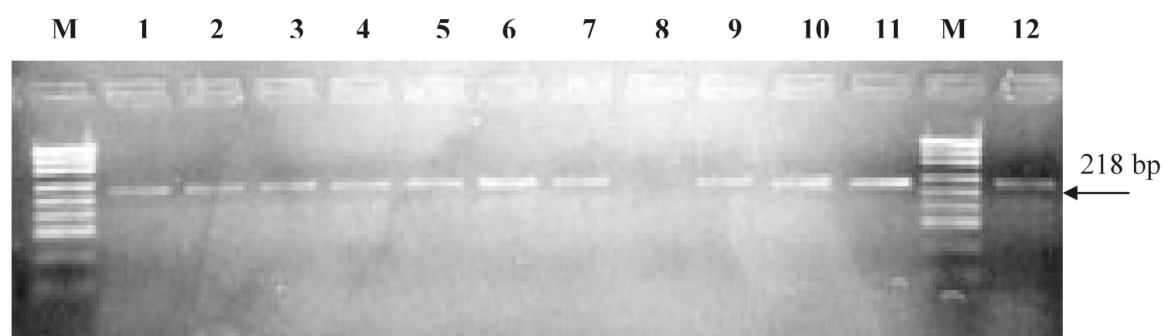
Identifikace konkrétního kusu dobytka

Vzhledem k tomu, že konkrétní jedinec je individualizován dvěma alelami každého z 10, respektive 11 mikrosatelitů (MS), můžeme při individuálním sledování s téměř 100% jistotou určit, zda krev a maso pochází od stejného jedince. Byli jsme schopni identifikovat konkrétní vybrané kusy v dané masové směsi. Prokázali jsem přítomnost čtyř kusů skotu ve výrobcích podrobených třem technologickým operacím. Také byla potvrzena přítomnost šesti jedinců prasat ve výrobcích podrobených devíti technologickým operacím. Při kumulaci většího počtu jedinců v masové směsi je zastoupení jednotlivých alel početnější i variabilnější. Mohlo by se stát, že by ve směsi byly nalezeny alely velikostně odpovídající DNA profilu jedince, přestože se daný konkrétní jedinec v masové směsi fyzicky nenachází. Tato situace by mohla nastat například při analýzách masových směsí, které obsahují příbuzné kusy ze stejného stáda.

Je také třeba počítat s výskytem nespecifických produktů vznikajících během reakce (Shinde a kol.,

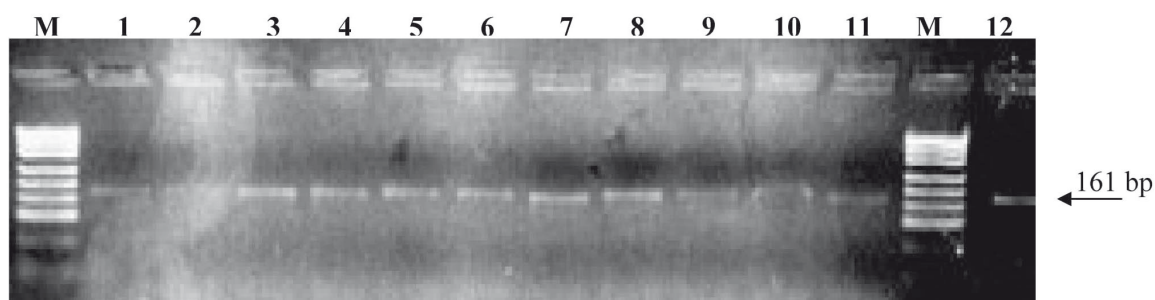
2003) a v případě směsných vzorků k jejich nesnadnému rozeznávání od některých slaběji se amplifikovaných fragmentů. Pro určení detekčních limitů bude třeba statisticky vyhodnotit DNA analýzy (Checa a kol., 2002; Lipkin a kol., 1998) většího souboru vzorků odebraných při několika denním sledování porážky a přesné dokumentaci všech poražených a zpracovaných kusů.

