

MAŁGORZATA NATONEK-WIŚNIEWSKA, PIOTR KRZYŚCIN

OPRACOWANIE PROSTYCH I SKUTECZNYCH TESTÓW REAL-TIME PCR DO IDENTYFIKACJI KOMPONENTÓW BYDLĘCYCH, WIEPRZOWYCH I OWCZYCH W ŻYWNOŚCI

Streszczenie

Proste, skuteczne i czułe metody identyfikacji gatunkowej komponentów mięsnych w produktach spożywczych są ważnym aspektem produkcji żywności. Są one istotne zarówno dla producentów, jak i konsumentów, którzy są coraz bardziej zainteresowani rzeczywistym składem żywności. W identyfikacji komponentów pochodzenia zwierzęcego w żywności największe znaczenie mają obecnie metody polegające na analizie mtDNA, co wynika ze znacznej trwałości oraz specyficzności gatunkowej tej cząsteczki. Celem pracy było opracowanie prostych i skutecznych testów identyfikacji gatunkowej komponentów bydlęcych, wieprzowych i owczych, przydatnych do analizy żywności. Badaniom poddano próbki mięsa o zawartości [%]: 6, 35, 60, 80 i 100 wołowiny w wieprzowinie, wieprzowiny w wołowinie i baraniny w wieprzowinie. Metoda polega na identyfikacji gatunkowo specyficznych dla bydła, świń i owiec fragmentów genu kodującego COX1 o długościach 68 pz oraz 53 pz. W opracowanych testach granica wykrywalności komponentu wieprzowego wynosiła 0,07 %, bydlęcego – 0,4 % i owczego – 0,5 %. Uzyskane wyniki wskazują na specyficzność gatunkową stosowanych testów. Reaktywność krzyżowa albo nie zachodzi, albo można ją zaobserwować w późnych cyklach reakcji. Metoda ma zastosowanie zarówno do mięsa surowego, jak i jego przetworów, takich jak kielbasa, mielonka, szynka. Metoda nie jest czasochłonna (4 h), natomiast jest powtarzalna (względne odchylenie standardowe w przypadku mięsa surowego wynosi $\leq 1,57$ %) oraz dokładna (błąd pomiaru $\leq 2,33$). W analizach mięsa przetworzonego dokładność pomiaru jest mniejsza, a rozrzut wyników nieznacznie większy, co może wskazywać na konieczność dostosowania krzywej standardowej do próbek badanych pod względem przetworzenia.

Słowa kluczowe: identyfikacja gatunkowa, startery specyficzne gatunkowo, Real-time PCR, COX1 mtDNA

Wprowadzenie

Identyfikacja gatunkowa przetworzonych komponentów artykułów spożywczych lub ich surowych składników wzbudza zainteresowanie producentów żywności i kon-

*Dr M. Natonek-Wiśniewska, dr inż. P. Krzyścin, Dział Cytogenetyki i Genetyki Molekularnej Zwierząt, Instytut Zootechniki - PIB, ul. Krakowska 1, 32-081 Balice.
Kontakt: malgorzata.natonek@izoo.krakow.pl*

sumentów. Potrzeba poznania rzeczywistego składu produktów spożywczych wynika ze zwiększającej się dbałości o jakość żywności i o jej pozytywny wpływ na ludzkie zdrowie. Poszukiwana jest np. informacja o obecności składników alergicznych w produktach żywnościowych, a bywa ona niedostateczna. Ważnym aspektem jest czynnik ekonomiczny, skłaniający niektórych producentów do świadomych zafałszowań, szczególnie do zastępowania mięsa o wyższej wartości rynkowej tańszym, zazwyczaj mniej wartościowym składnikiem. Ponadto wzrasta liczba klientów zainteresowanych oryginalnymi produktami spożywczymi (np. dziczyzną) [10, 17], żywnością egzotyczną (np. owocami morza) [8, 18] lub produktami o określonych walorach żywieniowych. W związku z tym może dochodzić do zafałszowań produktu żywnościowego, czyli podawania nieprawdziwych danych o produkcie na opakowaniu, co ma na celu ukrycie jego rzeczywistego składu [22]. Przepisy unijne zakazują takich praktyk i zapewniają konsumentom prawo do dokonywania świadomych wyborów dotyczących spożywanej przez nich żywności oraz wprowadzają sankcje za działanie wprowadzające konsumenta w błąd [20]. Rozporządzenie UE nr 1169/2011 [19] z dnia 13 grudnia 2014 r. rozszerza zakres odpowiedzialności – sankcje mogą dotyczyć nie tylko producentów, ale i np. właścicieli sklepów internetowych. Zakaz wprowadzania konsumenta w błąd został rozszerzony także o treści reklamowe.

