

MODYFIKACJA METODY IDENTYFIKACJI GATUNKOWEJ PSÓW, BYDŁA, ŚWIŃ, KUR I OWIEC WYKORZYSTYWANEJ DO ANALIZY NIESTANDARDOWYCH PRÓBEK*

Małgorzata Natonek-Wiśniewska, Piotr Krzyścin

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Dział Cytogenetyki i Genetyki Molekularnej
Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa

Identyfikacja gatunkowa jest rutynową analizą stosowaną obecnie w wielu laboratoriach. Badania te na ogół dotyczą wykrywania komponentów pochodzących od zwierząt hodowlanych w próbkach komercyjnych, ale coraz częściej poświęca się uwagę analizie gatunkowej zwierząt domowych i materiału niestandardowego. Celowe zatem stało się dostosowanie metod identyfikacji gatunkowej komponentów pochodzących od psa, bydła, świń, kur i owiec do badań w nietypowym materiale, jak mielonka indyjska, smalec oraz reszki paszy pobrane ze ściółki w kurniku. Do analizy komponentów bydłęcych, wieprzowych, kurzych oraz owczych użyto fragmentu genu mtDNA kodującego ATPase 6-8, natomiast do identyfikacji komponentów pochodzących od psa wybrano fragment d-loop. Opracowana metoda identyfikacji gatunkowej psa pozwala w szybki i jednoznaczny sposób określić potencjalną zawartość komponentów pochodzących od tego gatunku. Z przeprowadzonych reakcji krzyżowych wynika, że wykorzystane startery były specyficzne gatunkowo, a otrzymany produkt PCR miał wielkość 163pz. Jest to na tyle krótki produkt reakcji, że pozwala na analizę w materiale wysoko przetworzonym. Wszystkie przedstawione metody pozwalają na skuteczne ich wykorzystanie do identyfikacji komponentów znajdujących się w resztkach paszy pobranej ze ściółki w kurniku, mięsie mielonym oraz smalcu. Zastosowanie odpowiednich metod izolacji DNA pozwoliło na efektywną analizę składu gatunkowego badanego materiału, a wybranie optymalnej metody dla każdego rodzaju materiału stwarza możliwość rutynowej analizy podobnych próbek w przyszłości.

Praktyczne zastosowanie identyfikacji gatunkowej ptaków i ssaków dotyczy tkanek surowych oraz przetworzonych, np. do postaci produktów spożywczych. W przemyśle spożywczym na producentów nałożony jest obowiązek informowania o używanych komponentach i składzie przetworów. Przepisy te są jednak często łamane poprzez zastępowanie droższych surowców tańszymi o gorszych właściwościach lub łatwiej dostępnymi, albo wręcz zakazanymi.

Badania analizy gatunkowej najczęściej dotyczą identyfikacji fragmentów tkanek zwierząt hodowlanych w próbkach komercyjnych typu mieszanka paszowa czy karma

*Praca finansowana z działalności statutowej Instytutu Zootechniki PIB, temat nr 04-1.03.1.

dla zwierząt. Wykrywanie komponentów pochodzących od zwierząt domowych lub identyfikacja w materiale nietypowym bywają natomiast rzadziej przedmiotem badań naukowców, choć jest to zagadnienie bardzo ważne i coraz szerzej wykorzystywane w praktyce do analizy wypadków drogowych z udziałem zwierząt, czy w przypadku nielegalnego uzyskiwania produktów spożywczych, np. psiego smalcu.

Szerokie zastosowanie mitochondrialnego DNA (mtDNA) jako markera specyficznej identyfikacji gatunkowej zwierząt wynika z jego dużego zróżnicowania wśród kręgowców oraz występowania w wielu milionach egzemplarzy w każdej komórce. Badania można prowadzić pośrednio identyfikując wcześniej gromadę, do której należy zwierzę którego tkanki są przedmiotem badań (Mahajan i in., 2010; Wang i in., 2010) lub bezpośrednio określać przynależność gatunkową (Nakaki i in., 2007). Najczęściej do badań używa się fragmentu mtDNA kodującego ATPase6-8, d-loop, 12S-rRNA lub cytochrom b (Tobbe i Linacre, 2010).

