

## **Identifikácia zložiek rastlinného a živočíšneho pôvodu v potravinách metódami využívajúcimi polymerázovú reťazovú reakciu**

TOMÁŠ KUČHTA

**SÚHRN.** Práca sa zaoberá metódami využívajúcimi polymerázovú reťazovú reakciu (PCR) na dôkaz alergénov v potravinách a na autentifikáciu potravín z hľadiska zložiek rastlinného a živočíšneho pôvodu. Pozornosť sa venuje charakteristike metód na izoláciu DNA z potravín, menovite chaotropickej extrakcii na tuhej fáze a solubilizácii s cetyltrimetyl-amóniumbromidom s následnou extrakciou v kvapalnej fáze, a tiež stanoveniu výťažku a výťažnosti DNA z potravín. PCR sa charakterizuje v súvislosti s návrhom primérov a sond, a tiež z hľadiska dôležitých parametrov a variantov klasickej PCR a real-time PCR. Uvádzajú sa dostupné PCR metódy na identifikáciu zložiek rastlinného pôvodu v takých potravinách, ako sú obilniny obsahujúce glutén, sója, orechy, zeler a iné rastlinné druhy. Ďalej sú opísané dostupné PCR metódy na identifikáciu jednotlivých zložiek potravín živočíšneho pôvodu vrátane tých, ktorých prítomnosť v potravinách musí byť deklarovaná.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ:** DNA; polymerázová reťazová reakcia; analýza potravín; alergény; mäso; mlieko; potraviny rastlinného pôvodu

Polymerázová reťazová reakcia (PCR) je moderná molekulárno-biologická metóda analýzy DNA, ktorá sa v posledných rokoch začína širšie využívať na analýzu potravín. Dôležitou oblasťou aplikácie PCR je jej využitie na dôkaz zložiek rastlinného a živočíšneho pôvodu v potravinách, najmä v súvislosti s požiadavkami Európskej smernice 2003/89/EC z 10. novembra 2003 [1] a z nej vyplývajúceho výnosu Ministerstva pôdohospodárstva SR a Ministerstva zdravotníctva SR č. 1187/2004-100 z 28. apríla 2004 [2], ktoré určujú povinnosť uvádzať v označení potravín prítomnosť niektorých alergénnych zložiek. Súčasný zoznam biologických alergénov, ktorých označovanie je povinné, zahŕňa kôrovce, vajcia, ryby, podzemnicu olejnú, sóju, mlieko, rôzne druhy orechov, zeler, horčicu a sezam. Okrem

---

RNDr. Tomáš KUČHTA, CSc., Oddelenie mikrobiológie a molekulárnej biológie, Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, P. O. Box 25, 824 75 Bratislava 26.  
Korešpondujúci autor: RNDr. Tomáš KUČHTA, CSc., e-mail: kuchta@vup.sk

toho je zaujímavé použitie PCR na dôkaz, resp. kvantifikáciu nedeklarovaných zložiek v súvislosti s falšovaním potravín.

Postup analýzy potravín na základe PCR pozostáva z izolácie DNA a z detekcie, príp. kvantifikácie špecifickej sekvencie pomocou PCR. Výhodami PCR v porovnaní s inými metódami na analýzu zložiek potravín, napr. imunochemickými metódami na princípe ELISA, sú rýchlosť, vysoká selektivita a vysoká citlivosť, a tiež použiteľnosť metódy na analýzu tepelne opracovaných potravinárskych výrobkov [3].

Predkladaný článok prezentuje prehľad aktuálnych informácií o spôsoboch izolácie DNA z potravín, spôsoboch detekcie a kvantifikácie použitím PCR a o jednotlivých metódach na identifikáciu zložiek potravín.

## **Izolácia DNA**

### *Charakteristika metód na izoláciu DNA z potravín*

Potraviny predstavujú zložitú maticu, v ktorej sa DNA nachádza vo fragmentovanom, resp. degradovanom stave v zmesi s rôznymi látkami, ktoré môžu prechádzať pri izolácii DNA do finálneho preparátu a pri následnej analýze pomocou PCR spôsobovať jej inhibíciu. V súčasnosti je k dispozícii len niekoľko vhodných metód, ktoré spĺňajú požiadavky z hľadiska nie príliš veľkej prácnosti a časovej náročnosti, pomocou ktorých je možné izolovať DNA dostatočnej čistoty pre následné použitie v PCR. Chaotropická extrakcia na tuhej fáze (SPE) je pomerne rýchla metóda, ktorá je dostupná vo forme súprav a umožňuje izoláciu DNA z väčšiny potravinových matic. Metóda založená na selektívnej precipitácii s detergentom cetyltrimetylamóniumbromidom (CTAB) a extrakcii v kvapalnej fáze (CTAB-LLE) preukázala v prípade niektorých potravinových matic lepšie prečistenie od inhibítorov ako chaotropická SPE, avšak táto metóda je prácnejšia a zdĺhavejšia. Spomedzi ďalších metód je ešte na izoláciu DNA z potravín vhodná metóda nechaotropickej SPE, ktorá je dostupná v dvoch verziách, pre potraviny rastlinného, resp. živočíšneho pôvodu. Iné tzv. veľmi rýchle metódy na izoláciu DNA nie sú vo všeobecnosti vhodné na izoláciu DNA z potravín [4, 5].

Aby sa zabránilo falošne negatívnym výsledkom analýz, je vždy potrebné overiť amplifikovateľnosť izolovanej DNA. Na tento účel sa môže použiť PCR s univerzálnymi eukaryotickými primérmí orientovanými na jadrový gén kódujúci 18S rRNA [6] alebo s univerzálnymi mitochondriálnymi primérmí orientovanými na gén kódujúci 16S rRNA [7]. V prípade potravín živočíšneho pôvodu sa môže použiť PCR s primérmí široko špecifickými

pre stavovce orientovanými na gén kódujúci cytochróm b [8], v prípade potravín rastlinného pôvodu sa môže použiť PCR s primérmí široko špecifickými pre autotrófne rastliny orientovanými na chloroplastový gén *rbcL* kódujúci veľkú podjednotku ribulózabisfosfátkarboxylázy-oxidázy (RUBISCO, [9]).