Ustanowione przepisy będą respektowane wtedy, gdy zostaną opracowane skuteczne metody pozwalające na specyficzną kontrolę produktów. Obecnie największe znaczenie dla identyfikacji gatunkowej w produktach pochodzenia zwierzęcego mają metody polegające na analizie mitochondrialnego DNA (mtDNA), co wynika ze znacznej trwałości takiej cząsteczki oraz jej specyficzności gatunkowej. W obrębie sekwencji nukleotydowej można wyodrębnić fragmenty specyficzne dla identyfikowanego gatunku – takie same bez względu na pochodzenie tkanki. Ponadto cząsteczka DNA pozostaje stabilna w zmiennych, niekorzystnych warunkach termiczno-barycznych, co pozwala na identyfikację produktów przechowywanych lub przetworzonych. Wśród metod bazujących na DNA, reakcja łańcuchowa polimerazy – w odmianie klasycznej (PCR) oraz w czasie rzeczywistym (Real-time PCR) – jest najlepiej opracowaną techniką molekularną, umożliwiającą identyfikację gatunkową komponentów, nawet w złożonych i przetworzonych produktach żywnościowych [1, 11, 13, 14]. Podczas doskonalenia metod wykazano przewagę mitochondrialnego DNA nad innymi markerami genetycznymi. W ostatnich latach coraz większe znaczenie zyskuje PCR w czasie rzeczywistym ze względu na dużą czułość testów oraz możliwość określenia składu ilościowego badanego materiału [2, 3, 4].

Celem pracy było opracowanie prostych i skutecznych testów identyfikacji gatunkowej komponentów bydłych, wieprzowych i owczych, które byłyby skuteczne w analizie żywności.

Material i metody badań

Material doświadczalny stanowiły próbki mięsa: wieprzowego (*Sus scrofa*), wołowego (*Bos taurus*) i owczego (*Ovis aries*). Próbki mięsa poszczególnych gatunków pobierano podczas dysekcji doświadczalnych, przeprowadzanych na zwierzętach, utrzymywanych w zasobach Instytutu Zootechniki PIB. Następnie na ich bazie przygotowywano próbki dwugatunkowe przez mieszanie mięsa wołowego z wieprzowym oraz owczego z wieprzowym w takich proporcjach, aby skład próbek był następujący [%]: 6, 35, 50, 60, 80, 100 odpowiednio: wołowiny w wieprzowinie, wieprzowiny w wołowinie, baraniny w wieprzowinie.

Ponadto material doświadczalny stanowiły produkty żywnościowe dostępne w handlu, tj. kielbasy (biała, śląska, krakowska sucha) szynki (konserwowa, pieczona, gotowana), mielonka oraz surowe mięso (wołowe, wieprzowe, owcze). Z surowego mięsa jednogatunkowego tworzone mieszaniny mięsa wołowo-wieprzowego (50 : 50) oraz wieprzowo-owczego (50 : 50).

Odważano próbki mięsa o masie 500 g. Mięso mielono kilkakrotnie w celu homogenizacji, a między kolejnymi homogenizacjami mieszano. Z tak przygotowanego materiału tworzone podpróby o masie 50 g, losowo wybierano porcje homogenizowanego mięsa, a z nich odważano następnie próbki laboratoryjne o masie zgodnej z wymogami izolacji DNA. Urządzenie rozdrabniające było sterylizowane między mieleciem kolejnych próbek (w celu uniknięcia kontaminacji).

DNA otrzymywano przy użyciu zestawu AX Food (A&A Biotechnology). Stosowano metodę izolacji podaną przez producenta, zawieszając DNA w 50 μ l buforu TE (Tris-EDTA). Do pomiaru stężenia DNA używano spektrofotometru Nanodrop (ThermoScientific), określając jednocześnie czystość wyekstrahowanego DNA poprzez pomiar stosunku absorpcji przy $\lambda = 260$ nm i $\lambda = 280$ nm. Ponadto jakość DNA sprawdzano poprzez elektroforezę w 0,8-procentowym żelu agarozowym przy napięciu 80 V przez 50 min.

