

# Sposoby oznaczania składu gatunkowego produktów pochodzenia zwierzęcego – metody ilościowe i jakościowe

Małgorzata Natonek-Wiśniewska

*Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy,  
Dział Genomiki i Biologii Molekularnej Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa*

## Wstęp

Identyfikacja gatunkowa żywności oraz karmy dla zwierząt jest od wielu lat popularną analizą w laboratoriach. Przyczyn jej popularności należy upatrywać zarówno w świadomości społecznej dotyczącej zdrowego odżywiania, której wzrost w ostatnich latach można zaobserwować, jak również zwiększonej dbałości o żywienie zwierząt domowych czy wreszcie względach religijnych. Konsumenci coraz częściej poszukują żywności dla siebie czy zwierząt, która będzie posiadała konkretne właściwości zdrowotne lub sprecyzowany skład, co w konsekwencji powoduje konieczność zamieszczania na opakowaniu składu gatunkowego. Nakaz ten dotyczy nie tylko żywności dla ludzi, ale również karmy dla zwierząt. W obu przypadkach względy ekonomiczne powodują jednak ryzyko fałszowania poprzez dodatek tańszego niezadeklarowanego gatunku lub brak komponentu z wyższej półki cenowej.

Weryfikacja zadeklarowanego składu z rzeczywistym daje możliwość uniknięcia zafałszowań. Niewątpliwie najlepszym badaniem jest analiza z wykorzystaniem metod molekularnych.

Celem prezentowanej pracy jest ukazanie analiz molekularnych, służących do sprawdzenia składu gatunkowego żywności i pasz na przykładzie metod rutynowo stosowanych w Laboratorium Genetyki Molekularnej IZ PIB.

## Material i metody

### Obiekt badań

Największe możliwości w zakresie iden-

tyfikacji gatunkowej ma analiza mitochondrialnego (mtDNA), a dokładnie wykrycie jego fragmentów specyficznych dla gatunków, jakie chcemy oznaczyć. W zależności od potrzeb można wytypować odcinek DNA umożliwiający identyfikację grupy zwierząt (np. drobiu lub ssaków) lub konkretnego gatunku.

Analizie można poddać zarówno próbki twarde, jak również produkty uboczne pozbawione kości, a nawet próbki płynne. Jest to ogromna zaleta stosowanej techniki, ponieważ sprawia, że metoda nie ma ograniczeń i może być wykorzystana do bardzo szerokiego spektrum materiału.

### Rodzaje analizy

Stosowane metody można podzielić na kilka grup ze względu na:

- oczekiwaną odpowiedź, dotyczącą składu jakościowego lub ilościowego,
- oznaczenie konkretnego gatunku,
- oznaczenie grupy zwierząt (drobiu, ssaków).

### Etapy analizy

1. Homogenizacja próbki;
2. Izolacja DNA;
3. PCR/elektroforeza (identyfikacja jakościowa);
4. Real-Time PCR (identyfikacja ilościowa).