Celem pracy było dostosowanie metod identyfikacji gatunkowej komponentów pochodzących od psa, bydła, świń, kur i owiec do badań w nietypowym materiale, jak mielonka indycza, smalec oraz resztki paszy pobrane ze ściółki w kurniku.

Material i metody

Materiałem badawczym były resztki paszy pobrane ze ściółki w kurniku (MŚ), mielonka indycza oraz smalec. Wszystkie próbki były przedmiotem ekspertyz. Resztki paszy pobrane ze ściółki w kurniku oraz mielonka były analizowane pod względem komponentów bydłowych, wieprzowych, kurzych i owczych. W smalcu natomiast oznaczano obecność komponentów pochodzących od psa.

Jako kontrolę pozytywną izolacji użyto mieszanek paszową zawierającą mączkę mięsną, natomiast jako kontrolę negatywną izolacji mieszanek bez dodatku mączki. Ponadto, zastosowano kontrole pozytywne reakcji PCR w postaci DNA wyizolowanego z tkanki wieprzowej, owczej i kurzej.

Do opracowania metody identyfikacji komponentu pochodzącego od psa zastosowano DNA kontrolne, czyli wyizolowane z tkanek psich, kocich, bydłowych, wieprzowych, owczych, końskich, gęsi, indyckich, kurzych, kozich oraz pochodzących od jelenia.

Pierwszą częścią analizy było dostosowanie metody izolacji do materiału wyjściowego. Dla próbek mięsa zastosowano zestaw Wizard (Promega), dla próbki MŚ zastosowano zestaw AX Food (A&A Biotechnology) przeznaczony do izolacji DNA z żywności, natomiast do próbek smalcu zastosowano zestawy AX Food oraz Sherlock (A&A Biotechnology) mający zastosowanie do mikrośladów.

Wyizolowane DNA było powielone w reakcji PCR. Do analizy komponentów bydłowych, wieprzowych, kurzych oraz owczych użyto metodę opartą na identyfikacji fragmentu genu kodującego ATPase 6-8 (Natonek-Wiśniewska, 2008; Lahiff i in., 2002). Do identyfikacji komponentów pochodzących od psa wybrano fragment sekwencji locus d-loop w genomie mtDNA psa (*NC_002008*). Wcześniej, do wspomnianego fragmentu zaprojektowano startery używając programu Primer3 (Rozen i Skaletsky, 1998), a następnie przeanalizowano ich specyficzność gatunkową *in-sili-*

co oraz doświadczalnie przeprowadzając reakcje krzyżowe z DNA pochodzącym od bydła, świni, owcy, kury, jelenia, kota, konia, gęsi, indyka i kozy.

Otrzymane startery (c.f.- dloop) miały postać:

F: 5'-cgctcgtcattaatggtttg

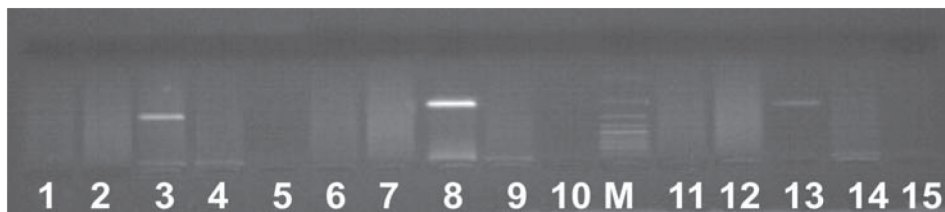
R: 5'-gtttctcggagcatggtgat

Temperaturę przyłączania starterów ustalono na 62°C, a optymalny skład mieszaniny reakcyjnej miał postać: 1 x Bufor; dNTPmix – 0,8 mM; polimeraza AmpliTaq Gold – 1,25U; MgCl₂ – 1 mM, każdego startera – 0,4 pmol/μl. Opracowaną metodę zastosowano w wykonywanej ekspertyzie.

Otrzymane produkty PCR był analizowane i identyfikowane metodą elektroforezy poziomej) w 3% żelu agarozowym przy zastosowaniu markera wielkości DNA. Różnica wielkości pomiędzy poszczególnymi prążkami w zastosowanych markerach wielkości wynosiła 100 pz (fot. 1, 2, 3, 5) oraz 25 pz (fot. 4).