#### *Chaotropická extrakcia na tuhej fáze*

Princípom tejto metódy je naviazanie komplexu DNA s chaotropickou soľou na silikagelový nosič, jej premytie roztokom s vysokou iónovou silou a následná elúcia roztokom s nízkou iónovou silou [10]. Prakticky je na izoláciu DNA z potravín na princípe chaotropickej SPE výhodné použiť komerčnú súpravu obsahujúcu kolónky so silikagelovým nosičom a roztoky s optimalizovaným zložením, napríklad súpravu NucleoSpin Food (Macherey-Nagel, Düren, Nemecko). V tomto prípade pozostáva postup z nasledujúcich krokov:

- lýza homogenizovanej vzorky v roztoku obsahujúcom chaotropické soli, denaturačné činidlá a detergenty,
- odstránenie tuhých zložiek a precipitátu centrifugáciou,
- zmiešanie supernatantu s väzobným tlmivým roztokom a etanolom,
- naviazanie na silikagelovú kolónku,
- premytie dvoma premývacími tlmivými roztokmi po sebe,
- elúcia tlmivým roztokom s nízkou iónovou silou.

Chaotropická SPE sa úspešne použila na izoláciu DNA z rôznych druhov potravinových matric, pričom získané preparáty mali koncentráciu  $10^0\times$  až  $10^4\times$  prevyšujúcu minimálnu amplifikovateľnú koncentráciu. Určité problémy boli len so vzorkami obsahujúcimi čokoládu [5, 11, 12]. Výťažnosť metódy pri použití exogénnych krátkych lineárnych fragmentov DNA a sójovej múky ako matrice bola 8 % až 66 % [13].

#### *Solubilizácia s CTAB a extrakcia v kvapalnej fáze (CTAB-LLE)*

Postup izolácie DNA s použitím CTAB prvýkrát vypracovali MURRAY a THOMPSON [14] na izoláciu DNA z rastlín. Na izoláciu DNA z potravín rastlinného pôvodu pre následnú analýzu pomocou PCR ju použili ZAGON a kol. [15]. Princípom tejto metódy je selektívna precipitácia nukleových kyselín detergentom CTAB v roztoku s nízkou iónovou silou ( $<0,5$  M NaCl). V týchto podmienkach ostávajú rozpustené polysacharidy, fenolické látky a iné látky, ktoré by následne mohli inhibovať PCR. Precipitát sa rozpustí v roztoku s vyššou iónovou silou.

Prakticky sa na izoláciu DNA z potravín na princípe CTAB-LLE môže použiť postup vypracovaný referenčným laboratóriom pre GMO, Joint

Research Centre, Ispra, Taliansko [16], ktorý pozostáva z nasledujúcich krokov:

- lýza homogenizovanej vzorky v roztoku obsahujúcom CTAB, NaCl (vyššia koncentrácia) a proteinázu,
- degradácia RNA,
- odstránenie nepolárnych zložiek dvojnásobnou extrakciou chloroformom,
- precipitácia DNA v roztoku obsahujúcom CTAB a NaCl (nižšia koncentrácia),
- separácia precipitátu cetrifugáciou,
- rozpustenie precipitátu v roztoku NaCl s vyššou koncentráciou NaCl,
- odstránenie nepolárnych zložiek extrakciou chloroformom,
- prezrážanie DNA izopropanolom a etanolom.

Metóda CTAB-LLE sa úspešne použila na izoláciu DNA z rôznych druhov potravinových matric, pričom získané preparáty mali koncentráciu  $10^1\times$  až  $10^4\times$  prevyšujúcu minimálnu amplifikovateľnú koncentráciu [5]. Výťažnosť metódy pri použití exogénnych krátkych lineárnych fragmentov DNA a sójovej múky ako matrice bola 3 % až 54 % [13].

#### *Stanovenie výťažku a výťažnosti DNA z potravín*

Na hodnotenie výťažku DNA z potravín sa používajú metódy kvantifikácie DNA - UV-spektrofotometria, fluorometria komplexu DNA s interkalačným farbivom, alebo kvantifikácia amplifikovateľnej DNA s použitím PCR.

UV-spektrofotometrická kvantifikácia DNA je najjednoduchšou metódou kvantifikácie DNA. Meria sa absorbancia pri vlnovej dĺžke 260 nm a koncentrácia DNA sa vypočíta na základe poznatku, že roztok dvojvláknovej DNA s koncentráciou  $5\text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$  má absorbanciu približne 0,1. Na zistenie prípadnej kontaminácie preparátu proteínmi sa môže použiť dodatočné meranie absorbancie pri vlnovej dĺžke 280 nm. Preparát sa považuje za nekontaminovaný proteínmi, ak  $A_{260}/A_{280}$  je medzi 1,8 a 2,0. V prípade kontaminácie je táto hodnota nižšia [17]. Vzhľadom na spravidla malý objem vzorky je na spektrofotometrickú kvantifikáciu DNA potrebné použiť mikrokvetty. Praktické sú nedávno vyvinuté jednorazové UV-priepustné kvety s uzáverom, v ktorých sa po meraní môže preparát priamo uskladniť.