## Wyniki i ich omówienie

### Homogenizacja próbki i izolacja DNA

Pierwszym etapem analizy w każdym

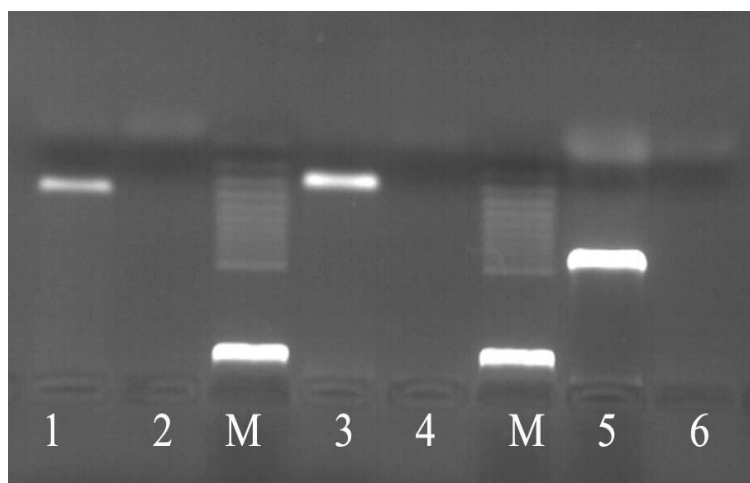
przypadku jest homogenizacja próbki oraz izolacja zawartego w nim DNA. Ilość i jakość otrzymanego DNA są uzależnione od rodzaju matrycy. Z surowych tkanek można uzyskać DNA w dużej ilości i bardzo dobrej czystości, natomiast im bardziej przetworzona jest próbka, tym mniej będzie pozyskanego z niej DNA. Dla zobrazowania: stężenie DNA uzyskane z mięsa surowego wynosi 350–500 ng/ul, dla hemoglobiny czy karmy dla zwierząt domowych połowę mniej, a dla mączek zwierzęcych czy smalcu nawet 40-krotnie mniej. Należy zaznaczyć, że otrzymane DNA powinno być na tyle dobrej jakości, aby dalsza analiza była możliwa. Zastosowanie mtDNA ma jednak tę przewagę nad genomowym DNA, że nawet złej jakości DNA może być w dalszym etapie identyfikowane i tylko w skrajnych przypadkach nie jest możliwa jego analiza.

#### Oznaczenie jakościowe oraz ilościowe gatunku zwierząt

##### Identyfikacja jakościowa

Jak wcześniej wspomniano, oznaczenie

jakościowe dostarcza informacji, czy w badanym produkcie znajduje się materiał oczekiwanego gatunku czy też jest od niego wolny. Analiza oparta jest na reakcji PCR, a następnie elektroforezie otrzymanych produktów w żelu agarozowym. O zawartości zidentyfikowanego gatunku w produkcie świadczy obecność w żelu prążka o odpowiedniej długości. W przypadku braku oznaczanego składnika nie uzyskuje się produktu reakcji PCR. Przykładowe wyniki przedstawiono na fotografii 1. Przedstawiono na niej rozdział produktów amplifikacji DNA wyizolowanego z mieszaniny mięsa wieprzowego, wołowego i końskiego. Prezentowane analizy prowadzono w kierunku zawartości wołowiny (ścieżki 1 i 2), wieprzowiny (ścieżki 3 i 4) oraz koniny (ścieżki 5 i 6). W ścieżkach 1., 3. i 5. znajduje się produkt amplifikacji mieszaniny mięsa. W studzienkach tych zaobserwowano produkt reakcji PCR charakterystyczny dla DNA bydłowego (90 pz) (studzienka 1), wieprzowego (85 pz) (studzienka 2), końskiego (271 pz) (studzienka 3). Ścieżki 2., 4. i 6. to kontrole negatywne, gdzie zamiast DNA dodano wody.



Fot. 1. Wynik amplifikacji w kierunku oznaczania komponentu bydłowego (1, 2), wieprzowego (3, 4), końskiego (5, 6). Ścieżki 1., 3. i 5. zawierają produkt amplifikacji mieszaniny mięsa. Ścieżki 2., 4. i 6. zawierają kontrole negatywne reakcji. M – marker wielkości 25 pz

Phot. 1. Amplification result for the determination of bovine (1, 2), porcine (3, 4), and equine components (5, 6). Lanes 1, 3 and 5 contain the amplification product for meat mixture. Lanes 2, 4, 6 contain the negative control reactions. M – 25 bp size marker