Wyniki

DNA izolowano w dwóch powtórzeniach, a do dalszej analizy wybrano preparat o lepszej czystości oraz stężeniu DNA. Izolacja z mięsa mielonego i MŚ dały bardzo czyste preparaty A260/280≈1,8 o stężeniu około 100 ng/ul. Inaczej przedstawiała się izolacja DNA z próbek smalcu. Spektrofotometryczny pomiar DNA wykazał zanieczyszczenie otrzymanych próbek białkami – A260/280 dla izolacji AX Food wynosiła 1,3, natomiast dla zestawu Sherlock 1,55. Stężenie DNA uzyskanego przy wykorzystaniu zestawu AX Food wynosiło 44 ng/ul, natomiast użycie zestawu Sherlock pozwoliło otrzymać DNA o stężeniu 100 ng/ul.



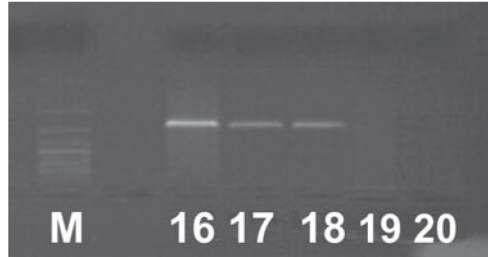
Fot. 1. Analiza resztek paszy pobranej ze ściółki w kurniku na obecność komponentu bydlęcego, wieprzowego i owczego

Fig. 1. Analysis of material collected from poultry house litter for bovine, porcine and ovine components

Obraz elektroforezy produktów reakcji PCR W studzienkach 1–5 znajduje się wynik produktów reakcji PCR między starterami bydlęcymi, a DNA wyizolowanym z badanych próbek (1, 2), bydlęcej mączki mięsnej (3), mieszanki niezawierającej dodatku mączki (4), wody (5). W studzienkach 6–10 znajduje się wynik reakcji PCR między starterami wieprzowymi, a DNA wyizolowanym z badanych próbek (6, 7), tkanki wieprzowej (8), mieszanki niezawierającej dodatku mączki (9), wody (10). W studzienkach 11–15 znajduje się wynik produktów reakcji PCR między starterami owczymi, a DNA wyizolowanym z badanych próbek (11, 12), tkanki owczej (13), mieszanki niezawierającej dodatku mączki (14), wody (15). M-marker wielkości DNA (100 bp DNA Ladders).

Wynik identyfikacji komponentu bydlęcego, owczego, wieprzowego i kurzego w próbkach MŚ przedstawiają fotografie 1 i 2. Przeprowadzona analiza wykazała obecność komponentu kurzego w badanych próbkach (fot. 2, studzienki 17–18), nato-

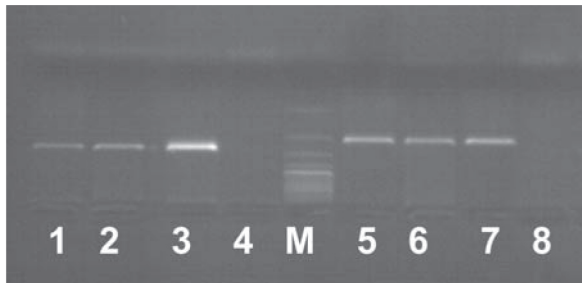
miast zaprzeczyła obecności komponentów bydłych, wieprzowych oraz owczych. Kontrole negatywne izolacji oraz PCRu nie dały produktu reakcji, natomiast wszystkie kontrole pozytywne dały produkt reakcji o odpowiedniej długości. Kontrola pozytywna PCR dla bydła dała produkt reakcji PCR o długości 271 pz, dla kur produkt 266 pz, dla owiec 226 pz, a dla świń 212 pz.



Fot. 2. Analiza resztek paszy pobranej ze ściółki w kurniku na obecność w niej komponentu drobiowego
Fig. 2. Analysis of material collected from poultry house litter for poultry components

Obraz elektroforezy produktów reakcji PCR. W studzienkach 16–20 znajduje się wynik reakcji PCR między starterami kurzymi, a DNA wyizolowanym z tkanki kurzej (16), badanych próbek (17, 18), mieszanki niezawierającej dodatku mączki (19), wody (20). M-marker wielkości DNA (100 bp DNA Ladders).