Nevýhodou spektrofotometrickej kvantifikácie DNA je to, že je pomerne málo citlivá (detekčný limit je  $250\text{ ng.ml}^{-1}$ ) a neumožňuje odlíšiť DNA od RNA a nukleotidov. Dokonalejšou metódou, ktorou sa kvantifikuje len DNA, je fluorometria komplexu DNA s interkalačným farbivom. Používajú

sa napríklad farbivá Hoechst 33258 (*p*-(5-(5-(4-metyl-1-piperaziny)-1H-2-benzimidazolyl)-1H-2-benzimidazolyl)fenol; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) alebo PicoGreen (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Kvantifikačný limit je v prípade farbiva Hoechst 33258 10 ng.ml<sup>-1</sup>, v prípade farbiva PicoGreen 25 pg.ml<sup>-1</sup>. Farbivo PicoGreen je selektívne pre dvojvláknovú DNA, pri použití farbiva Hoechst 33258 sa kvantifikuje aj jednovláknová DNA. Na menej citlivú kvantifikáciu jednovláknovej i dvojvláknovej DNA je možné použiť tiež interkalačné farbivá etídiumbromid alebo SybrGreen I (Invitrogen). Na orientačné určenie koncentrácie DNA s interkalačným farbivom sa môže použiť aj kvapkovacia metóda na čiernej podložke [18].

Ani presná fluorometrická kvantifikácia však nemusí poskytnúť relevantnú informáciu o koncentrácii amplifikovateľnej DNA. Týka sa to jednak stupňa jej degradácie resp. fragmentácie, ale tiež prítomnosti inhibítorov. Na určenie zastúpenia fragmentov DNA rôznej dĺžky v preparáte DNA sa používa elektroforéza v agarózovom géli. Na stanovenie koncentrácie amplifikovateľnej DNA je možné použiť postup, keď sa pripraví rad desiatkových riedení preparátu DNA a stanoví sa maximálne zriedenie vzorky, ktoré je možné ešte amplifikovať pomocou PCR. Ideálne je na tento účel použiť univerzálnu PCR, ktorou sa amplifikujú sekvencie DNA prítomné vo všetkých organizmoch, ale je možné použiť aj špecifickú PCR [5]. Súčasné stanovenie koncentrácie amplifikovateľných fragmentov DNA určitej dĺžky je možné kombináciou uvedených postupov, pričom sa niekoľko párov prímérov orientovaných na amplikóny rôznej dĺžky použije na amplifikáciu radu desiatkových riedení preparátu DNA.

Pri hodnotení výťažku izolácie DNA je potrebné brať do úvahy tiež homogenitu získaného preparátu. V prípade preparátu DNA, ktorý prešiel prezrážaním a znovurozpustením, treba často počítať s neúplnosťou rozpustenia a tým aj s jeho heterogenitou. Koncentráciu DNA v takomto prípade nie je možné zmerať s dostatočnou presnosťou a aj výsledky PCR sú nekvantitatívne [19].

V prípade kvantitatívnej analýzy potravín na základe analýzy DNA sa požaduje stanovenie výťažnosti DNA určitou izolačnou metódou z danej potravinovej matrice, ako pomeru získanej DNA ku všetkej prítomnej DNA. Na tento účel je možné použiť exogénne krátke lineárne fragmenty DNA a kvantitatívnu real-time PCR orientovanú na v nich prítomnú markerovú sekvenciu. Doterajšie výsledky nasvedčujú, že výťažnosti fragmentov DNA z potravín sú pomerne nízke, výrazne sa líšia pre rôzne matrice a tiež od experimentu k experimentu [20]. Ako problém pri stanovení výťažnosti fragmentov DNA sa javí jej koncentračná závislosť [13].

## Polymerázová refazová reakcia (PCR)

### *Návrh primérov a sond*

Vypracovanie PCR metód pre zložky potravín do značnej miery závisí od dostupnosti informácií o sekvencii genómu príslušných rastlinných alebo živočíšnych druhov. V prípade dobre preskúmaných druhov je možné vytvárať markerové sekvencie DNA, softvérovo ich porovnať s príbuznými druhmi a inými druhmi, ktoré sú zvyčajne tiež prítomné v danej potravinovej matrici. Na základe nájdennej špecifickej sekvencie sa potom navrhnu príslušné priméry a prípadne sondy pre PCR. V prípade, že nie je dostupný dostatok sekvenčných informácií, je možné použiť tzv. markery SCAR (sequence-characterized amplified region). V tomto prípade sa na súbor druhov, ktoré je potrebné rozlíšiť, aplikuje niektorá DNA-typizačná metóda, napríklad metóda PCR s náhodnou aneláciou primérov (randomly-amplified polymorphic DNA, RAPD) a hľadá sa fragment DNA, ktorý je prítomný v hľadanom druhu a neprítomný v iných druhoch. Tento fragment DNA sa osekvenuje a na základe zistenej sekvencie sa navrhnu špecifické priméry.

Na dôkaz zložiek potravín živočíšneho pôvodu je možné použiť priméry orientované na sekvencie jadrovej (chromozómovej) DNA alebo na sekvencie mitochondriálnej DNA. Keďže v každej živočíšnej bunke sa nachádza niekoľko sto až tisíc mitochondrií, PCR orientovaná na mitochondriálne sekvencie DNA je citlivejšia. Avšak vzhľadom na odlišný počet mitochondrií v bunkách rôznych tkanív a na závislosť ich počtu od fyziologických podmienok nie je možné PCR orientovanú na mitochondriálne gény použiť na kvantitatívnu analýzu.

Analogicky je na dôkaz zložiek potravín rastlinného pôvodu možné použiť priméry orientované na sekvencie jadrovej DNA alebo na sekvencie chloroplastovej DNA. V tomto prípade je citlivosť PCR orientovanej na chloroplastovú DNA vyššia pre zelené časti rastlín.

