

## Oznaczanie składu gatunkowego materiału biologicznego za pomocą mitochondrialnego DNA – możliwości współczesnego laboratorium

Małgorzata Natonek-Wiśniewska , Piotr Krzyścin

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

### **K**orzyści wynikające z możliwości oznaczania gatunkowego materiału biologicznego

Wiarygodność składu gatunkowego jest częstym przedmiotem badań laboratoryjnych powiązanych głównie z produktami spożywczymi, jak również z mikrośladami. Kontrolowanie jakości oferowanej żywności od dawna jest ważnym elementem rynku produktów żywnościowych. Potrzeba ta wiąże się z kwestiami zdrowotnymi, przekonaniem religijnymi oraz najczęściej względami ekonomicznymi. Według WHO, w Europie 4–8% społeczeństwa cierpi na alergię na mleko bydlęce czy jajka kurze (Lifschitz, 2015; Vandenpla i in., 2015). Przekonania religijne wielu kultur stanowią bodziec do kontrolowania rzeczywistego składu żywności, ponieważ bardzo często dochodzi do celowego fałszowania dedykowanych dla tych społeczności produktów spożywczych poprzez substytucję łatwiej dostępnymi zamiennikami zadeklarowanych składników (np. innym, tańszym mięsem lub roślinnymi wypełniaczami) (Amqizal i in., 2017). Fałszowanie dotyczy nie tylko całkowitej podmiany gatunków, ale również zaniżania ilościowego udziału droższego komponentu w mieszaninie. Wystarczy tu nadmienić, że według raportu inspekcji handlowej 13,7% mięsa krojonego jest zafałszowane (Sprawozdanie Urzędu Ochrony Konsumentów i Konkurencji, 2019). Fałszowanie, czy to celowe czy wynikające z artefaktów towarzyszących obróbce różnych gatunków mięsa, dotyczy zarówno produktów spożywczych (Liyana i in., 2018; Prusakova i in., 2018),

jak również karm dla zwierząt (Das i in., 2019; Hołda i in., 2018). Także w innych aspektach życia badania identyfikacji gatunkowej są bardzo przydatne. Przykładami mogą być: identyfikacja w sierści, w wyprawionej skórze, jak również w śladach biologicznych.

Poznanie metod umożliwiających określenie składu gatunkowego – ilościowego i jakościowego – staje się we współczesnym laboratorium niezbędne, dając możliwości zarówno kontrolowania zgodności deklaracji producenta z realnym składem produktu, jak i wyznaczenia gatunku pochodzenia dowolnej matrycy.

### **Możliwości badań niezależnie od liczby identyfikowanych jednocześnie gatunków oraz materiału podlegającego analizie**

Do analizy najczęściej używa się mtDNA. Przewaga genomu mitochondrialnego nad genomowym wynika z jego odporności na działanie czynników fizycznych – temperatury i ciśnienia, które są nieodłącznym elementem procesów technologicznych przy obróbce żywności. Ta cecha mtDNA przyczynia się do bardzo wysokiej czułości analiz. Do badań można stosować cały genom mitochondrialny, chociaż najczęściej używa się cytochromu B i d-loop. Cytochrom B jest najbardziej konserwatywnym fragmentem mitochondrialnego genomu. Jego poznanie posłużyło do badań genomu wielu organizmów, zarówno tych najbardziej pospolitych, jak i niezmiernie rzadko spotykanych. Z kolei Pętla D cechuje się największym zróżnicowaniem międzygatunko-

wym. Mitochondrialny genom jest bardzo krótki w porównaniu z całym genomem organizmu. U zwierząt ma on jedynie nieco ponad 16000 pz, co sprawia, że stosunkowo łatwo można opracować metody identyfikujące interesujący naukowca panel organizmów. Współczesne publikacje naukowe opisują szereg metod; od identyfikacji pojedynczych gatunków zwierząt gospodarskich (Rosalee i Morrissey, 2008) i towarzyszących człowiekowi (Hossain i in., 2019) po DNA zwierząt mniej pospolitych, jak kangury czy krokodyle (Ahmad Nizar i in., 2018) lub rekiny (Fotedar i in., 2019). Jest to najprostszy sposób analizy i – przy odpowiednich nakładach czasu, pracy oraz środków finansowych – laboratorium może opracować identyfikację konkretnego gatunku. Metody tego typu zazwyczaj bywają bardzo czułe, często pozwalają na oznaczenie zafałszowania poniżej 1% (Ali i in., 2015). Niekiedy bardziej korzystna od oznaczania pojedynczych gatunków jest jednoczesna identyfikacja grupy zwierząt. Wtedy metody są bardziej wymagające, ponieważ wymuszają takie dostosowanie warunków reakcji, aby uzyskać specyficzność dla kilku fragmentów DNA, charakterystycznych dla poszczególnych identyfikowanych gatunków, jednocześnie różniących się sekwencjami między sobą.