Analizowana mielonka indyjska jest przykładem fałszowania składu produktu – oprócz składnika indyjskiego zadeklarowanego przez producenta, mielonka zawierała dodatkowo komponent wołowy i wieprzowy. W wyniku powielania w reakcji PCR roztworu DNA starterami charakterystycznymi dla bydła otrzymano produkt o wielkości 271 pz (fot. 3, studzienki 1 i 2). Analogiczna reakcja PCR ze starterami wieprzowymi dała produkt o wielkości 212 pz (fot. 3, studzienki 5 i 6).



Fot. 3. Analiza mielonki indyjskiej na obecność w niej komponentu bydłego i wieprzowego
Fig. 3. Analysis of turkey meat for bovine and porcine components

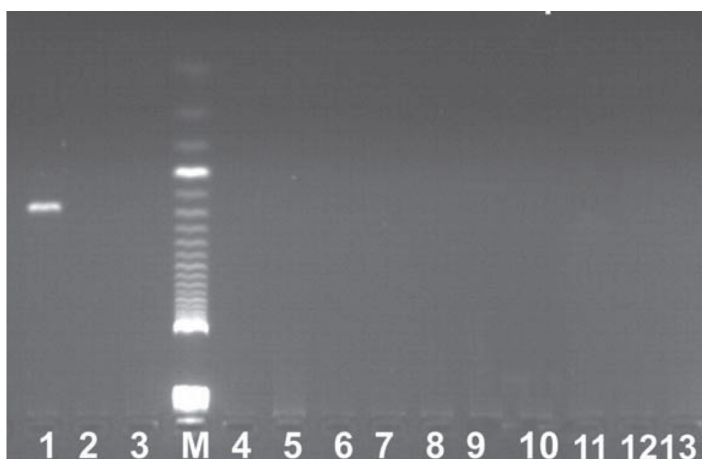
Obraz elektroforezy produktów reakcji PCR. W studzienkach 1–4 znajduje się wynik reakcji PCR między starterami bydłymi, a DNA wyizolowanym z mielonki (1 i 2), tkanki bydłej (3), wody (4). W studzienkach 5–8 znajduje się wynik reakcji PCR między starterami wieprzowymi, a DNA wyizolowanym z mielonki (5 i 6), tkanki wieprzowej (7) i wody (8). M-marker wielkości DNA (100 bp DNA Ladders).

Identyfikacja gatunkowa smalcu została poprzedzona opracowaniem metody pozwalającej na identyfikację gatunkową psa. Wynik przeprowadzonych *in-silico* reakcji krzyżowych badanych starterów z DNA innych gatunków (najczęściej będących przedmiotem analizy) przedstawia tabela 1. Doświadczalną analizę specyficzności starterów *c.f-dloop* przedstawia fotografia 4 (fot. 4). Produkt reakcji PCR o wielkości

163 pz uzyskano jedynie dla DNA wyizolowanego z tkanki psa. DNA pochodzące od pozostałych gatunków nie dało produktu reakcji.

Tabela 1. Specyficzność starterów proponowanych do gatunkowej identyfikacji DNA pochodzącego od psa
Table 1. Specificity of primers proposed for species identification of DNA from dog

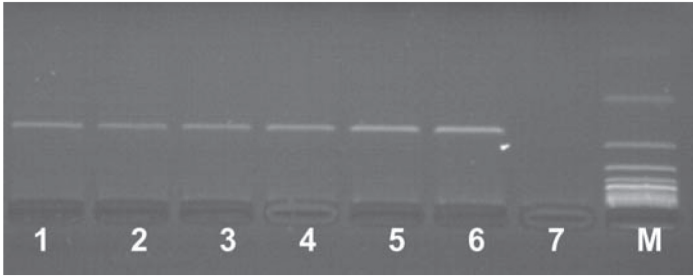
| Analizowany gatunek Analysed species | Forward | Rewers Reverse |
|---|---------|-------------------|
| Człowiek Human | – | – |
| Bydło Cattle | – | – |
| Świnia Pig | – | – |
| Owca Sheep | – | – |
| Kura Chicken | – | – |
| Gęś Goose | – | – |
| Indyk Turkey | – | – |
| Koń Horse | 76% | – |
| Jeleń Red deer | – | 88% |
| Kot Cat | – | – |
| Koza Goat | – | – |