### *Klasická PCR*

Na kvalitatívnu analýzu zložiek potravín je možné použiť klasickú PCR. Preparát DNA izolovanej zo vzorky potravinovej sa pridá do reakčnej zmesi, obsahujúcej v tlmivom roztoku deoxyribonukleotidy, horečnaté kationy, oligonukleotidové priméry a termostabilnú DNA polymerázu. Reakčná vzorka sa inkubuje v PCR termocykléri s teplotným programom začínajúcim úvodnou denaturáciou, pokračujúcim 35–45 cyklami pozostávajúcimi z denaturácie, prilnutia primérov a polymerizácie, a končiacim záverečnou polymerizáciou. Produkt PCR sa analyzuje elektroforézou v agarózovom géli, pričom identita fragmentov DNA sa zisťuje na základe ich molekulovej hmotnosti



v porovnaní so štandardom. Vzhľadom na vysokú citlivosť uvedenej metódy je potrebné venovať veľkú pozornosť protikontaminačným opatreniam.

Pozornosť je potrebné venovať tiež amplifikovateľnosti DNA izolovanej z potravín, ktorá môže byť nízka v prípade vysokého stupňa degradácie alebo v prípade kontaminácie inhibítormi PCR. Preto je potrebné aplikovať externú alebo internú amplifikačnú kontrolu.

Na analýzu jednozložkových potravín je možné použiť aj PCR v usporiadaní multiplex, kedy sa v jednej skúmavke použije viacero párov primérov orientovaných na amplikóny s rôznou dĺžkou. V tomto prípade sa v jednej reakcii (rýchlejšie a úsporne) získa informácia o tom, ktorá z viacerých hľadaných zložiek sa nachádza vo vzorke [21].

Na extrémne zvýšenie citlivosti PCR sa v určitom období používala tzv. nested PCR. Šlo o usporiadanie, v ktorom sa na produkt prvej PCR aplikovala ďalšia PCR s priméromi orientovanými na vnútornú sekvenciu prvého amplikónu [22]. Od tejto metódy sa ustúpilo kvôli problémom s laboratórnou kontamináciou.

Semikvantitatívnu analýzu špecifických fragmentov DNA umožňuje kompetitívna PCR, ktorá je založená na paralelnej amplifikácii špecifického fragmentu DNA a radu definovaných koncentrácií exogénneho interného štandardu [23]. Túto pomerne nepraktickú metódu v súčasnosti vytlačila real-time PCR.

### *Real-time PCR*

Súčasným trendom je používať na analýzu potravín metódy PCR s priebežným monitorovaním fluorescencie, tzv. real-time PCR. Spomedzi viacerých navrhnutých spôsobov sa ako najvhodnejšia na analýzu potravín ukazuje tzv. 5'-nukleázová real-time PCR, využívajúca okrem špecifických primérov aj špecifické oligonukleotidové sondy označené na 5'-konci fluorescenčným farbivom a so zhášačom naviazaným na 3'-konci (tzv. sondy typu TaqMan). Oproti real-time PCR s interkalačným farbivom SybrGreen I je síce tento spôsob nákladnejší, ale umožňuje špecifickú detekciu amplifikovaného fragmentu DNA. Real-time PCR sa vykonáva v termocykléri integrovanom s fluorometrom a celý proces prebieha v uzavretých skúmavkách, čím sa podstatne znižuje riziko laboratórnej kontaminácie. Pre každú vzorku sa získa amplifikačná krivka, z ktorej je možné určiť tzv. prahový cyklus a na jeho základe kvantifikovať daný špecifický fragment DNA. V prípade, že obsah DNA v danej potravinovej zložke je definovaný, sa teda real-time PCR v princípe môže použiť na kvantitatívnu analýzu zloženia potravín [21]. V súčasnosti však ešte nie je k dispozícii dostatočné množstvo údajov o výťažnosti amplifikovateľnej DNA z rôznych potravinových matríc a nie sú ani

rozpracované systémy na kompenzáciu variability výťažnosti, ktoré sú bežné v chemickej analytike potravín (napríklad použitie interných štandardov pridávaných do potravinovej vzorky). Súčasné metódy real-time PCR sa preto v oblasti analýzy potravín obmedzujú na relatívnu kvantifikáciu. Na relatívnu kvantifikáciu zložiek potravín živočíšneho pôvodu sa ako endogénny interný štandard odporúča gén kódujúci myostatín [24]. Na relatívnu kvantifikáciu zložiek potravín rastlinného pôvodu v súčasnosti nie je k dispozícii vhodný endogénny interný štandard, keďže sa ukázalo, že PCR orientovaná na gén RUBISCO (pozri vyššie) poskytuje kvantitatívne veľmi odlišnú odozvu pre rôzne rastlinné druhy [25].

### **PCR metódy na identifikáciu zložiek rastlinného pôvodu v potravinách**

#### *Obilniny obsahujúce glutén*

Na identifikáciu pšenice, jačmeňa alebo raže v potravinách vypracovali DAHINDEN a kol. [26] kompetitívnu semikvantitatívnu PCR orientovanú na nekódujúcu oblasť chloroplastového génu *trnL*. Kvalitatívna modifikácia tejto metódy mala pre zmesi pšeničnej a sójovej múky detekčný limit 0,1 %, čo približne zodpovedá požiadavkám na potraviny označené ako bezlepkové [27]. Na identifikáciu samotnej pšenice, jačmeňa alebo raže sú k dispozícii real-time PCR s farbivom SybrGreen I, orientované na gény, kódujúce  $\omega$ -gliadín, hordeín, resp.  $\omega$ -sekalín [28].

#### *Sója*

Na identifikáciu sóje v mäsových výrobkoch vypracovali MEYER a kol. [22] metódu „nested PCR“ orientovanú na gén *Le1* kódujúci lektín. Zjednodušená modifikácia tejto metódy mala pre zmesi sójovej múky a mäsa detekčný limit 0,01 % [29]. K dispozícii je aj kvantitatívna 5'-nukleázová real-time PCR orientovaná na ten istý gén [30].