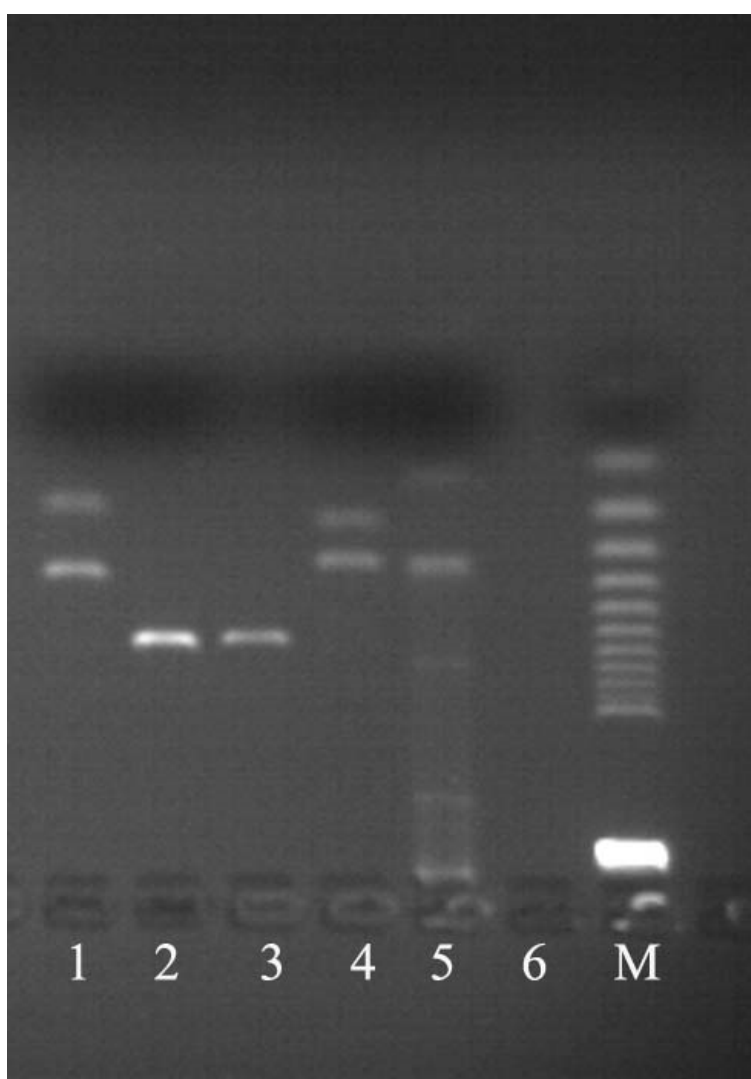
Oznaczenia jakościowe można obecnie przeprowadzić dla 12 indywidualnych gatunków: bydło, świnie, owce, kury, kaczki, indyki, konie, koty, psy, sarny, kozy, jelenie (Natonek-Wiśniewska i Słota, 2008; Natonek-Wiśniewska, 2010 a, b).

Należy zaznaczyć, że istnieje również możliwość oznaczenia grupy kilku zwierząt bez podziału na poszczególne gatunki lub z podziałem. Przykładem może być oznaczenie drobiu, pozwalające na wyodrębnienie czterech najpo-

pularniejszych jego przedstawicieli (kury, indyki, kaczki i gęsi) (Natonek-Wiśniewska i in., 2016). Mówiąc o oznaczeniu grupy zwierząt nie sposób pominąć roli enzymów restrykcyjnych. Podczas oznaczania grupy zwierząt w reakcji PCR zostaje powielona sekwencja charakterystyczna dla tych gatunków, a następnie enzym restrykcyjny przecina ją w miejscu wyznaczonym przez specyficzną sekwencję DNA już dla konkretnego gatunku. Za przykład może posłużyć wykrycie komponentów pochodzących od

bydła, kozy, jelenia i sarny (fot. 2) (Fajardo i in., 2006; Natonek-Wiśniewska i in., 2010 a). W reakcji PCR otrzymuje się każdorazowo produkt będący fragmentem cytochromu B o wielkości 195 par zasad (pz).

Zastosowanie enzymu dzieli otrzymany produkt na fragmenty 13, 68 oraz 114 pz w przypadku komponentu bydłowego (studzienka 1), na fragmenty 13, 77 i 105 pz dla kóz (studzienka 4) oraz 20, 54, 121 pz dla DNA pochodzącego od jelenia (studzienka 5).