Wybrane sekwencje genów gatunków: bydło, świnie i owce zaczerpnięto z Gen Banku [7]. Numery akcesyjne sekwencji genów wymienionych gatunków to odpowiednio: NC_006850, NC_012095 i NC_001941. Na podstawie porównania wspomnianych sekwencji między sobą, jak również z sekwencjami kury (NC_001323) i człowieka (NC_012920.1), wybrano regiony wykazujące brak homologii międzygatunkowej w mitochondrialnym genomie (COX1) tych gatunków. Wybrana do badań sekwencja kodująca podjednostkę COX1 jest powszechnie używana do rozróżniania gatunków zwierząt oraz do barkodingu [9, 15]. Do fragmentów tych zaprojektowano startery i sondy TaqMan przy użyciu programu PrimerExpress (Life Technologies) [21]. Sondy wyznakowano barwnikiem reporterowym Vic (sonda bydła) oraz NED (sonda wieprzowa i owcza). W tab. 1. przedstawiono sekwencje starterów i sond oraz wielkość otrzymanego przy ich udziale produktu reakcji PCR. Przeprowadzono teore-

tyczne (przy zastosowaniu oprogramowania FastPCR [12]) i doświadczalne (w reakcji PCR) sprawdzenie zaprojektowanych starterów pod względem ewentualnego równoczesnego powielania DNA zwierząt innych gatunków oraz roślin, stosowanych w postaci składników lub zafałszowań produktów spożywczych (koń, królik, indyk, kaczka, gęś, kot, pies, soja, ryż, kukurydza).

Tabela 1. Startery i sondy specyficzne gatunkowo zaprojektowane dla genu kodującego COX1

Table 1 Primers and species-specific probes designed for gene encoding COX 1

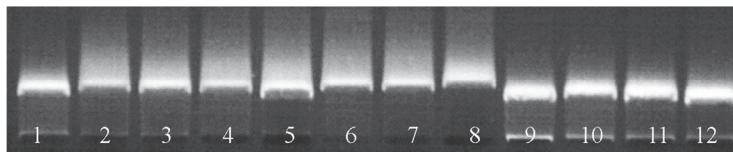
Gatunek Species	Starter/Sonda Primer/Probe	Sekwencja (5'-3') Sequence (5'-3')	Wielkość amplikonu Size of amplicon [pz] / [bp]	Temperatura anilingu Annealing temperature [°C]
Bydło Cattle	Forward	GATGCTTGGGCCGGTATAGTAG	68	60
	Reverse	GGCCTAATTCAGCGCGAAT		
	Sonda/Probe	AACAGCTCTAAGCCTTC		
Świnia Pig	Forward	GACATCGGCACCCTGTACCT	53	60
	Reverse	GCTCAAGGCAGTGCCCACTA		
	Sonda/Probe	CTATTGGTGCCTGAGCAG		
Owca Sheep	Forward	[16]	53	64
	Reverse	[16]		
	Sonda/Probe	TCGGAGGCTTAACTGG		

Przy zastosowaniu wyznaczonych starterów prowadzono reakcje PCR na DNA wyizolowanym z modelowych próbek mięsa [%]: 6, 35, 60, 80 i 100. Reakcje PCR prowadzono w układzie duplex (startery/sondy bydlęce i wieprzowe) oraz monoplex (startery/sonda owcze). Sprawdzono specyficzność reakcji, liniowość oraz granice wykrywalności. Na próbkach modelowych jednogatunkowych oraz 50-procentowych dwugatunkowych sprawdzono powtarzalność wyniku dla niezależnych izolacji (tab. 2) oraz reakcji qPCR wykonanych na tym samym ekstrakcie DNA (tab. 3).

Opracowaną metodę zastosowano do analizy komercyjnych próbek żywności (tab. 4). Do wszystkich reakcji zastosowano krzywe standardowe wyznaczone z modelowych próbek mięsa [%]: 6, 35, 60, 80 i 100.

Wyniki i dyskusja

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono przydatność zestawu Ax Food do izolacji DNA. Otrzymano DNA o stężeniu powyżej 400 ng/μl i o jakości wystarczającej do przeprowadzenia reakcji qPCR. Współczynnik $A_{260/280}$ wszystkich próbek zawierał się w przedziale $1,80 \div 1,92$, a w rozdziale elektroforetycznym DNA migrowało w postaci mocnego prążka. Jednak DNA próbek przetworzonych było nieznacznie zdegradowane (rys. 1).