#### *Orechy*

Na dôkaz arašidov (podzemnica olejná) vypracovali HIRD a kol. [31] 5'-nukleázovú real-time PCR orientovanú na gén *Ara h2*. Vypracovaná metóda mala inkluzivitu 100 % a exkluzivitu 100 % v zmysle ISO 16140 [32] a pre jemne opražený arašidový prášok v modelových keksoch detekčný limit 2 mg.kg<sup>-1</sup>.

Na dôkaz lieskových orechov vypracovali HERMAN a kol. [33] PCR metódu orientovanú na mitochondriálny gén *nad1*. Táto metóda mala inkluzivitu 100 %, exkluzivitu voči potravinársky významným rastlinným druhom 100 %



a detekčný limit 10 mg.kg<sup>-1</sup> vypočítaný na základe analýzy zmesi DNA izolovanej z čokolády a pražených sekaných lieskovcov.

Na dôkaz uvedených a ďalších druhov orechov (mandle, vlašské orechy, pekanové orechy) v potravinách je k dispozícii tiež viacero komerčných súprav alebo je možnosť analýzy na objednávku, avšak o zložení a analytických parametroch týchto metód nie sú k dispozícii objektívne informácie.

### *Zeler*

Na dôkaz zeleru vypracovali DOVIČOVIČOVÁ a kol. [34] PCR metódu orientovanú na gén kódujúci manitoldehydrogenázu. Vypracovaná metóda mala inkluzivitu 100 %, exkluzivitu 100 % a pre modelové mäsové paštéty detekčný limit 0,1 %.

### *Ďalšie rastlinné druhy, ktorých označovanie je povinné*

Na dôkaz ďalších rastlinných druhov, ktorých označovanie je povinné (sezam, horčica) v potravinách je k dispozícii tiež viacero komerčných súprav alebo je možnosť analýzy na objednávku, avšak o zložení a analytických parametroch týchto metód nie sú k dispozícii objektívne informácie.

### *Ďalšie rastlinného druhy, ktorých označovanie nepožaduje súčasná potravinová legislatíva v SR*

Na relatívnu kvantifikáciu obľúbenej pšenice (*Triticum aestivum*) v cestovinách z tvrdej pšenice (*Triticum durum*) vypracovali ALARY a kol. [35] metódu 5'-nukleázovej duplex real-time PCR orientovanú na gén kódujúci tzv. lipid transfer protein a na gén kódujúci puroindolín b, ktorý je špecifický pre *T. aestivum*. Metóda umožňovala identifikáciu cestovín s obsahom obľúbenej pšenice vyšším než limit 3 % stanovený potravinovou legislatívou v niektorých európskych krajinách. Metódu s tým istým účelom vypracovali tiež TERZI a kol. [36] s použitím 5'-nukleázovej real-time PCR orientovanej na gén kódujúci gliadín. Na dôkaz obľúbenej pšenice v cestovinách je k dispozícii aj kvalitatívna PCR-metóda [37].

Na dôkaz fazule v gaštanovom pyré vypracovali KRAHULCOVÁ a kol. [38] PCR metódu orientovanú na gén *PvLEA-18* kódujúci proteín vyskytujúci sa v neskorej fáze embryogenézy. Vypracovaná metóda bola špecifická pre druh *Phaseolus vulgaris* a pre modelové vzorky gaštanového pyré s definovaným prídavkom varenej fazule mala detekčný limit 1 %.

Na dôkaz hrachu (*Pisum sativum*) v potravinách vypracovali BREŽNÁ a kol. [39] 5'-nukleázovú real-time PCR orientovanú na intrónovú oblasť medzi exónmi *trnL* a *trnF* kódujúcimi chloroplastovú tRNA. Metóda mala inkluzivitu 100 %, exkluzivitu 100 % a pre modelové mäsové paštéty s definovaným prídavkom hrachovej múky mala detekčný limit 0,05 %.

## **PCR metódy na identifikáciu zložiek živočíšneho pôvodu v potravinách**

### *Identifikácia mäsa z rôznych druhov zvierat*

Na rozlíšenie duhu mäsa zo stavovcov vypracovali MEYER a kol. [8] metódu PCR-RFLP pozostávajúcu z amplifikácie fragmentu mitochondriálneho génu kódujúceho cytochróm b a následného štiepenia restriktívnymi endonukleázami AluI, RsaI, TaqI a HinfI. Metóda umožňovala rozlíšenie hovädzieho, bravčového, kuracieho, kozieho, jahňacieho mäsa a mäsa z ďalších druhov zvierat. V prípade tepelne opracovaných zmesných mäsových výrobkov bol pre hovädzie mäso stanovený detekčný limit 1 %. Analogickú metódu PCR-RFLP s odlišnými primérami vypracovali ZIMMERMANN a kol. [40].

Na ten istý gén je orientovaná metóda multiplex PCR, používajúca jeden spoločný dopredný primér a špecifické reverzné priméry pre hovädziu, bravčovú, kuraciu, koziu, jahňaciu a konskú zložku [41].

Na identifikáciu druhu mäsa vypracovali BUNTJER a LENSTRA [42] PCR metódu orientovanú na mikrosatelity. Pri tejto metóde sa pre mäso z jednotlivých druhov zvierat amplifikujú rôzne polymorfické súbory fragmentov DNA. Na ich základe boli na identifikáciu mäsa jednotlivých druhov zvierat (hovädzie, bravčové, kuracie, morčie, jahňacie, konské) navrhnuté špecifické oligonukleotidové sondy [43]. Analogicky orientovanú PCR metódu vypracovali TAJIMA a kol. [44].

