

METODY JAKOŚCIOWEGO ORAZ ILOŚCIOWEGO OZNACZANIA SKŁADU GATUNKOWEGO MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO

Małgorzata Natonek-Wiśniewska, Piotr Krzyścin

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt,
32-083 Balice k. Krakowa

Celem prezentowanej pracy jest przedstawienie analiz molekularnych służących do sprawdzenia składu gatunkowego paszy, mięsa i jego produktów, krwi, kości, pierza. Do badań wykorzystywane jest mtDNA, które ze względu na swoje właściwości zapewnia wysoką czułość i precyzję metody. Przedstawiane metody są skuteczne dla szerokiego spektrum matryc, zarówno surowych, jak i przetworzonych podczas obróbki termiczno-barycznej, czy zdegradowanych działaniem niekorzystnych warunków atmosferycznych. Zastosowane reakcje są specyficzne gatunkowo i bardzo czule. Prezentowane metody pozwalają na identyfikację jakościową DNA 13 gatunków zwierząt – bydła, świni, owiec, kur, kaczek, gęsi, indyków, koni, kotów, psów, saren, kóz, jeleni, 4 grup organizmów: drobiu, przeżuwaczy, zwierząt oraz eukariontów oraz identyfikacje ilościową 7 gatunków (bydła, świń, koni, kur, owiec, kaczek i gęsi).

Słowa kluczowe: identyfikacja gatunkowa, mtDNA, mięso i jego przetwory, pasze, karma dla zwierząt, pierze, kości, ślady biologiczne

Identyfikacja gatunkowa materiału biologicznego jest wykonywana w laboratoriach na całym świecie od lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku (Whittaker i in., 1983). W ciągu tych lat zmieniały się jedynie metody analityczne służące temu celowi. Powszechnie wiadomo, że początkowo posługiwano się mikroskopem, badając głównie tkanki twarde, jak mączki mięso-kostne, natomiast do tkanek miękkich wykorzystywano techniki oparte na analizie białka – ich elektroforezie lub wykrywaniu zawartych w nich przeciwciał (Whittaker i in., 1983). Obie wspomniane metody posiadały szereg ograniczeń związanych z częstą obecnością wody w badanych próbkach czy swoistością biologiczną uzależnioną od rodzaju tkanki lub sposobu

jej przetworzenia. Postęp nauk biologicznych, a w szczególności metod opartych na technologii DNA, umożliwił pominięcie wspomnianych ograniczeń i znacznie ułatwił oraz przyspieszył analizę. Analizy identyfikacji gatunkowej na podstawie DNA są wykonywane w laboratoriach od wielu lat. W ciągu tego okresu opracowano i wdrożono metody umożliwiające oznaczenie jakościowe oraz ilościowe DNA kilkunastu gatunków zwierząt.

Celem prezentowanej pracy jest ukazanie możliwości oznaczeń jakościowo-ilościowej identyfikacji gatunkowej w praktyce laboratoryjnej.

Przedmiot analiz

Największe możliwości w zakresie oznaczania gatunku daje analiza mitochondrialnego DNA (mtDNA), a dokładnie identyfikacja jego fragmentów specyficznych dla oznaczanych gatunków. Niewątpliwie dużym atutem jest możliwość wytypowania odcinka DNA charakterystycznego dla pojedynczego gatunku lub gromady w zależności od celu analizy. Analizę dodatkowo ułatwia fakt, że sekwencje mitochondrialnego DNA wykorzystywane do projektowania metod są dobrze poznane i łatwo dostępne w GenBanku. Markery genetyczne identyfikacji gatunkowej znajdują się na różnych odcinkach mtDNA (Wang i in., 2010; Pegels i in., 2011), a najczęściej stanowią fragment genu kodującego cytochrom C oksydazy I, cytochrom B lub rybosomalne DNA.