Fot. 4. Analiza specyficzności gatunkowej starterów c.f- dloop

Fig. 4. Analysis of species specificity of the c.f- dloop primers

Obraz elektroforezy produktów reakcji PCR. W studzienkach 1–12 znajduje się wynik reakcji PCR między starterami c.f- dloop, a DNA wyizolowanym z tkanek pochodzących od psa (1), bydła (2), świni (3), owcy (4), kury (5), jelenia (6), kozy (7), gęsi (8), indyka (9), konia (10), kota (11) i człowieka (12). Kontrola negatywna PCR (13). M-marker wielkości DNA (25 bp DNA Ladders).



Fot. 5. Analiza smalcu w kierunku identyfikacji w nim komponentów pochodzących od psa
 Fig. 5. Analysis of lard for identification of canine components

Obraz elektroforezy produktów reakcji PCR dla komponentu pochodzącego od psa. W studzienkach znajduje się wynik reakcji PCR, w której matrycą było DNA izolowane z badanej próbki kolejno zestawem AX Food (1, 2), Sherlock (3, 4), DNA z próbek kontrolnych dla psa (5 i 6). W studzience 7 była kontrola negatywna PCR-u. M-marker wielkości DNA (100 bp DNA Ladders).

Tak opracowaną metodę wykorzystano do identyfikacji gatunkowej smalcu (Fot. 5). O obecności komponentu pochodzącego od psa świadczy produkt PCR o długości 163 pz dla izolacji zarówno zestawem AX Food (studzienki 1, 2), jak również Sherlock (studzienki 3, 4). Pomimo złych parametrów charakteryzujących jakość wyizolowanego DNA, z obu izolacji udało się otrzymać pozytywny wynik reakcji wskazujący na obecność w nim komponentu pochodzącego od psa.

Omówienie wyników

Równoległe z izolacją DNA z resztek paszy pobranych ze ściółki w kurniku zastosowano kontrolę pozytywną oraz negatywną izolacji. Kontrolę pozytywną stanowiła mieszanka paszowa zawierająca znany dodatek mączki, natomiast kontrolę negatywną mieszanka bez dodatku mączki. Otrzymanie z analizy kontroli wyników zgodnych z oczekiwaniami stanowi potwierdzenie poprawnego wykonania analizy, a tym samym podnosi wiarygodność analiz.

Opracowane metody identyfikacji gatunkowej DNA znajdują skuteczne zastosowanie w analizie materiałów nietypowych, takich jak mielonka, resztki paszy pobrane ze ściółki w kurniku, czy psi smalec pozyskiwany na drodze przestępstwa i wykorzystywany w medycynie ludowej.

Przedstawione wyniki izolacji DNA ze smalcu pozwalają zauważyć, że zastosowane metody są skuteczne do analizy tłuszczu, a otrzymanie DNA gorszej jakości nie wyklucza pozytywnego wyniku analizy. Jest to efektem zastosowania do analizy DNA mitochondrialnego. Duża ilość kopii w każdej komórce oraz trwałość mtDNA pozwala bowiem na badanie materiału genetycznie trudnego ze względu na śladowe ilości w próbce czy degradację spowodowaną obróbką termiczną podczas produkcji.

Do analizy gatunkowej tkanek pochodzących od psa najczęściej wykorzystuje się fragment kodujący cytochromu b, 12s-RNA lub d-loop. Przy analizie polimorfizmu

cytochromu B wykorzystuje się jedną parę starterów, a ostateczną detekcję gatunkową otrzymuje się przy zastosowaniu enzymów restrykcyjnych (Bravi i in., 2004; Nakaki i in., 2007). Fragmentu kodującego 12S-rRNA można natomiast użyć do bezpośredniej identyfikacji komponentów pochodzących od psa (Martin i in., 2007). Z danych literaturowych wynika, że otrzymane produkty reakcji PCR mają wielkość około 400 pz w przypadku analizy fragmentu mtDNA kodującego cytochrom b lub 12S-rRNA (Wang i in., 2010; Nakaki i in., 2007), natomiast dla analizy wykorzystującej polimorfizm fragmentu d-loop otrzymany produkt ma wielkość 213 pz (Gao i in., 2004). Przedstawiana w pracy metoda daje produkt PCR o wielkości 163 pz. Jest on krótki, przez co skuteczny do analizy materiału przetworzonego. Przeprowadzony wynik reakcji krzyżowych starterów wskazuje na ich specyficzność gatunkową. Metoda ta pozwala w szybki i jednoznaczny sposób określić potencjalną zawartość komponentów pochodzących od gatunku *Canis familiaris*.