Na dôkaz kuracieho mäsa v zmesiach vypracovali HOPWOOD a kol. [45] PCR-metódu orientovanú na gén kódujúci  $\alpha$ -aktín. Analogicky orientovanú multiplex PCR so spoločným reverzným primérom a špecifickými doprednými primérami vypracovali RODRÍGUEZ a kol. [46]. Metóda umožňovala dôkaz kuracieho a bravčového mäsa v mäsových výrobkoch z husacieho a kačacieho mäsa s detekčným limitom 0,1 %.

Na dôkaz bravčového mäsa vypracovali MONTIEL-SOSA a kol. [47] PCR metódu orientovanú na mitochondriálnu D-slučku. Pre dôkaz bravčového mäsa v zmesi s hovädzím mäsom stanovili autori detekčný limit 5 %.

Na citlivý dôkaz hovädzieho alebo bravčového mäsa vypracovali LAUBE a kol. [24] metódy duplexnej a triplexnej 5'-nukleázovej real-time PCR orientované na gén kódujúci fosfodiesterázu, resp. ryanodín, doplnené o použitie endogénneho interného štandardu, fragmentu génu kódujúceho myostatín. Touto metódou bolo možné detegovať 0,1 % hovädzieho alebo bravčového mäsa v tepelne opracovaných mäsových výrobkoch.

Na dôkaz hovädzieho mäsa v tepelne opracovaných mäsových výrobkoch vypracovali PASCOAL a kol. [48] PCR metódu orientovanú na mitochon-

driálny gén kódujúci cytochróm b. Metóda umožňovala po tepelnom opracovaní dôkaz hovädzieho mäsa v pšeničnej múke s detekčným limitom 0,025 %.

Analogickú metódu 5'-nukleázovej real-time PCR umožňujúcu tiež relatívnu kvantifikáciu hovädzieho alebo bravčového mäsa vypracovali PALISCH a kol. [49], avšak bližšie informácie o orientácii PCR a sekvenciách primérov a sond nie sú k dispozícii.

Ďalšie metódy 5'-nukleázovej real-time PCR boli vypracované na dôkaz kuracieho a kačacieho mäsa, kozieho mäsa, konského, pštosieho a klokani-eho mäsa. Metóda 5'-nukleázovej real-time PCR na relatívnu kvantifikáciu kozieho mäsa bola tiež validovaná [50].

#### *Identifikácia mlieka z rôznych druhov zvierat*

PLATH a kol. [51] vypracovali na rozlíšenie kravského, ovčieho a kozieho mlieka metódu PCR-RFLP, pozostávajúcu z amplifikácie fragmentu génu kódujúceho  $\beta$ -kazeín a následného štiepenia restriktívnymi endonukleázami AluI a AvaII. Detekčný limit pre kravskú mliečnu zložku v tvrdom syre bol 0,5 %.

MAUDET a TABERLET [52] vypracovali na dôkaz kravskej mliečnej zložky v kozích syroch PCR metódu orientovanú na mitochondriálnu D-slučku. Detekčný limit metódy bol 0,1 %.

Na rozlíšenie kravského, ovčieho a kozieho mlieka v mliečnych výrobkoch vypracovali BOTTERO a kol. [53] metódu multiplex PCR orientovanú na gén kódujúci cytochróm b. Detekčný limit pre jednotlivé zložky bol 0,5 %.

#### *Zložky potravín živočíšneho pôvodu, ktorých označovanie je povinné*

Na dôkaz rýb vypracovali REMLER a kol. [7] metódu orientovanú na gén kódujúci 18S rRNA. Aby sa dosiahla dostatočná inkluzivita, použil sa jeden dopredný a tri reverzné priméry. Detekčný limit metódy bol 0,01 %.

Na dôkaz kôrovcov v potravinách napriek značnému výskumnému úsiliu nebola dosiaľ vypracovaná vhodná PCR-metóda [25].

Na dôkaz vajec a mlieka v potravinách je teoreticky možné použiť PCR metódy na dôkaz slepačieho, resp. hovädzieho mäsa, ale len pre potravinárske výrobky, v ktorých je prítomnosť mäsa vylúčená.

## Literatúra

1. Directive 2003/89/EC of the European Parliament and of the Council of 10 November 2003 amending Directive 2000/13/EC as regards indication of the ingredients present in food-stuffs (Text with EEA relevance). Official Journal of the European Union, *46*, 2003, L 308, s. 15-18.
2. Výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky a Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky z 28. apríla 2004 č. 1187/2004-100, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca označovanie potravín. Vestník Ministerstva pôdohospodárstva SR, roč. 36, 2004, č. 13, s. 1-16.
3. PÖPPING, B.: The application of biotechnological methods in authenticity testing. *Journal of Biotechnology*, *98*, 2002, s. 107-112.
4. ZIMMERMANN, A. - LÜTHY, J. - PAULI, U.: Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean samples. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, *207*, 1998, s. 81-90.
5. OLEXOVÁ, L. - DOVIČOVIČOVÁ, L. - KUCHTA, T.: Comparison of three types of methods for the isolation of DNA from flours, biscuits and instant paps. *European Food Research and Technology*, *218*, 2004, s. 390-393.
6. ALLMANN, M. - CANDRIAN, U. - HÖFELEIN, C. - LÜTHY, J.: Polymerase chain reaction (PCR). A possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, *196*, 1993, s. 248-251.
7. REMLER, P. - MÜLLEDER, U. - RUPPITSCH, W. - RASSI, E.: Entwicklung von Methoden zum qualitativen und quantitativen Nachweis und zur Unterscheidung von Tier- und Fischmehl in Futtermitteln durch Nachweis von DNA mit PCR. *Záverečná správa*. Graz : Technische Universität, 2004. 116 s.
8. MEYER, R. - HÖFELEIN, C. - LÜTHY, J. - CANDRIAN, U.: Polymerase chain reaction - Restriction fragment length polymorphism analysis: A simple method for species identification in food. *Journal of AOAC International*, *78*, 1995, s. 1542-1551.
9. WYMAN, M. - DAVIES, J. T. - CRAWFORD, D. W. - PURDIE, D. A.: Molecular and physiological responses of two classes of marine chromophytic phytoplankton (Diatoms and prymnesiophytes) during the development of nutrient-stimulated blooms. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*, 2000, s. 2349-2357.
10. BOOM, R. - SOL, C. J. - SALIMANS, M. M. - JANSEN, C. L. - WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M. - VAN DER NOORDAA, J.: Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, *28*, 1990, s. 195-503.
11. GRYSO, N. - MESSENS, K. - DEWETTINCK, K.: Evaluation and optimisation of five different extraction methods for soya DNA in chocolate and biscuits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *84*, 2004, s. 1357-1363.
12. OLEXOVÁ, L. - KUCHTA, T. - PANGALLO, D.: Determinazione di tracce di noccioline in prodotti dolciari. *Ingredienti Alimentari*, *4*, 2005, s. 16-18.
13. PIKNOVÁ, L. - KUCHTA, T.: Concentration dependence of recovery rates of exogenous DNA fragments from soya flour. *European Food Research and Technology*, in press.
14. MURRAY, M. G. - THOMPSON, W. F.: Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, *8*, 1980, s. 4321-4325.
15. ZAGON, J. - SCHAUZU, M. - BROLL, H. - BÖGL, K. W. - WINKLER, D.: Methods for the detection of genetic modifications in transgenic organisms. Berlin : Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, 1998. 56 s.
16. Training course on the analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms. User manual. Ispra : Joint Research Centre, 2002, 144 s.