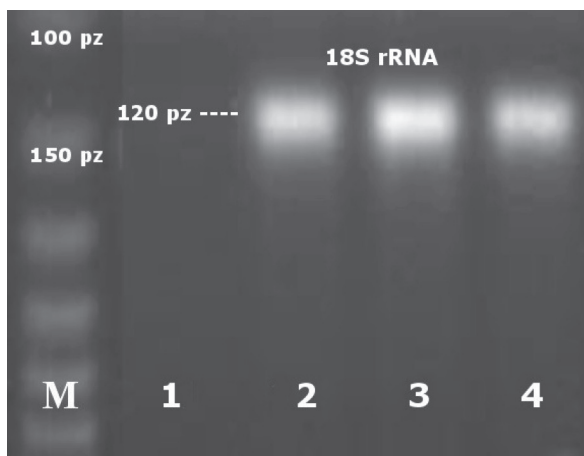
Stosowane techniki

Fragmety DNA specyficzne gatunkowo zostają powielone w reakcji PCR (Polimerazowa Reakcja Łańcuchowa). Jest ona stosowana zarówno w wariacie konwencjonalnym, jak również w czasie rzeczywistym (real-time). Klasyczna odmiana reakcji PCR dostarcza informacji o obecności lub braku oznaczanego gatunku w badanym materiale, natomiast analiza reakcji w czasie rzeczywistym może dać dodatkowo informację o ilościowym udziale poszczególnych gatunków.

Analiza na podstawie reakcji PCR

Produkty klasycznej reakcji PCR zostają rozdzielone w procesie elektroforezy w żelu agarozowym. O istnieniu identyfikowanego gatunku w produkcie świadczy obecność w żelu prążka o odpowiedniej długości, natomiast w przypadku braku oznaczanego składnika nie uzyskuje się produktu reakcji PCR. W zależności od potrzeb analizę można przeprowadzić, identyfikując bezpośrednio gatunek będący obiektem zainteresowania lub grupę: gromadę, królestwo, domenę. W oznaczonej grupie można wytypować poszczególne gatunki, stosując do tego celu enzymy restrykcyjne (np. Tsp509I, AciI), które przecinają wyodrębnioną sekwencję charakterystyczną dla całej grupy w miejscach, którymi różnią się poszczególne gatunki. Jakościowo w chwili obecnej można oznaczyć 13 indywidualnych gatunków: bydło, świnie, owce, kury (Natonek-Wiśniewska i in., 2013), kaczki, gęsi (Natonek-Wiśniewska i in., 2016) indyki, konie, koty (Natonek-Wiśniewska, 2009), psy, sarny, kozy, jelenie (Natonek-Wiśniewska i in., 2008; Natonek-Wiśniewska, 2010) oraz 2 grupy zwierząt: drób i przeżuwacze. W ostatnim roku panel analiz możliwych do wykonania zwiększył się ponadto o identyfikację dwóch jednostek taksonomicznych: królestwa zwierząt

i eukariontów. Przykładowe wyniki oznaczania eukariontów obrazuje fotografia 1. W wyniku analizy uzyskano produkty PCR (fot. 1) dla DNA kukurydzy (2), mięsa wołowego (3) oraz kości kurzej (4) na wysokości charakterystycznej dla eukariontów (120 pz). W pierwszej studzience wolnej od produktu reakcji znajduje się wynik amplifikacji wody, czyli kontrola negatywna reakcji (NTC).



Fot. 1. Produkt reakcji PCR dla oznaczania przynależności do eukariontów DNA z kukurydzy (2), mięsa wołowego (3) oraz kości kurzej (4). Kontrola negatywna reakcji PCR (1), M – marker 25bp (G4511, Promega)

Phot. 1. Results of determination of eukaryotes. PCR reaction product for maize (2), beef (3), and chicken bone (4). PCR Negative Control (1), M-Marker 25bp (G4511, Promega)

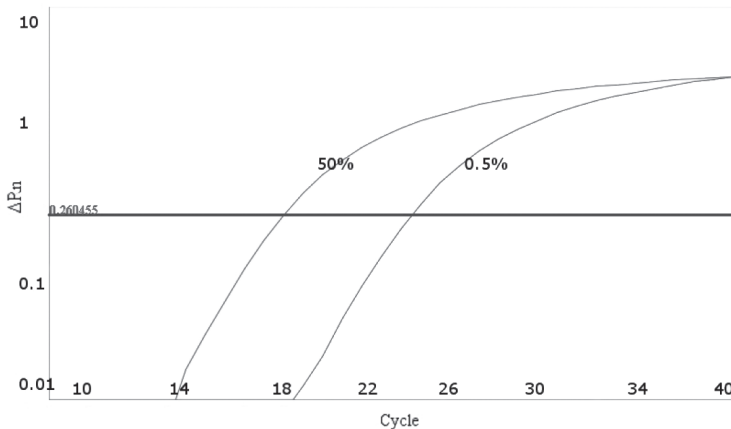
Czułość metod ilościowych jest bardzo wysoka, granica wykrywalności wynosi 0,1% oznaczanego gatunku w matrycy, co przekłada się na ilości poniżej 0,05 ng DNA na reakcję.