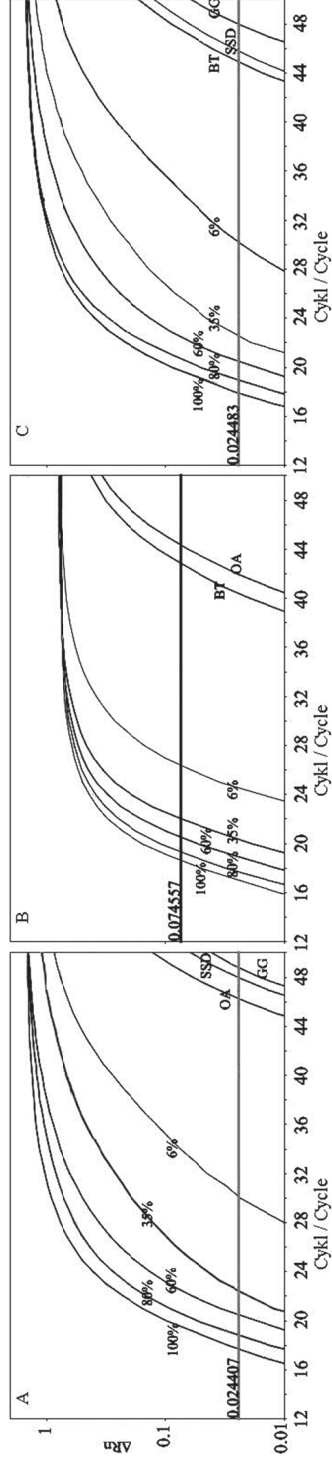


Rys. 1. Rozdział elektroforetyczny DNA w 0,8-procentowym żelu agarozowym. W kolejnych studzienkach przedstawiono DNA wyizolowane z kiełbasy: śląskiej A (1), śląskiej B (2), białej (3), krakowskiej suchej (4); z szynki: konserwowej (5), pieczonej (6), gotowanej (7); z mielonki (8); z mięsa mielonego: wołowego (9), wieprzowego (10), owczego (11) i wołowo-wieprzowego (12)

Fig. 1. Electrophoretic separation of DNA in 0.8 % agarose gel. Subsequent lanes contain DNA isolated from: Śląska sausage A (1); Śląska sausage B (2); white sausage (3); Krakowska dry sausage (4); tinned ham (5); roast ham (6); cooked ham (7); luncheon meat (8); minced bovine meat (9); minced pork meat (10); minced ovine meat (11); and minced bovine and porcine meat (12).

Wykazano, że optymalne ilości starterów oraz sondy to odpowiednio: 300 oraz 150 nmol, natomiast najkorzystniejsza dla każdej reakcji ilość DNA to 50 ng. Przy takim poziomie DNA amplifikacja w zakresie stężeń $6 \div 100$ % zachodziła między 17. a 30. cyklem testu bydlęcego (rys. 2A), 17. a 26. cyklem testu wieprzowego (rys. 2B) oraz między 17. a 30. cyklem – owczego (rys. 2C). W analogicznych testach stosuje się zazwyczaj od 25 ng DNA. W przypadku opracowywanych testów zastosowano jednak większą ilość DNA, aby osiągnąć granice wykrywalności na satysfakcjonującym poziomie. Gdyby użyto mniej DNA, doprowadziłoby to do wzrostu CT (cyklu progowego) i zmniejszenia ilości produktu amplifikacji, co ostatecznie spowodowałoby obniżenie czułości reakcji.