17. MANIATIS, T. - FRITSCH, E. F. - SAMBROOK, J.: Molecular cloning. New York : Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545 s.
18. TURŇA, J. - STUHLÍK, S. - DRAHOVSKÁ, H. - GÁLOVÁ, Z. - TIMKO, J.: Techniky rekombinantných molekúl. Bratislava : Veda, 2004, 152 s.
19. ŠTEFANOVIČOVÁ, A. - KUČTA, T. - SIEKEL, P.: Dôkaz geneticky modifikovanej sóje v potravinách polymerázovou reťazovou reakciou. Bulletin potravinárskeho výskumu, 39, 2000, s. 255-264.
20. PIKNOVÁ, L. - KUČTA, T. - DRAHOVSKÁ, H. - PANGALLO, D.: Determinazione del tasso di recupero del DNA dagli alimenti. Industrie Alimentari, 43, 2004, s. 1129-1132.
21. KUČTA, T.: Polymerázová reťazová reakcia ako metóda na analýzu potravín. Bulletin potravinárskeho výskumu, 44, 2005, s. 1-16.
22. MEYER, R. - CHARDONNENS, F. - HÜBNER, P. - LÜTHY, J.: Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: Detection of soya in processed meat products. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung, 203, 1996, s. 339-334.
23. WOLF, C. - LÜTHY, J.: Quantitative competitive (QC) PCR for quantification of porcine DNA. Meat Science, 57, 2001, s. 161-168.
24. LAUBE, I. - SPIEGELBERG, A. - BUTSCHKE, A. - ZAGON, J. - SCHAUZU, M. - KROH, L. - BROLL, H.: Methods for the detection of beef and pork in foods using real-time polymerase chain reaction. International Journal of Food Science and Technology, 38, 2003, s. 111-118.
25. ZAGON, J. - BROLL, H. - BUTSCHKE, A.: Development of quantitative and qualitative molecular biological methods to identify plant and animal species in foods. Záverečná správa. Berlin : Bundesinstitut für Risikobewertung, 2005. 794 s.
26. DAHINDEN, I. - VON BÜREN, M. - LÜTHY, J.: A quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for coeliac patients. European Food Research and Technology, 212, 2001, s. 228-233.
27. OLEXOVÁ, L. - PIKNOVÁ, L. - SIEKEL, P. - KUČTA, T.: Metóda na dôkaz obilnín obsahujúcich glutén v potravinách polymerázovou reťazovou reakciou. Poľnohospodárstvo, 49, 2003, s. 579-582.
28. SANDBERG, M. - LUNDBERG, L. - FERM, M. - MALMHEDEN YMAN, I.: Real time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods. European Food Research and Technology, 217, 2003, s. 344-349.
29. PIKNOVÁ, L. - ŠTEFANOVIČOVÁ, A. - FARKAŠ, P. - PANGALLO, D. - KUČTA, T.: Rivelazione di soia in prodotti di carne mediante PCR e analisi degli steroli. Industrie Alimentari, 41, 2002, s. 163-166.
30. VAITILINGOM, M. - PIJNENBURG, H. - GENDRE, F. - BRIGNON, P.: Real-time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and RoundupReady soybean in some representative foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 1999, s. 5261-5266.
31. HIRD, D. - LLOYD, J. - GOODIER, R. - BROWN, J. - REECE, P.: Detection of peanut using real-time polymerase chain reaction. European Food Research and Technology, 217, 2003, s. 265-268.
32. ISO 16140:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Protocol for the validation of alternative methods. 2003.
33. HERMAN, L. - DE BLOCK, J. - VIANE, R.: Detection of hazelnut DNA traces in chocolate by PCR. International Journal of Food Science and Technology, 38, 2003, s. 633-640.
34. DOVIČOVIČOVÁ, L. - OLEXOVÁ, L. - PANGALLO, D. - SIEKEL, P. - KUČTA, T.: Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of celery (*Apium graveolens*) in food. European Food Research and Technology, 218, 2004, s. 493-495.