U směsných výrobků vyrobených výhradně ze zvířat, jejichž fragmentační analýzy jsme měli k dispozici, byl zaznamenán výskyt pouze alel mikrosatelitů odpovídající záznamům jednotlivých jedinců. Zjistili jsme, že u výrobků, které obsahovaly tkáň i dalších zvířat, výsledky jejichž fragmentační analýzy jsme neměli k dispozici, bylo možno také navíc identifikovat alely mikrosatelitů, které se u výstupních dat analyzovaných jedinců neobjevily. Došli jsme k závěru, že ve výrobcích, které jsou vyrobeny ze směsi z většího počtu zvířat, je možné přítomnost konkrétního jedince použitou metodikou pouze vyloučit, nikoli však potvrdit.



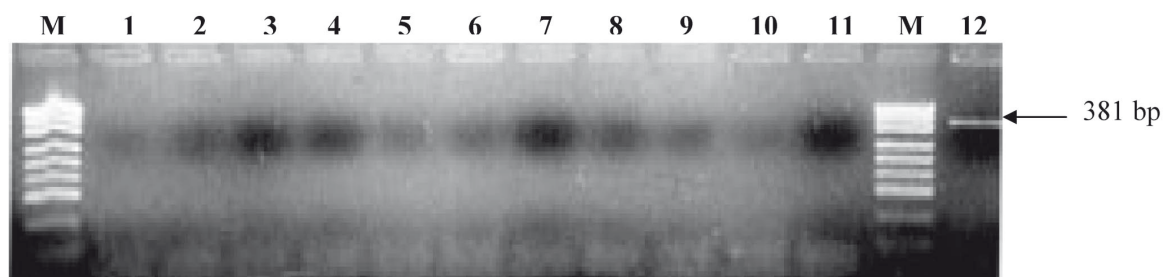
3: Identifikace svaloviny skotu ve vzorcích o předpokládaném složení:

fragmenty byly separovány v 3% agarózovém gelu barveném ethidium bromidem. M: marker M23 - 501/489, 404, 331, 242, 190, 147, 111/110, 67 bp (Fermentas INC., Hanover, USA), 1-11: T1-T11, 12: kontrolní DNA skotu.



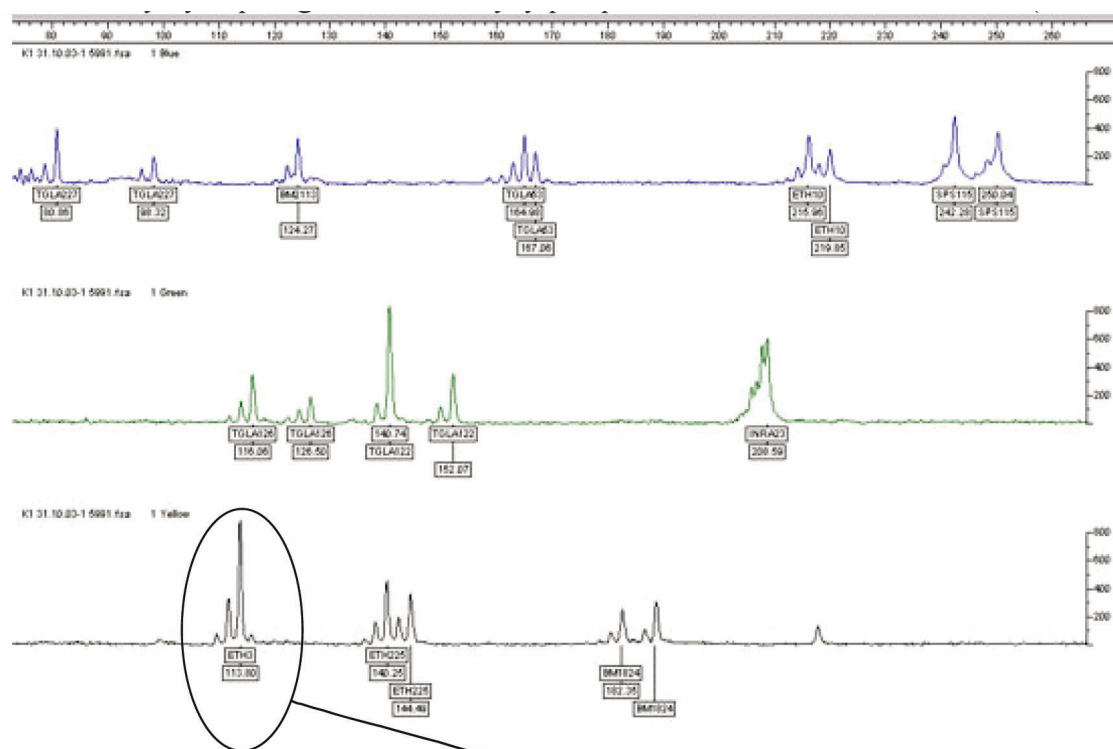
4: Identifikace svaloviny prasete ve vzorcích o předpokládaném složení:

fragmenty byly separovány v 3% agarózovém gelu barveném ethidium bromidem. M: marker M23 - 501/489, 404, 331, 242, 190, 147, 111/110, 67 bp (Fermentas INC., Hanover, USA), 1-11: T1-T11, 12: kontrolní DNA prasete.



5: Identifikace svaloviny kura ve vzorcích o předpokládaném složení:

fragmenty byly separovány v 3% agarózovém gelu barveném ethidium bromidem. M: marker M23 - 501/489, 404, 331, 242, 190, 147, 111/110, 67 bp (Fermentas INC., Hanover, USA), 1-11: T1-T11, 12: kontrolní DNA kura.

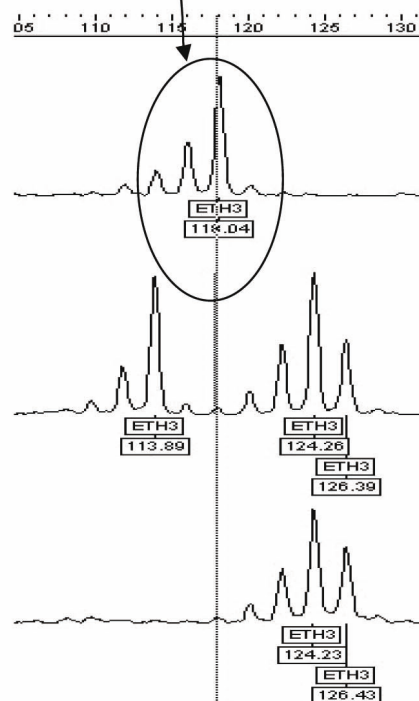


6: Grafický výstup fragmentační analýzy pro panel II MS skotu u vzorku č. 1 (Tab. II.)