Analiza na podstawie real-time PCR

Reakcja PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR) cechuje się jeszcze większą czułością od konwencjonalnej odmiany reakcji, umożliwiając identyfikację specyficzną gatunkową od 0,005 ng DNA. Przeprowadzając reakcję real-time PCR w obecności krzywej standardowej wykonanej z kolejnych rozcieńczeń próbki jednogatunkowej można dodatkowo otrzymać informację o składzie ilościowym DNA od poszczególnych gatunków. Najmniejsza ilość, jaką można oznaczyć ilościowo z zadowalającą dokładnością wynosi 0,1%.

W chwili obecnej przy zastosowaniu reakcji real-time PCR istnieje możliwość oznaczania ilościowego DNA od siedmiu gatunków: bydło, świnie, konie, owce (Natonek-Wiśniewska i Krzyściń, 2016), kury (Natonek-Wiśniewska i Krzyściń, 2015), kaczki, gęsi. Przy zastosowaniu tej techniki możemy również oznaczyć DNA należące do domeny eukarionty (ryc. 1). Na rycinie zobrazowano przykładową reakcję

dla dwóch rozcieńczeń DNA (50% i 0,5%) należącego do eukariontów (mięso bydlęce).



Ryc. 1. Wykres amplifikacji DNA eukarionta. Delta Rn – względna wartość fluorescencji
Fig. 1. Eukaryotes DNA amplification graph. Delta Rn – relative fluorescence value

Analizowane matryce

Ogromnym atutem analizy gatunkowej na podstawie reakcji PCR jest możliwość przeprowadzenia oznaczenia bez względu na rodzaj materiału biologicznego, z którego uzyskujemy DNA. Analiza jest możliwa w materiale surowym (np.: mięso, mleko, krew, kości, sierść), przetworzonym (np. kiełbasa, żelatyna, ser, karma dla zwierząt domowych, mączki mięsno-kostne, plazma, kazeina, serwatka) i zdegradowanym (np. plamy krwi). Skuteczna analiza bez względu na ilość i jakość matrycy związana jest z właściwościami mtDNA, a w szczególności jego znacznej ilości kopii w każdej komórce oraz ogromnej odporności na czynniki zewnętrzne, jakim może być poddane. Zaleta ta sprawia, że metoda nie ma ograniczeń i może być wykorzystana do bardzo szerokiego spektrum materiału.

Podsumowanie

Celem przedstawionej pracy było przybliżenie możliwości określenia przynależności gatunkowej materiału biologicznego. Stosowane metody pozwalają na identyfikację zarówno zwierząt hodowlanych, jak i dzikich. Metody mają zastosowanie do szerokiego spektrum tkanek. Poprzez wybór odpowiedniego fragmentu DNA, specyficznego dla analizowanego gatunku lub grupy taksonomicznej można wykryć pojedynczy gatunek lub grupę zwierząt.

W tabeli 1 przedstawiono możliwość identyfikacji DNA oraz rodzaj analiz, jaki można wykonać.

Tabela 1. Analizy wykonywane w praktyce laboratoryjnej
 Table 1. Analyses performed in laboratory practice

Analizowany gatunek Analysed species	Technika/identyfikowany gen Technique/Gene identified		Oznaczenia Determinations	
	PCR	real-time PCR	jakościowe qualitative	ilościowe quantitative
1	2	3	4	5
Bydło domowe Cattle (<i>Bos taurus</i>)	+	+	+	+
	12SrRNA	16SrRNA		
Świnia domowa Domestic pig (<i>Sus scrofa</i>)	+	+	+	+
	COX1	16SrRNA		
Owca domowa Domestic sheep (<i>Ovis aries</i>)	+	+	+	+
	COX1	COX1		
Koń domowy Domestic horse (<i>Equus caballus</i>)	+	+	+	+
	ATP8	COX1		
Kura domowa Domestic hen (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	+	+	+	+
	16SrRNA	16SrRNA		
Kaczka domowa Domestic duck (<i>Anas platyrhynchos domesticus</i>)	+	+	+	+
	12SrRNA	Cyt B		
Gęś domowa Domestic goose (<i>Anser anser domesticus</i>)	+	+	+	+
	12SrRNA	12SrRNA		
Indyk zwyczajny Domestic turkey (<i>Meleagris gallopavo</i>)	+		+	
	Cyt B			
Koza domowa Domestic goat (<i>Capra hircus</i>)	+		+	
	Cyt B			
Sarna europejska European roe deer (<i>Capreolus capreolus</i>)	+		+	
	NADH 1			
Jeleń szlachetny Red deer (<i>Cervus elaphus</i>)	+		+	
	Cyt B			
Kot domowy Domestic cat (<i>Felis catus</i>)	+		+	
	16SrRNA			
Pies domowy Domestic dog (<i>Canis lupus familiaris</i>)	+		+	
	12S rRNA			
Drób (kaczki, kury, gęsi, indyki) Poultry (ducks, hens, geese, turkeys)	+		+	
	12S rRNA			
Podrząd: Przeżuwacze Suborder: Ruminants (<i>Ruminantia</i>)	+	+	+	
	16SrRNA			

cd. tab. 1 – Table 1 contd.

