

Dôkaz hovädzej zložky v mäsových výrobkoch polymerázovou reťazovou reakciou

LUBICA PIKNOVÁ - TOMÁŠ KUČHTA

SÚHRN. V článku sa opisuje metóda na princípe polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) na dôkaz hovädzej zložky v mäsových výrobkoch. Metóda pozostáva z izolácie DNA použitím súpravy Wizard a z PCR orientovanej na sekvenciu mitochondriálneho génu kódujúceho cytochróm b (Matsunaga a kol., Meat Science, 51, 1999, s. 143-148). Selektivita použitých primérov sa overila na vzorkách najbežnejších mias. Na modelových vzorkách, obsahujúcich hovädzie a bravčové mäso v definovanom pomere, sa stanovil detekčný limit 0,05 %. Optimalizovaná metóda sa použila na analýzu mäsových výrobkov, pričom v prípade deklarovanej hovädzej zložky (4 vzorky) sa vo všetkých prípadoch získali pozitívne výsledky a v prípade nedeklarovanej hovädzej zložky (11 vzoriek) sa pozitívne výsledky získali v 6 prípadoch. Vypracovaná metóda sa ukázala ako vhodná na rýchly, špecifický a citlivý dôkaz hovädzej zložky v mäsových výrobkoch.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: hovädzie; mäso; polymerázová reťazová reakcia; cytochróm b

V posledných rokoch v súvislosti s výskytom BSE vyvstala potreba analytických metód na citlivý a rýchly dôkaz hovädzej zložky v mäsových výrobkoch. Doteraz najrozšírenejšia metóda ELISA, ktorá je komerčne dostupná vo forme súprav, nespĺňa všetky požiadavky jednak z hľadiska citlivosti a tiež vzhľadom na problémy pri analýze tepelne upravených mäsových výrobkov [1,2]. Ako citlivejšia, selektívnejšia a pritom rýchla alternatíva bola navrhnutá metóda na princípe polymerázovej reťazovej reakcie (PCR), založená na amplifikácii časti mitochondriálneho génu kódujúceho cytochróm b, špecifickej pre stavovce, a následnej enzýmovej restrikcii produktu za účelom druhového rozlíšenia [3,4]. Táto metóda sa však ukázala ako nie veľmi vhodná na analýzu zmesí rôznych druhov mias a preto bola navrhnutá iná metóda na princípe PCR orientovaná tiež na gén kódujúci cytochróm b, avšak

RNDr. Lubica PIKNOVÁ, RNDr. Tomáš KUČHTA, CSc., Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, P. O. box 25, 824 75 Bratislava 26.

Korešpondujúci autor: RNDr. Tomáš KUČHTA, CSc., e-mail: kuchta@vup.sk

využívajúca jeden nešpecifický primér a druhý primér špecifický pre daný živočíšny druh [5]. Uvedenú metódu sme upravili pre použitie v našich podmienkach a aplikovali na vybrané vzorky mäsových výrobkov.

Materiál a metódy

Vzorky mäsa a mäsových výrobkov boli získané z obchodnej siete v Bratislave.

DNA sa izolovala použitím súpravy Wizard DNA Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) [3,6]. K 300 mg homogenizovanej vzorky sa pridalo 430 μ l tlmivého roztoku TNE (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% dodecylsulfát sodný, pH 8,0), 50 μ l 5 M guanidínium hydrochloridu a 20 μ l proteinázy K (20 mg.ml⁻¹) a vzorky sa inkubovali 3 h pri 57 °C. Po centrifugácii (14000 g počas 10 min pri 4 °C) sa 450 μ l supernatantu pridalo k 1 ml suspenzie Wizard Resin a po premiešaní sa celý objem pomocou vaku naniesol na minikolónu. Minikolóna sa premyla 2 ml 80% izopropanolu, centrifugovala pri 10000 g počas 2 min a nechala 10–15 min vysušiť pri laboratórnej teplote. DNA sa eluovala z minikolóny 50 μ l horúcej (70 °C) vody a uskladnila sa pri teplote -18 °C.