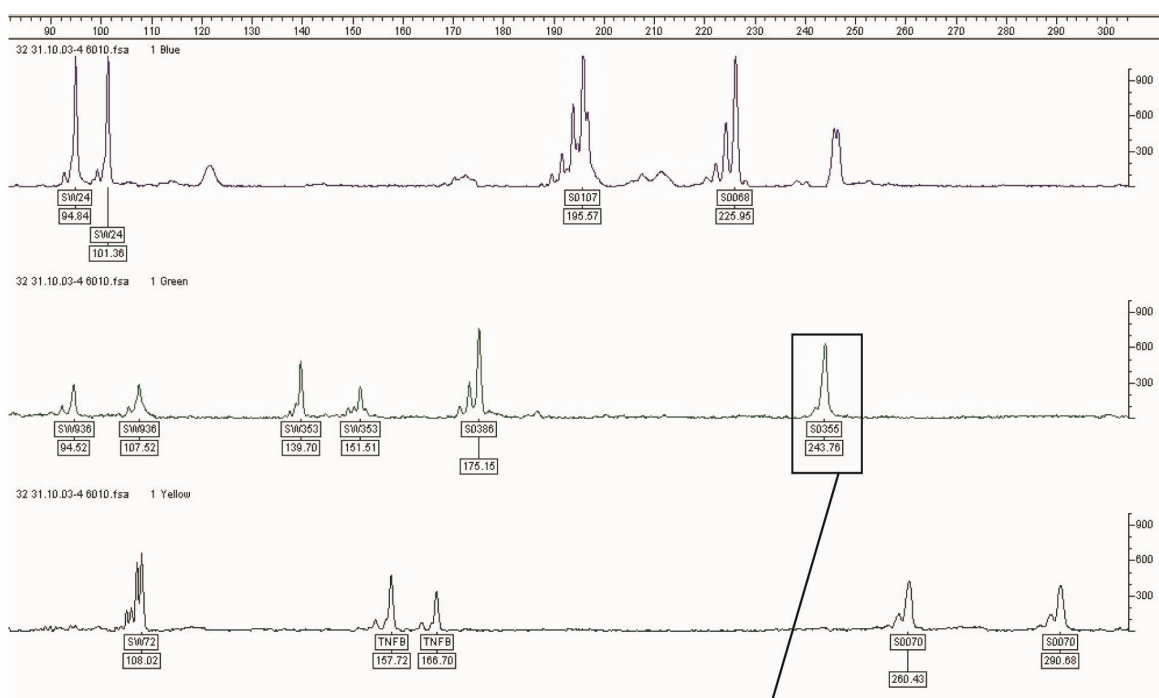
Individuální DNA
neprítomná ve směsi

Směsný vzorek

Individuální DNA
přítomná ve směsi



7: Srovnání výskytu alel pro mikrosatelit ETH3

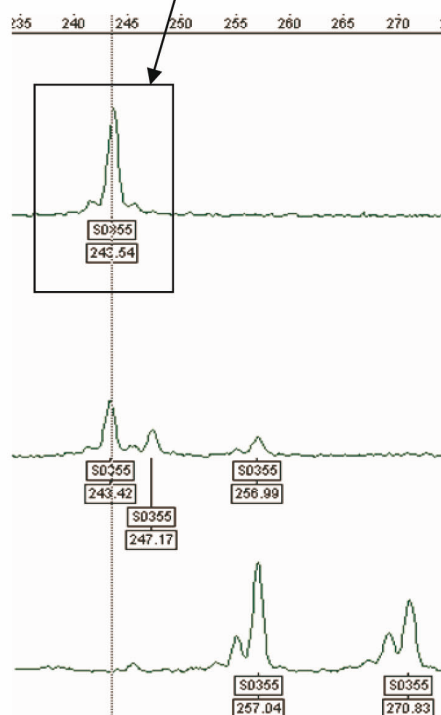


8: Grafický výstup fragmentační analýzy pro panel 10 MS prasat u vzorku č. 32 (Tab. III.)

Individuální DNA
nepřítomná ve směsi

Směsný vzorek

Individuální DNA
přítomná ve směsi



9: Srovnání výskytu alel pro mikrosatelit S0355

SOUHRN

Cílem práce bylo aplikovat a ověřit v Laboratoři aplikované molekulární genetiky (LAMGen) Ústavu genetiky MZLU v Brně molekulárně–genetické metody napomáhající při sledování bezpečnosti potravin. Během práce byly optimalizovány metody PCR reakcí pro detekci tkáně skotu, prasete a kura a byla ověřována přítomnost deklarovaných tkání ve vybraných masných výrobcích odebraných z tržní sítě. Při identifikaci konkrétního kusu dobytka ve směsných masných výrobcích (po různých technologických zásazích) jsme byli schopni identifikovat vybrané konkrétní kusy v masové směsi. Při větší kumulaci jedinců v masové směsi je zastoupení jednotlivých alel početnější a variabilnější. Mohlo by se stát, že by ve směsi byly nalezeny alely velikostně odpovídající DNA profilu jedince, i když se daný konkrétní jedinec v masové směsi fyzicky nenachází. U směsných výrobků vyrobených výhradně ze zvířat, jejichž fragmentační analýzy jsme měli k dispozici, byl zaznamenán výskyt pouze alel mikrosatelitů odpovídající záznamům jednotlivých jedinců. Ve směsi obsahující maso testovaného zvířete a zvířat netestovaných je možno ve spektru fragmentů identifikovat fragmenty pocházející od testovaného zvířete. Došli jsme k závěru, že ve výrobcích, které jsou vyrobeny ze směsi z většího počtu zvířat, je možné přítomnost konkrétního jedince použitou metodikou pouze vyloučit, nikoli však potvrdit.

DNA, identifikace, vepřové, hovězí, kuřecí maso

Materiál byl zpracován s podporou GAČR No. 523/03/HO76, VZ MSM 432100001, IGA MZLU v Brně č.15/2004, FRVŠ 159/2004.