	1	2	3	4	5
Podtyp:		+		+	
Kregowce		Gen miostatynny			
Subphylum:					
Vertebrates					
(<i>Vertebrata</i>)					
Gromada:					
Owady					
Class:					
Insects					
(<i>Insecta</i>)					
Domena: Eukarionty		+	+	+	
Domain:		18S rRNA			
Eukaryotes					
(<i>Eukaryota</i>)					

Piśmiennictwo

- Fajardo V., González I., López-Calleja I., Martín I., Hernández P.E., Garcia T., Martín R. (2006). 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.*, 54: 1144–1150.
- Natonek - Wiśniewska M. (2009). Species identification of feline DNA based on analysis of cytochrome b. *Ann. Anim. Sci.*, 4: 379–384.
- Natonek - Wiśniewska M., Krzyścin P. (2015). Opracowanie prostych i skutecznych testów real-time PCR od identyfikacji komponentów bydłych, wieprzowych i owczych w żywności. *Żywność Nauka Technologia Jakość*, 4: 73–84.
- Natonek - Wiśniewska M., Krzyścin P. (2016). The use of PCR and real-time PCR for qualitative and quantitative determination of poultry and chicken meals. *Ann. Anim. Sci.*, 3: 731–741.
- Natonek - Wiśniewska M., Słota E. (2008). Polymorphism of the cytB gene as a marker for species identification of mammalian mtDNA. *Ann. Anim. Sci.*, 8: 243–247.
- Natonek - Wiśniewska M., Słota E. (2010). Identyfikacja sekwencji genu kodującego dehydrogenazę NADH 1 u sarny. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 37: 145–149.
- Natonek - Wiśniewska M., Słota E., Kalisz B. (2010). Use of cytochrome b polymorphism for species identification of biological material derived from cattle, sheep, goats, roe deer and red deer. *Folia Biol. (Krakow, Pol.)*, 58: 46–50.
- Natonek - Wiśniewska M., Krzyścin P., Piestrzyńska-Kajtoch A. (2013). 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.*, 34(1): 69–78.
- Natonek - Wiśniewska M., Krzyścin P., Bugno-Poniewierska M. (2016). Wykorzystanie polimorfizmu mtDNA do rozróżnienia puchu kaczek i gęsi. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 43(1): 51–58.
- Pegels N., González I., García T., Martín R. (2011). Detection of banned ruminant-derived material in industrial feedstuffs by TaqMan real-time PCR Assay. *J. Food Prot.*, 74: 1300–1308.
- Wang Q., Zhang X., Zhang H., Zhang J., Chen G., Zhao D., Ma P., Liao W. (2010). Identification of 12 animal species meat by T-RFLP on the 12S rRNA gene. *Meat Sci.*, 85: 265–269.
- Whittaker R., Spencer T., Copland J. (1983). An enzyme-linked immunosorbent assay for species identification of raw meat. *J. Sci. Food Agric.*, 34: 1143–1148.

MAŁGORZATA NATONEK-WIŚNIEWSKA, PIOTR KRZYŚCIN

Methods for qualitative and quantitative species analysis of biological material

SUMMARY

The aim of this paper is to present molecular assays for species identification. The study makes use of mtDNA, which, due to its properties, ensures high sensitivity and precision of the method.

The presented methods are effective for a wide spectrum of matrices (feedstuffs, meat and meat products, blood, bones, feathers), both raw and processed during thermobaric treatment, or degraded by adverse atmospheric conditions. The reactions used are species-specific regardless of the amount contained in the sample. The presented methods allow identifying the DNA of 13 animal species (cattle, pig, sheep, chicken, goose, duck, turkey, horse, dog, cat, roe and red deer, goat), four groups of organisms (poultry, ruminants, animals, eukaryotes) and quantitative analysis of 7 species (cattle, pigs, horses, hens, sheep, ducks and geese).

Key words: species identification, mtDNA, meat and meat preparations, feeds, animal feedstuffs, feathers, bones, biological traces