Opracowane metody znajdują praktyczne zastosowanie do identyfikacji gatunkowej i mogą być w przyszłości wykorzystywane do podobnych badań.

Piśmiennictwo

- Bravi C., Lirón J., Mirol P., Ripoli M., Peral-García P., Giovambattista G. (2004). A simple method for domestic animal identification in Argentina using PCR-RFLP analysis of cytochrome b gene. *Leg. Med. (Tokyo)*, 6 (4): 246–251.
- Gao H., Liang C., Zhang Y., Zhu L. (2004). Polymerase chain reaction method to detect canis materials by amplification of species-specific DNA fragment. *J. AOAC Int.*, 87 (5): 1195–1199.
- Lahiff S., Glennon M., Lyng J., Smith T., Shilton N., Maher M. (2002). Real-time polymerase chain reaction detection of bovine DNA in meat and bone meal samples. *J. Food Prot.*, 65 (7): 1158–1165.
- Mahajan M., Gadekar Y., Dighe V., Kokane R., Bannaliker A. (2010). Molecular detection of meat animal species targeting MT 12S rRNA gene. *Meat Sci.*, 88 (1): 23–27.
- Martín I., García T., Fajardo V., Rojas M., Hernández P., González I., Martín R. (2007). Technical Note: Detection of cat, dog, and rat or mouse tissues in food and animal feed using species-specific polymerase chain reaction. *J. Anim. Sci.*, 85: 2734–2739.
- Nakaki S., Hino D., Miyoshi M., Nakayama M., Moriyoshi H., Morikawa T., Itohara K. (2007). Study of animal species (human, dog and cat) identification using a multiplex single-base primer extension reaction in the cytochrome b gene. *Forensic Sci. Int.*, 173 (2–3): 97–102.
- Natonek-Wiśniewska M. (2008). Validation of a method for identification of bovine meat-and-bone meal using PCR. *Ann. Anim. Sci.*, 8, 4: 323–328.
- Rozen S., Skaletsky H. (1998). Primer3. http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html.
- Tobe S., Linacre A. (2010). DNA typing in wildlife crime: recent developments in species identification. *Forensic Sci. Med. Pathol.*, 6 (3): 195–206.
- Wang Q., Zhang X., Zhang H.Y., Zhang J., Chen G.Q., Zhao D.H., Ma H.P., Liao W.J. (2010). Identification of 12 animal species meat by T-RFLP on the 12S rRNA gene. *Meat Sci.*, 5 (2): 265–269.

MALGORZATA NATONEK-WIŚNIEWSKA, PIOTR KRZYŚCIN

Development of methods for species identification of cattle, pigs, chickens, sheep and dogs for analysis of nonstandard material

SUMMARY

Species identification is a routine analysis currently performed in many laboratories. In general, it involves detection of farm animal components in commercial samples, but increasing attention is given to species identification of domestic animals and nonstandard material. It was therefore appropriate to modify a procedure for species identification of canine, bovine, porcine, chicken and ovine components, for species identification of untypical material such as luncheon meat, lard and material collected from poultry house litter.

Bovine, porcine, chicken and ovine components were analysed using a fragment of the mtDNA gene coding for ATPase 6-8, and a d-loop fragment was chosen to identify canine components.

The canine species identification method offers a rapid and unambiguous way of determining the potential content of dog components. The cross-reactions showed that the primers used are species specific and the PCR product obtained is 163 bp. This reaction product is short enough to allow for analysis of highly processed material.

All the methods presented above can be used to identify the components found in material collected from poultry house litter, ground meat and lard. The use of proper DNA isolation method enabled effective analysis of species composition, and selection of the optimum method for each sample type allows for routine analysis of similar samples in the future.

Key words: species identification of dog, mtDNA, d-loop, ATPase 6-8