LITERATURA

- CALVO, J. H., ZARAGOZA, P., OSTA, R. A.: quick and more sensitive method to identify pork in processed and unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment. *Journal of Animal Science*, 2001, 79: 2108–2112.
- CHECA, M. L., DUNNER, S., CAÑÓN, J.: Prediction of X and Y chromosome content in bovine sperm by using DNA pools through capillary electrophoresis. *Theriogenology*, 2002, 58: 1579–1586.
- ELDRIDGE, J., ZEHNER, Z., PATERSON, B. M.: Nucleotide sequence of the chicken cardiac alpha actin gene: absence of strong homologies in the promoter and 3' untranslated regions with the skeletal alpha actin sequence. *Gene*, 1985, 36: 55–63.
- JANSSEN, F. W., HAGELE, G. H., BUNTJER, J. B., LENSTRA, J. A.: Species identification in meat by using PCR-generated satellite probes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1998, 21: 115–120.
- LIPKIN, E., MOSIG, M. O., DARVASI, A., EZRA, E., SHALOM, A., FRIEDMANN, A., SOLLER, M.: Quantitative trait locus mapping in dairy cattle by means of selective milk DNA pooling using dinucleotide microsatellite markers: analysis of milk protein percentage. *Genetics*, 1998, 149: 1557–1567.
- LOCKLEY, A. K., BARDSLEY, R. G.: Intron variability in an actin gene can be used to discriminate between chicken and turkey DNA. *Meat Science*, 2002, 61: 163–168.
- MATSUNAGA, T., SHIBATA, K., YAMADA, J., SHINMURA, Y., CHIKUNI, K.: Identification of meat species based on the difference of 18 S ribosomal RNA genes. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 1998, 12: 719–723.
- MATSUNAGA, T., CHIKUNI, K., TANABE, R., MUROYA, S., SHIBATA, K., YAMADA, J., SHINMURA, Y.: A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science*, 1999, 51: 143–148.
- OBROVSKÁ, I., STEINHAUSEROVÁ, I., NEBOLA, M., KRKOŠKA, L.: Identifikace druhů masa v masných výrobcích. *Veterinářství*, 2002, 52: 421–423.
- PARTIS, L., CROAN, D., GUO, Z., CLARK, R., COLDHAM, T., MURPHY, J.: Evaluation of a DNA fingerprinting method of determining the species of origin of meats. *Meat Science*, 2000, 54: 369–376.
- PUTNOVÁ, L., KNOLL, A., DVOŘÁK, V., DVOŘÁK, J.: A novel porcine microsatellite panel for the identification of individuals and parentage control in the Czech Republic. *Czech Journal of Animal Science*, 2003, 48: 307–314.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B., ERLICH, H. A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988, 239: 487–491.
- SHINDE, D., LAI, Y., SUN, F., ARNHEIM, N.: Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)_n

- and (A/T)_n microsatellites. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31: 974-980.
- SKOWRONSKI, J., PLUCIENNICZAK, A., BEDNAREK, A., JAWORSKI, J.: Bovine 1.709 satellite. Recombination hotspots and dispersed repeated sequences. *Journal of Molecular Biology*, 1984, 177: 399-416.
- UNSELD, M., BEYERMAN, B., BRANDT, P., HEISEL, R.: Identification of the species of origin of highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences. *Genome Research*, 1995, 4: 241-243.
- WOLF, C., RENTSCH, J., HÖBNER, P.: PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: A reliable method for species identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47: 1350-1355.
- WOLF, C., LÜTHY, J.: Quantitative competitive PCR for quantification of porcine DNA. *Meat Science*, 2001, 57: 161-168.
- ZHANG, G., ZHENG, M., ZHOU, Z., OUYANG, H., LU, Q.: Establishment and application of a polymerase chain reaction for the identification of beef. *Meat Science*, 1999, 51: 233-236.

Adresa

Ing. Lucie Přívětivá, Ing. Pavel Stehno, Mgr. Lenka Putnová, Ph.D., Prof. Ing. Josef Dvořák, CSc., Ústav genetiky, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