35. ALARY, R. - SERIN, A. - DUVIAU, M. P. - JOUDRIER, P. - GAUTIER, M. F.: Quantification of common wheat adulteration of durum wheat pasta using real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR). *Cereal Chemistry*, 79, 2002, s. 553-558.
36. TERZI, V. - MALNATI, M. - BARBANERA, M. - STANCA A. M. - FACCIOLO, P.: Development of analytical systems based on real-time PCR for *Triticum* species-specific detection and quantitation of bread wheat contamination in semolina and pasta. *Journal of Cereal Science*, 38, 2003, s. 87-94.
37. BRYAN, G. J. - DIXON, A. - GALE, M. D. - WISEMAN, G.: A PCR-based method for the detection of hexaploid bread wheat adulteration of durum wheat and pasta. *Journal of Cereal Science*, 28, 1998, s. 135-146.
38. KRAHULCOVÁ, J. - PANGALLO, D. - PIKNOVÁ, L. - SIEKEL, P. - KUCHTA, T.: Polymerase chain reaction for the detection of *Phaseolus vulgaris* beans in chestnut purée. *European Food Research and Technology*, 217, 2003, s. 80-82.
39. BREŽNÁ, B. - HUDECOVÁ, L. - KUCHTA, T.: Detection of pea in food by real-time polymerase chain reaction (PCR). *European Food Research and Technology*, in press.
40. ZIMMERMANN, S. - ZEHNER, R. - MEBS, D.: Identification of animal species in meat samples by DNA-analysis. *Fleischwirtschaft International*, 2, 1999, s. 39-42.
41. 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*, 51, 1999, s. 143-148.
42. BUNTJER, J. B. - LENSTRA, J. A.: Mammalian species identification by interspersed repeat PCR fingerprinting. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21, 1998, s. 121-127.
43. JANSSEN, F. W. - HÄGELE, G. H. - BUNTJER, J. B. - LENSTRA, J. A.: Species identification in meat by using PCR-generated satellite probes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21, 1998, s. 115-120.
44. TAJIMA, K. - ENISHI, O. - AMARI, M. - MITSUMORI, M. - KAJIKAWA, H. - KURIHARA, M. - YANAI, S. - MATSUI, H. - YASUE, H. - MITSUHASHI, T. - KAWASHIMA, T. - MATSUMOTO, M.: PCR detection of DNAs of animal origin in feed by primers based on sequences of short and long interspersed repetitive elements. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 66, 2002, s. 2247-2250.
45. HOPWOOD, A. J. - FAIRBROTHER, K. S. - LOCKLEY, A. K. - BARDSLEY, R. G.: An actin gene-related polymerase chain reaction (PCR) test for identification of chicken in meat mixtures. *Meat Science*, 53, 1999, s. 227-231.
46. RODRÍGUEZ, M. A. - GARCÍA, T. - GONZÁLEZ, I. - ASENSIO, L. - HERNÁNDEZ, P. E. - MARTIN, R.: Species identification by PCR. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 2003, s. 1176-1181.
47. MONTIEL-SOSA, J. F. - RUIZ-PESINI, E. - MONTOYA, J. - RONCALÉS, P. - LÓPEZ-PÉREZ, M. J. - PÉREZ-MARTOS, A.: Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2000, s. 2829-2832.
48. PASCOAL, A. - PRADO, M. - CALO, P. - CEPEDA, A. - BARROS-VELÁZQUEZ, J.: Detection of bovine DNA in raw and heat-processed foodstuffs, commercial foods and specific risk materials by a novel specific polymerase chain reaction method. *European Food Research and Technology*, 220, 2005, s. 444-450.
49. PALISCH, A. - MERGEMEIER, S. - KUHN, M.: Einsatz der Real-time PCR zur quantitativen Bestimmung des Rinder- und Schweineanteils in Lebensmitteln. *Fleischwirtschaft*, 83, 2003, s. 153-156.
50. MOLSPEC-ID online database (MSDB) 1.0 [online]. Berlin : Bundesinstitut für



- Risikobewertung, 2005 [cit. 15. 5. 2005]. <<http://www.molspec.org>>
51. PLATH, A. - KRAUSE, I. - EINSPIER, R.: Species identification in dairy products by three different DNA-based techniques. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 205, 1997, s. 437-441.
52. MAUDET, C. - TABERLET, P.: Detection of cows' milk in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism. *Journal of Dairy Research*, 68, 2001, s. 229-235.
53. BOTTERO, M. T. - CIVERA, T. - NUCERA, D. - ROSATI, S. - SACCHI, P. - TURI, R. M.: A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows', goats' and sheep's milk in dairy products. *International Dairy Journal*, 13, 2003, s. 277-282.

Do redakcie došlo 19. 5. 2005.

#### **Identification of the components of plant and animal origin in food using polymerase chain reaction**

KUCHTA, T.: *Bull. potrav. Výsk.*, 44, 2005, p. 141-155.

**SUMMARY.** This article presents a review of methods based upon the polymerase chain reaction (PCR) for the detection of allergens in food and for food authentication regarding the components of plant and animal origin. Attention is paid to characteristics of the methods for DNA isolation from food, namely, to the chaotropic solid-phase extraction and to cetyltrimethylammonium bromide-based solubilization with subsequent liquid-liquid extraction, as well as to the determination of DNA recovery and recovery rate from food. PCR is characterized with regard to the design of primers and probes, as well as regarding the important parameters and variants of the conventional PCR and real-time PCR. Available PCR-based methods for the identification of the components of plant origin in food are reviewed, namely, for gluten-containing cereals, soya, nuts, celery and other plant species. Further, available PCR-based methods for the identification of food components of animal origin are described, namely, for meat from various animal species, milk from various animal species and for other food components that are subjects to obligatory labelling.

**KEYWORDS:** DNA; polymerase chain reaction; food analysis; allergens; meat; milk; food of plant origin