PCR sa realizovala v cykléri Biometra Personal Cycler (Whatman-Biometra, Göttingen, Nemecko). Použil sa pár primérov SIM/BEEF špecifický pre hovädzinu [5] a nešpecifický pár primérov CYTb1/CYTb2 [3] (tab. 1). Reakčná zmes (pH 8,4) obsahovala 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM každého dNTP (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), 1,25 U Platinum Taq polymerázy (Life Technologies), 25 pmol primérov SIM/BEEF alebo CYTb1/CYTb2 (Generi, Hradec Králové, ČR) a 1 μ l roztoku DNA. Teplotný program pozostával z úvodnej denaturácie pri 94 °C počas 1 min; 35 cyklov (94 °C počas 30 s, 60 °C pre priméry SIM/BEEF resp.

TAB. 1. Použité priméry.

TAB. 1. Primers used.

Primér ¹	Sekvencia ²	Literatúra ³
SIM	5'-GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAA-3'	5
BEEF	5'-CTAGAAAAGTGTAAGACCCGTAATATAAG-3'	5
CYTb1	5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3'	3
CYTb2	5'-GCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'	3

1 - primer, 2 - sequence, 3 - reference.

50 °C pre priméry CYTb1/CYTb2 počas 30 s a 72 °C počas 30 s) a záverečnej polymerizácie pri 72 °C počas 5 min. Produkty PCR sa analyzovali elektroforeticky v agarózovom géli, farbili etídiumbromidom a vizualizovali v UV svetle [7], pričom sa použil štandard molekulových hmotností n.50 bp (Life Technologies).

Výsledky a diskusia

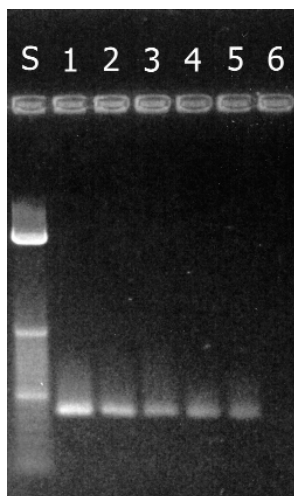
Cieľom práce bolo zaviesť metódu na princípe PCR na dôkaz hovädzej zložky v mäsových výrobkoch.

V prvom kroku sa overila selektivita páru primérov SIM/BEEF špecifického pre hovädzinu. Izolovala sa DNA z najbežnejších druhov mias (hovädzie, bravčové, kuracie) a analyzovala sa použitím PCR, pričom sa získal pozitívny výsledok (amplifikácia fragmentu veľkosti 274 bp) len vo vzorke hovädzieho mäsa. Použitie polymerázy chránenej protilátkou umožnilo získať špecifickú amplifikáciu jediného fragmentu. Aby sa zúžilo riziko falošnej negativity a aby sa zaručilo, že negatívny výsledok v prípade bravčového a kuracieho mäsa je dôsledkom selektivity použitých primérov a nie nízkou kvalitou izolovanej DNA, analyzovali sa uvedené vzorky DNA tiež použitím PCR s primérmí CYTb1/CYTb2 v podmienkach relatívne nízkej selektivity [8]. V tomto prípade sa pozitívny výsledok (amplifikácia fragmentu veľkosti 359 bp) získal pri všetkých vzorkách DNA, čo vylúčilo možnosť falošnej negativity.

V druhom kroku sa stanovil detekčný limit metódy. Pripravili sa homogénne zmesi hovädzieho a bravčového mäsa v definovanom pomere, izolovala sa z nich DNA a analyzovali sa použitím PCR s primérmí SIM/BEEF. Stanovil sa detekčný limit 0,05 % (obr. 1).

V nasledujúcom kroku sa uvedená metóda aplikovala na 15 vzoriek mäsových výrobkov pričom sa na izoláciu DNA, na základe našich predchádzajúcich skúseností, používala metóda Wizard [6]. Výsledky analýz sú uvedené v tab. 2. Vyplýva z nich, že v 6 vzorkách bola prítomná nedeklarovaná hovädzia zložka. V prípade všetkých negatívnych vzoriek bola overená amplifikovateľnosť DNA použitím PCR s primérmí CYTb1/CYTb2, čím sa vylúčila falošná negativita.