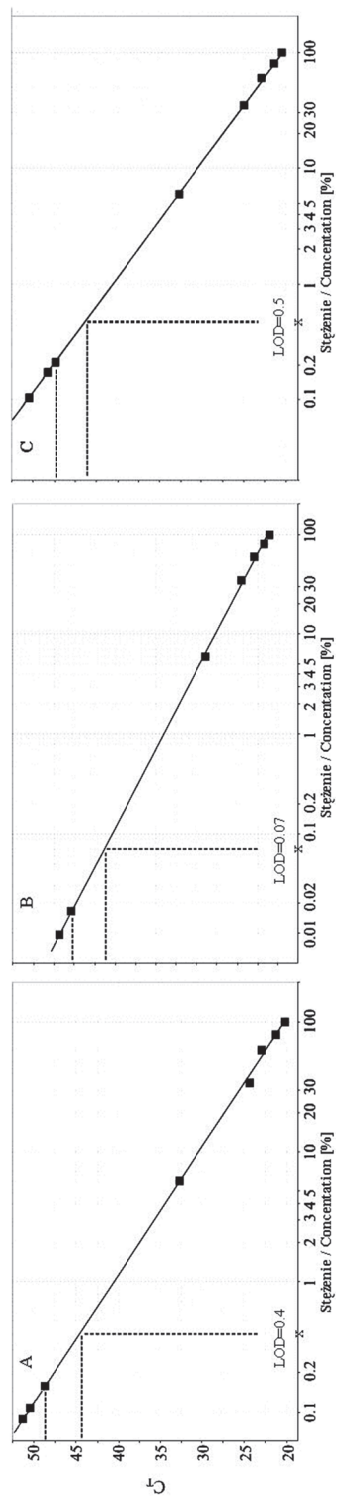
Uzyskane wyniki wskazują na małą reaktywność krzyżową. W przypadku starterów bydlęcych i owczych reaktywność krzyżowa zachodzi od 44 cyklu (rys. 2A i 2C). Z kolei dla starterów wieprzowych reakcja z komponentem kurzym nie zachodzi, a z bydlęcym i owczym przebiega ok. 42 cyklu (rys. 2B). W tym przypadku jednak różnica między reaktywnością próbki 1 % a reakcjami krzyżowymi jest większa niż w pozostałych przypadkach i wynosi 11 cykli (rys. 3). Zależność między log fluorescencji a stężeniem oznaczanego DNA jest liniowa w całym zakresie stężeń (rys. 3). W celu wyznaczenia zakresu stężeń, dla których można stosować metodę „odcięto” wykresy fluorescencji dla 100 % próbek pochodzących z gatunków innych niż docelowe. Zakłada się, że wszystkie wyniki poniżej tych wartości nie są brane pod uwagę. Dla większej wiarygodności wyników otrzymaną granicę przesunięto dodatkowo o 4 cykle. Z krzywej standardowej dla każdego badanego gatunku (rys. 3 A, B, C) odczytano stężenia analizowanego komponentu. Wynosiły one 0,4 % dla bydła, 0,07 % dla świń oraz 0,5 % dla owiec. W ten sposób wyznaczono najmniejszą ilość badanego materiału specyficznego gatunkowo, jaką można realnie zidentyfikować (LOD).



Objasnienia: / Explanatory notes: ΔRn – względna wartość fluorescencji / relative fluorescence value; cykl reakcji qPCR / cycle qPCR reaction; 6 ÷ 100 % udział DNA: bydłęcego w wieprzowym (A), wieprzowego w bydłęcym (B), owczego w wieprzowym (C) / 6 ÷ 100 % of DNA share: of bovine in porcine (A), of porcine in bovine (B), of ovine in porcine (C). Wykres dot. 100 % DNA / Graph refers to 100 % DNA: BT – bydłęcego / of bovine; SSD – wieprzowego / of porcine; OA – owczego / of ovine, GG – kurzego / of chicken

Rys. 2. Wykresy amplifikacji w teście: bydłęcym (A), wieprzowym (B), owczym (C)

Fig. 2. Amplification graphs for bovine (A), porcine (B), and ovine tests (C)



Objaśnienie: / Explanatory note: LOD – granica wykrywalności / limit of detection

Rys. 3. Krzywe standardowe w tęście: bydlęcym (A), wieprzowym (B), owczym (C)
 Fig. 3. Standard curves for bovine (A), porcine (B), and ovine tests (C)

Tabela 2. Wyniki analizy modelowych próbek mięsa z niezależnych izolacji DNA

Table 2. Analysis results of model meat samples fro independent DNA isolations

Rzeczywisty skład Real composition [%]			Powtórzenie izolacji DNA DNA isolation repetition	Zidentyfikowany skład Identified composition [%]			Miary statystyczne Statistical measures		
B	S	O		B	S	O	SD	D	RSD [%]
100	-	-	A	96,70	-	-	2,30	4,94	2,42
			B	92,44	-	-			
			C	92,66	-	-			
			D	96,92	-	-			
			E	96,60	-	-			
-	100	-	A	-	101,1	-	1,80	0,46	1,81
			B	-	97,26	-			
			C	-	98,37	-			
			D	-	101,4	-			
			E	-	99,46	-			
-	-	100	A	-	-	98,25	0,71	1,76	0,72
			B	-	-	99,25			
			C	-	-	98,23			
			D	-	-	97,25			
			E	-	-	98,22			
50	50	-	A	48,26	47,27	-	0,69	2,35	1,46
			B	47,69	48,27	-			
			C	46,53	48,33	-			
			D	47,58	48,22	-			
			E	48,19	47,27	-			
-	50	50	A	-	46,22	47,66	1,11	2,10	2,31
			B	-	48,22	48,33			
			C	-	47,59	47,16			
			D	-	49,24	49,27			
			E	-	48,22	46,27			

Objaśnienia: / Explanatory notes:

B – mięso z bydła / meat from cattle; S – mięso ze świń / meat from pig; O – mięso z owiec / meat from sheep; SD – odchylenie standardowe / standard deviation; D – błąd bezwzględny / absolute error; RSD – względne odchylenie standardowe / relative standard deviation.