Fot. 2. Wynik amplifikacji i cięcia enzymami restrykcyjnymi. W studzience 2 znajduje się produkt PCR dla bydła, w studzience 3 – kozy, w pozostałych studzienkach wynik działania enzymów restrykcyjnych na produkt bydłowy (studzienka 1), kozi (studzienka 4) oraz pochodzący od jelenia (studzienka 5)

*Phot. 2. Results for amplification and cutting with restriction enzymes. Well 2 shows PCR product of cattle, well 3 – goat, the remaining wells – the action of restriction enzymes on bovine (well 1), caprine (well 4) and red deer-derived products (well 5)*

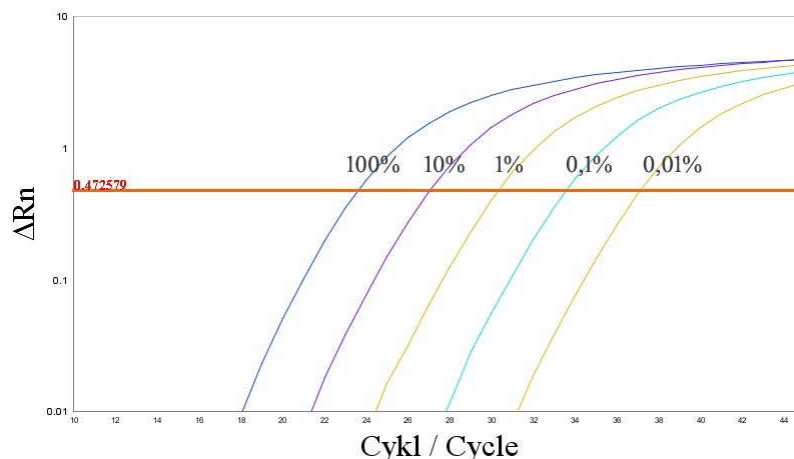
### Identyfikacja ilościowa

Oznaczanie ilościowe dostarcza informacji o zawartości procentowej materiału biologicznego pochodzącego od danego gatunku

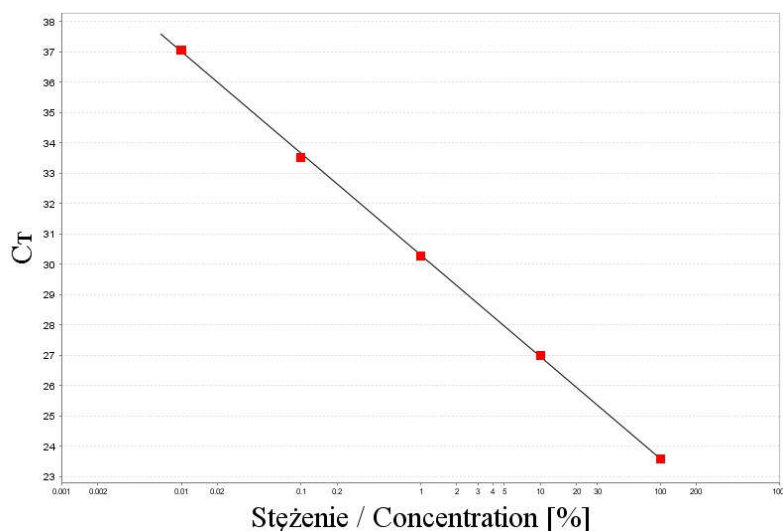
w produkcie. Wykonuje się je, stosując reakcję PCR w czasie rzeczywistym (Real-time PCR), a wynik odczytuje się w odniesieniu do krzywej standardowej, wykonanej z kolejnych rozcień-

czeń próbki jednogatunkowej. Na rycinie 1 zobrazowano przykładową reakcję identyfikacji koniny na podstawie powielania fragmentu genu kodującego cytochrom B przy zastosowaniu Real-time PCR na próbkach o zawartości od 0,01% do 100% tego gatunku, z których wyznaczono następnie krzywą standardową (ryc. 2). Na rycinie 1 można zauważyć, że im mniej jest iden-

fikowanego składnika w badanym materiale, tym wolniej zachodzi amplifikacja. Tę samą reakcję przedstawiono jako zależność między cyklem, w którym rozpoczęła się reakcja a logarytmem stężenia DNA oznaczanego gatunku. Na podstawie wartości Ct dla próbek o nieznanym składzie wyznaczono ilość materiału od oznaczanego gatunku.