Metody molekularne pozwalają na oznaczenie DNA w każdej matrycy, niezależnie od jej postaci. Bez przeszkód możemy określić skład gatunkowy produktów wytworzonych z mięsa, kości, krwi, nabiału, w postaci żelatyny czy liofilizatów. Jest to użyteczne w przypadku matryc, które stanowią małe fragmenty tkanek, np. mikroślady, plamy krwi czy fragmenty sierści.

Wszystkie identyfikowane fragmenty DNA powinny być krótkie, nie przekraczające 100 pz, ponieważ drastyczne działania temperaturą i ciśnieniem powodują pocięcie DNA na krótkie odcinki. Metoda taka jest więc bardziej uniwersalna i pozwala na identyfikację DNA niezależnie od stopnia przetworzenia próbki.

#### ***Używane metody, ich możliwości i ograniczenia***

Najskuteczniejsze metody oznaczania ga-

tunkowego są oparte na technice PCR, również w czasie rzeczywistym, a także w odmianach monopleksów czy multipleksów. Detekcja w PCR w czasie rzeczywistym jest możliwa przy wykorzystaniu zarówno sond, jak i barwników wiążących się z DNA (np. SYBR Green). Każda z tych metod ma zalety i ograniczenia.

##### 1) tradycyjny PCR

Najprostsza z nich, PCR tradycyjny monopleks jest niezastąpiony, kiedy określamy jeden konkretny gatunek, ponieważ zwykle ma bardzo wysoką granicę oznaczalności. Ograniczeniem takiej metody jest jednak fakt, że pozwala ona jedynie rozstrzygnąć, czy dana substancja zawiera DNA oznaczanego gatunku. Więcej możliwości, ale też i problemów, sprawiają reakcje multipleksowe, które wymagają zoptymalizowania temperatur przyłączania dla wszystkich użytych starterów. Może to powodować zachodzenie poszczególnych reakcji z różnymi wydajnościami, co w skrajnych przypadkach, np. przy bardzo niskim poziomie zafałszowania – skutkuje otrzymaniem wyników fałszywie negatywnych.

##### 2) PCR-RFLP

Osobną grupę metod stanowi polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP). Technika ta opiera się na trawieniu enzymem restrykcyjnym wcześniej otrzymanego produktu PCR. Metoda pozwala na identyfikację wielu gatunków zwierząt jednocześnie i jest bardzo skuteczna dla matryc monogatunkowych, pozwalając na jednoczesną identyfikację nawet 30 potencjalnych gatunków zwierząt. Jednak użycie matryc złożonych może generować błędy w odczycie ze względu na potencjalne podobieństwo wzorów restrykcyjnych dla analizowanych gatunków zwierząt lub możliwość niepełnego trawienia miejsca restrykcyjnego (Gil, 2007; Mata, 2020).

##### 3) Sekwencjonowanie Sangera

Dla oznaczania próbek, których skład jest całkowicie nieznan i kiedy określenie poten-

cialnego gatunku jest bardzo trudne. Użytecznym narzędziem może stać się sekwencjonowanie Sangera. Poprzez wybór fragmentu homologicznego dla kilku gatunków można precyzyjnie i w szybkim czasie wyznaczyć jego pochodzenie gatunkowe. Sekwencjonowanie nie jest metodą pierwszego wyboru dla rutynowych prostych oznaczeń, jednak w przypadku badań obarczonych większą niewiadomą stanowi niezastąpione narzędzie.

#### 4) Real-time PCR

Badania ilościowe wykonywane przy zastosowaniu Real-time PCR są niezastąpione podczas określania procentowej zawartości poszczególnych gatunków w próbce. Stanowią one ciągłe wyzwanie dla badaczy ze względu na odmienną reaktywność próbek różniących się sposobem i stopniem przetworzenia czy rodzajem matrycy, co powoduje konieczność zwiększenia nakładów pracy do wytworzenia materiału referencyjnego, służącego do otrzymania krzywych standardowych.