Granice wykrywalności uznano za wystarczającą do komercyjnego zastosowania opracowanych testów, pomimo że analogiczne metody opracowane w innych laboratoriach cechują się granicą wykrywalności od 0,1 % [3, 5]. Na korzyść LOD uzyskanego w badaniach własnych przemawia to, że poprzez wykorzystywanie reakcji duplex generuje niższe koszty od reakcji multiplexowych wykorzystywanych do analizy zafałszowań wołowiny wieprzowiną [5, 13].

Zaobserwowano powtarzalność wyników w przypadku niezależnych izolacji tej samej próbki (tab. 2) – odchylenie standardowe nie większe niż 2,3 (RSD = 2,42 %). Większość otrzymanych wyników jest nieznacznie zaniżona, gdyż wartości średnie zidentyfikowanego składu plasują się poniżej wartości rzeczywistych, różnice są jed-

nak niewielkie – błąd bezwzględny $\leq 4,94$. Podobnie wyniki otrzymane w niezależnych powtórzeniach reakcji qPCR również są powtarzalne (RSD $\leq 3,18$ %) oraz niewiele odbiegają od składu rzeczywistego $D \leq 3,7$ (tab. 3).

Tabela 3. Wyniki analizy modelowych próbek mięsa z pięciu niezależnych reakcji qPCR
Table 3. Analysis results of model meat samples from five independent qPCR reactions

Skład rzeczywisty Real composition [%]			Zidentyfikowany średni skład Identi- fied mean composi- tion [%]			Miary statystyczne Statistical measures					
B	S	O	B	S	O	SD	D	RSD [%]	SD	D	RSD [%]
100	-	-	96,30	-	-	B 1,03	B 3,70	B 1,07	-	-	-
-	100	-	-	98,87	-	S 0,93	S 1,13	S 0,94	-	-	-
-	-	100	-	-	97,74	O 0,96	O 2,26	O 0,98	-	-	-
50	50	-	47,95	47,06	-	B 0,43	B 2,05	B 0,86	S 1,13	S 2,94	S 2,40
-	50	50	-	47,07	47,10	S 1,16	S 2,93	S 2,46	O 1,50	O 2,90	O 3,18

Objaśnienia jak pod tab. 2. / Explanatory notes as in Tab. 2.

Zastosowanie omawianego testu do badania żywności wskazuje na podobne prawidłowości, jak w badaniach modelowych w przypadku materiału surowego ($D \leq 2,33$, RSD $\leq 7,52$ %). Natomiast wyniki dotyczące materiału przetworzonego są powtarzalne (w przypadku dużego udziału mięsa identyfikowanego gatunku – RSD $\leq 5,39$ %, podobnie w przypadku małego udziału – RSD $\leq 11,93$ %), lecz dokładność pomiaru jest mniejsza (tab. 4). W przypadku kielbasy D wynosi 6,94, a mielonki – nawet 17,9. Jeśli założy się, że skład podany przez producenta jest zgodny z rzeczywistym, to przyczyną różnic w wartościach metody może być zastosowanie krzywej standardowej wykonanej na podstawie oznaczeń w surowym mięsie, które zawierało DNA o wyższej jakości. Możliwe, że zastosowanie krzywej standardowej wyznaczonej z próbek przetworzonych umożliwiłoby otrzymywanie wyników o większej dokładności.

Uzyskane wyniki wskazują na wysoką przydatność opracowanych testów do analizowania żywności surowej oraz poddanej obróbce termiczno-barycznej. Proponowane startery wytwarzają amplikony o niewielkiej długości. Wielkość amplikonów ma ogromne znaczenie w przypadku identyfikacji próbek przetworzonych, w której DNA może być zdegradowane do odcinków poniżej 100 pz. [16]. W takim przypadku test wykorzystujący małe fragmenty sprawdza się bardzo dobrze [17, 18], co zostało potwierdzone również w przedstawionej metodzie. PCR z użyciem starterów specyficznych jest jedną z najczęściej stosowanych metod identyfikacji gatunkowej, ponieważ

zapewnia szybkość, specyficzność i wysoką czułość badań. W przypadku przetworzonych i wielogatunkowych produktów żywnościowych, PCR z użyciem specyficznych starterów stanowi skuteczne narzędzie do identyfikacji gatunków [10, 14].