Ryc. 1. Wykres amplifikacji DNA pochodzącego od konia. Delta Rn – względna wartość fluorescencji  
Fig. 1. Amplification graph for equine DNA. Delta Rn – relative fluorescence value



Ryc. 2. Krzywa standardowa  
Fig. 2. Standard curve

Ilościowy udział materiału biologicznego pochodzącego od oznaczanego gatunku można

obecnie wyznaczyć dla komponentów bydłych, wieprzowych, kurzych, owczych i końskich.

### Czułość i dokładność metod

Metoda jakościowa daje możliwość wykrycia śladowych ilości tkanek zwierzęcych już na poziomie 0,1% , a metody ilościowe są jeszcze czulsze, pozwalają na wyznaczenie ilości DNA już od 0,02%. Dokładność metod jest 100% – wynik zawsze jest zgodny z prawdą i nigdy nie występują reakcje fałszywie pozytywne ani negatywne.

### Podsumowanie

Celem opracowania było przybliżenie możliwości określenia przynależności gatunkowej produktów spożywczych, przeznaczonych zarówno dla ludzi jak i dla zwierząt, przy zastosowaniu reakcji PCR i Real-Time PCR. Stosowane metody pozwalają na identyfikację materiału pochodzącego zarówno od zwierząt hodowlanych, jak i dzikich. Metody mają zastosowanie do szerokiego spektrum materiału, zarówno surowego (mięso czy krew), jak również przetworzonego do postaci

mięsa gotowanego, marynowanego, żelatyny, sera, mleka, karmy dla zwierząt domowych czy mączek zwierzęcych, plazmy, kazeiny, serwatki.

Poprzez wybór odpowiedniego fragmentu DNA, specyficznego dla analizowanego gatunku lub grupy kilku gatunków można, w zależności od potrzeb, wykryć pojedynczy gatunek lub grupę zwierząt. Do badań są wykorzystywane różne fragmenty mtDNA. Wymienione w opracowaniu metody wykorzystują fragment genu kodującego cytochrom C oksydazy I, cytochrom B lub rybosomalne DNA. Wszystkie te fragmenty są powszechnie stosowane jako markery genetyczne identyfikacji gatunkowej (Wang i in., 2010; Pegels i in., 2011).

Atutem prezentowanych metod jest fakt, że choć najczęściej wykorzystywane są do badań pasz i żywności, to mają o wiele szersze zastosowanie. Mogą pomóc w identyfikacji zwierząt nie tylko poprzez badanie ich mięsa czy krwi, ale również zębów czy sierści.

### Literatura

- 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., 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., 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. (Kraków, Pol.)*, 58: 46–50.
- Natonek-Wiśniewska M., Słota E. (2010). Identyfikacja sekwencji genu kodującego dehydrogenazę NADH 1 u sarny. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 37, 2: 145–149.
- 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.*, 16, 3: 731–741.
- 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.

## QUANTITATIVE AND QUALITATIVE METHODS FOR DETERMINING SPECIES COMPOSITION OF ANIMAL PRODUCTS

### Summary

The aim of this study was to present molecular analyses used to verify species composition using the example of the methods routinely used in the Laboratory of Molecular Genetics of the National Research Institute of Animal Production. The study used mitochondrial DNA (mtDNA), the properties of which ensure high sensitivity and precision of the method.

The presented methods are effective for a wide spectrum of raw animal products, subjected to thermobaric treatment or degraded by adverse weather conditions. The reactions used are species specific regardless of their quantity present in the sample. The methods allow for identification of tissues from cattle, pigs, sheep, chickens, ducks, turkeys, horses, cats, dogs, roe deer, goats, red deer as well as groups of animals such as birds or mammals. The methods enable the product to be determined both qualitatively and quantitatively.

**Key words:** species identification, mtDNA, feed analysis, food analysis