Vypracovaná metóda sa ukázala ako vhodná na rýchly, špecifický a citlivý dôkaz hovädzej zložky v mäsových výrobkoch.



OBR. 1. Detekčný limit použitej PCR. Obsah hovädzieho mäsa v zmesi s bravčovým bol 100 % (1), 10 % (2), 1 % (3), 0,1 % (4), 0,05 % (5) a 0 % (6). S - štandard molekulových hmotností n.50 bp (výraznejšie fragmenty 350 bp a 800 bp).

FIG. 1. Detection limit of the PCR used. Contents of beef in mixtures with pork were 100 % (1), 10 % (2), 1 % (3), 0,1 % (4) 0,05 % (5) and 0 % (6). S - molecular size standard n.50 bp (stronger fragments of 350 bp and 800 bp).

TAB. 2. Výsledky analýzy mäsových výrobkov na prítomnosť hovädzej zložky.

TAB. 2. Results of the analysis of meat products for the presence of the beef component.

Mäsový výrobok ¹	Počet vzoriek ²	Deklarácia hovädzej zložky ³	Výsledok PCR ⁴
fašírka ⁵	1	+	+
klobása ⁶	2	-	+
luncheon meat	1	+	+
párky ⁷	2	-	+
paštéta ⁸	4	-	-
saláma mäkká ⁹	1	+	+
	1	-	+
saláma suchá ¹⁰	1	-	-
	1	+	+
	1	-	+

1 - meat product, 2 - number of samples, 3 - declaration of the beef component, 4 - PCR result, 5 - mincemeat, 6 - sausage, 7 - frankfurters, 8 - pâté, 9 - soft salami, 10 - dry salami.

Literatúra

1. SCHWÄGELE, F.: Analytik bei Fleisch. Bewertung immunologischer und gentechnischer Methoden. Fleischwirtschaft, 81, 2001, s. 78-81
2. SUHAJ, M. - KOVÁČ, M.: Metódy identifikácie falšovania a autentifikácie potravín. 3. Mäso a mäsové výrobky. Bulletin potravinárskeho výskumu, 39, 2000, s. 241-254.
3. 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.
4. BENEKE, B. - HAGEN, M.: Eignung der PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion). Tierart-nachweis in erhitzten Fleischerzeugnissen. Fleischwirtschaft, 78, 1998, s. 1016-1019.
5. 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.
6. PIKNOVÁ, L. - ŠTEFANOVIČOVÁ, A. - FARKAŠ, P. - PANGALLO, D. - KUČHTA, T.: Rivelazione di soia in prodotti di carne mediante PCR e analisi degli steroli. Industrie Alimentari, 41, 2002, s. 163-166.
7. MANIATIS, T. - FRITSCH, E. F. - SAMBROOK, J.: Molecular cloning. New York : Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545 s.
8. SZITÁSOVÁ, I. - DRAHOVSKÁ, H. - TURŇA, J.: Distribution of virulence factors and AFLP typing of *Bacillus cereus* food isolates. Biológia, 57, 2002, s. 311-317.

Do redakcie došlo 17.2.2002.

Detection of the beef component in meat products using polymerase chain reaction

PIKNOVÁ, L. - KUČHTA, T.: Bull. potrav. Výsk., 41, 2002, p. 107-111.

SUMMARY. The article deals with a method based upon the polymerase chain reaction (PCR) for the detection of the beef component in meat products. The method involves DNA isolation using the Wizard kit and PCR oriented to a sequence of the mitochondrial gene encoding cytochrome b, as described by Matsunaga et al., Meat Science, 51, 1999, p. 143-148. The specificity of the primers was evaluated analysing samples of the most common meat types. Using model samples containing defined portions of beef and pork, a detection limit of 0.05 % was determined. The optimized method was used to analyse 15 meat products. Positive results were obtained for all samples in which the beef component was declared (4 samples) as well as for 6 samples out of 11 in which the beef component was not declared. The method proved to be suitable for the rapid, specific and sensitive detection of the beef component in meat products.

KEYWORDS: beef; meat; polymerase chain reaction; cytochrome b