Tabela 4. Wyniki analizy próbek komercyjnych z trzech niezależnych reakcji qPCR
Table 4. Analysis results of commercial samples from three independent qPCR reactions

Rodzaj próbki Type of sample	Skład podany przez producenta Composition declared by producer [%]		Zidentyfikowany średni skład Identified mean composition [%]		Miary statystyczne Statistical measures					
	B	S	B	S	SD	D	RSD [%]	SD	D	RSD [%]
Kielbasa biała White sausage	-	91	-	84,06	S 4,53	S 6,94	S 5,39	-	-	-
Kielbasa śląska A Śląska sausage A	-	94	-	87,05	S 2,25	S 6,95	S 2,58	-	-	-
Kielbasa śląska B Śląska sausage B	9	78	8,13	69,67	B 0,97	B 0,87	B 11,93	S 5,32	S 8,33	S 7,63
Krakowska sucha Krakowska dry sausage	5	85	3,61	85,74	B 0,27	B 1,39	B 7,42	S 4,27	S 0,74	S 4,98
Mielonka wieprzowa Luncheon meat pork	-	94	-	76,10	S 4,27	S 17,9	S 5,61	-	-	-
Szynka konserwowa Canned ham	-	58	-	52,04	S 3,27	S 5,96	S 6,28	-	-	-
Szynka pieczona Roasted ham	-	80	-	85,76	S 4,30	S 5,76	S 5,01	-	-	-
Szynka gotowana Cooked ham	-	90	-	84,90	S 3,59	S 5,10	S 4,22	-	-	-
Mięso mielone Minced meat	100	-	97,78	-	B 0,52	B 2,22	B 0,53	-	-	-
Mięso mielone Minced meat	-	100	-	97,67	S 0,57	S 2,33	S 0,58	-	-	-
Mięso mielone Minced meat	50	50	47,7	48,44	B 0,75	B 2,30	B 1,57	S 0,51	S 1,56	S 1,05

Objaśnienia jak pod tab. 2. / Explanatory notes as in Tab. 2.

Wnioski

1. Mitochondrialna sekwencja kodująca podjednostkę I genu oksydazy cytochromowej (COX1) jest przydatna do rozróżniania gatunków zwierząt w próbkach mięsa.

2. Opracowane testy pozwalają na określenie przynależności gatunkowej składników zwierzęcych w żywności surowej oraz przetworzonej.
3. Do poprawnego zidentyfikowania składu żywności krzywa standardowa powinna być sporządzana na podstawie oznaczeń w materiale podobnym do próbek badanych.
4. Metoda identyfikacji gatunkowej żywności przy zastosowaniu reakcji Real-Time jest powtarzalna i dokładna

Literatura

- [1] Ballin N., Vogensen F., Karlsson A.: Species determination – Can we detect and quantify meat adulteration? *Meat Sci.*, 2009, **2 (83)**, 165-174.
- [2] Camma C., Domenico D., Monaco F.: Development and validation of fast Real-time PCR assays for species identification in raw and cooked meat mixtures. *Food Control*, 2012, **23**, 400-404.
- [3] Cawthraw S., Saunders G.C., Martin T.C., Sawyer J., Windl O., Reaney S.: Real-Time PCR detection and identification of prohibited mammalian and avian material in animal feeds. *J. Food Prot.*, 2009, **72**, 1055-1062.
- [4] Che Man Y.B., Aida A.A., Raha A.R., Son R.: Identification of pork derivatives in food products by species-specific polymerase chain reaction (PCR) for halal verification. *Food Control*, 2007, **18**, 885-889.
- [5] Fumière O., Dubois M., Baeten V., von Holst Ch., Berben G.: Effective PCR detection of animal species in highly processed animal byproducts and compound feeds. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, **385**, 1045-1054.
- [6] Frezza D., Giambra V., Chegdani F., Fontana C., Maccabiani G., Losio N., Faggionato E., Chiappini D., Vaccari G., von Holst Ch., Lanni L., Saccares S., Ajmone-Marsan P.: Standard and light-cycler PCR methods for animal DNA species detection in animal feedstuffs. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 2008, **9**, 18-23.
- [7] Genomes [online]. National Center for Biotechnology Information GenBank Dostęp w Internecie [20.09.2014]: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/submit_types
- [8] Griffiths A., Sotelo C, Mendes R, Pérez-Martín R.: Current methods for seafood authenticity testing in Europe: Is there a need for harmonisation? *Food Control*, 2014, **45**, 95-100.
- [9] Guardone L., Deplazes P., Macchioni F., Magi M., Mathis A.: Ribosomal and mitochondrial DNA analysis of Trichuridae nematodes of carnivores and small mammals. *Veterinary Parasitology*, 2013, **197**, 364-369.
- [10] Fajardo V., González I., López-Calleja I., Martín I., Hernández P.E., Garcia T.: PCR-RFLP authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), and goat (*Capra hircus*). *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 1144-1150.
- [11] Fumière O., Veys P., Boix A., von Holst Ch., Baeten V., Berben G.: Methods of detection, species identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. *Biotechnol., Agron., Soc. Envir.*, 2009, **13**, 57-68.
- [12] Kalendar R., Lee D., Schulman A.: Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *Genomics*, 2011, **98**, 137-144.
- [13] Kesmen Z., Gulluce A., Sahin F., Yetim H.: Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay. *Meat Sci.*, 2009, **4 (82)**, 444-449.

- [14] Mafra I., Ferreira I., Oliveira B.: Food authentication by PCR-based methods. *Eur. Food Res. Technol.*, 2008, **227**, 649-665.
- [15] Mirek Z., Bieniek W., Sztorc A.: Barkoding DNA – nowe narzędzie do opisu bioróżnorodności. *Wiadomości Botaniczne*, 2007, **51**, 41-50.
- [16] Natonek-Wiśniewska M., Krzyścin P., Piestrzyńska-Kajtoch A.: The species identification of bovine, porcine, ovine and chicken components in animal meals, feeds and their ingredients, based on COX I analysis and ribosomal DNA sequences. *Food Control*, 2013, **34**, 69-78.
- [17] Natonek-Wiśniewska M., Słota E., Kalisz B.: Use of cytochrome b polymorphism for species identification of biological material derived from cattle, sheep, goats, roe deer and red deer. *Folia Biologica*, 2010, **58**, 46-50.
- [18] Rasmussen R., Morrissey M.: DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2008, **7**, 280-295.
- [19] Rozporządzenie (UE) nr 1169/2011 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 13 grudnia 2011 r. w sprawie przekazywania konsumentom informacji na temat żywności.
- [20] Rozporządzenie (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 r. ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności Dz. Urz. UE z późn. zm.- 596/2009 z dnia 18 czerwca 2009).
- [21] Primer Express® Software v3.0. Simple Primer and Probe Design for Real-Time PCR Applications.
- [22] Ustawa z dnia 15 września 2005 r. o jakości handlowej artykułów rolno-spożywczych. Dz. U. 2005 r. Nr 187, poz. 1577 (z późn. zm).

DEVELOPMENT OF EASY AND EFFECTIVE REAL-TIME PCR TESTS TO IDENTIFY BOVINE, PORCINE, AND OVINE COMPONENTS IN FOOD

Summary

Simple, effective, and sensitive methods to species identify meat components in food products are an important aspect in the production of food production. They are essential for both the manufacturers and the consumers, who are more and more interested in the actual composition of foods. At present, among the most important methods to identify components of animal origin in food are those based on an mtDNA analysis owing to the considerable stability and species-specificity of that molecule. The objective of the research study was to develop simple and efficient tests for species identification of bovine, porcine, and ovine components, which would be useful for the analysis of food. The analysis covered samples of meat containing 6 %, 35 %, 60 %, 80 %, and 100 % of beef in pork, pork in beef, and mutton in pork. The method is based on the identification of cattle, pigs, and sheep species-specific fragments of the gene encoding COX1 with 68 and 53 bp. For the tests being developed, the limit of detection was 0.07 % as for the porcine component, 0.4 % as for the bovine component, and 0.5 % as for the ovine component. The results obtained show the species specificity of the tests applied. The cross reactivity does not occur or it can be found in the late cycles of reaction. This method may be applied to raw meat and to its products, such as sausages, luncheon meat, ham. The method is not time-consuming (4 hours); it is repeatable (relative standard deviation for raw meat ≤ 1.57 %) and accurate (measurement error ≤ 2.33 %). As for the analysis of the processed meat, the accuracy of measurement is lower, and the relative dispersion of results is slightly higher; this might indicate the need to adjust the standard curve to the samples the processing of which is to be analyzed.

Key words: identification of species, species-specific primers, real-time PCR, COX1, mtDNA 