#### **Problem ilości DNA w analizie**

Osobnym problemem jest ilość materiału badawczego, jaki poddawany jest analizie. W przypadku oznaczania mikrośladów, standardowe ilości wymagane przy wyodrębnianiu DNA większością zestawów do izolacji mogą być nieosiągalne. Zazwyczaj jednak nie stanowi to problemu, ponieważ mtDNA charakteryzuje się licznym występowaniem w każdej komórce organizmu w wielu milionach kopii.

#### **Zapewnienie jakości badań w laboratorium**

Wysoka czułość metod PCR opartych na mtDNA jest wielką ich zaletą. Jednocześnie stanowi jednak ogromne zagrożenie, związane z możliwością krzyżowego zanieczyszczenia. Z tego względu koniecznym elementem jest stosowanie kilku zasad, przestrzeganie których daje gwarancję jakości prowadzonych badań:

- praca pod komorą laminarną, naświetlanie powierzchni światłem UV,

- stosowanie roztworów do usuwania DNA z przestrzeni roboczych,
- używanie jednorazowych rękawiczek, fartuchów i końcówek do pipet,
- rozdzielanie stanowisk, na których są wykonywane poszczególne etapy analizy.

Ponadto, ważnym aspektem analiz identyfikacji gatunkowej jest walidacja metod przed wprowadzeniem ich do stosowania. Podstawowym wymogiem każdego laboratorium badawczego czy naukowego wykonującego komercyjne badania jest posługiwanie się sprawdzonymi metodami. W interesującej nas sferze badań DNA spotyka się szereg metod autorskich. Ich zaletą jest znaczna elastyczność, czyli możliwość dostosowania metody do bieżących potrzeb klienta, a więc szybka i optymalna reakcja laboratorium na zmieniające się potrzeby rynku. Niemniej jednak, wymusza to za każdym razem wykonanie walidacji.

#### **Podsumowanie**

W ostatnich latach nastąpił rozwój metod identyfikacji gatunkowej. Wynika to z faktu ogólnego rozwoju metod molekularnych, a co za tym idzie możliwości ciągłego doskonalenia technik. Z drugiej strony, postęp ten jest wymuszony przez rosnącą świadomość społeczeństwa i pełniejszą wiedzę, do czego możemy wykorzystywać tego rodzaju analizy.

Badania identyfikacji gatunkowej znajdują zastosowanie w wielu nurtach współczesnych badań naukowych. Do najważniejszych należą:

- analiza żywności,
- badania mikrośladów,
- oznaczanie składu gatunkowego karmy dla zwierząt,
- oznaczanie gatunkowe gadżetów, zabawek przywożonych z zagranicy mogących zawierać produkty pochodzenia zwierzęcego.

Z badań tych najczęściej korzystają firmy produkujące żywność oraz zajmujące się ich

dystrybucją i pośrednictwem handlowym, producenti karm dla zwierząt, mieszalnie pasz, policja i prokuratura, sądownictwo, organy celne i inne.

Rosnące zapotrzebowanie na prowadzenie identyfikacji gatunkowej na potrzeby wielu dziedzin gospodarki i obszarów działalności państwowej i społecznej jest nieustającym wyzwaniem dla współczesnego laboratorium biologii molekularnej. Powstaje konieczność opracowywania

i doskonalenia coraz to nowszych i skuteczniejszych metod.

Działania te wymuszają jednocześnie poszerzenie wiedzy i umiejętności personelu, podnoszenie ich kwalifikacji, jak również specjalizacji wykonywanej pracy związanej z zachowywaniem Norm Jakości dotyczących wykorzystywanego sprzętu i stosowanych metod (Grochau i Caten, 2012).

### Literatura

- Ahmad Nizar N., Ali M., Hossain M., Sultana S., Ahamad M. (2018). Double gene targeting PCR assay for the detection of *Crocodylus porosus* in commercial products. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35 (6): 1038–1051.
- Ali M., Razzak M., Hamid S., Rahman M., Al Amin M., Rashid N. (2015). Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods. *Food Chem.*, 177: 214–224 (<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.098>).
- Amqizal H., Al-Kahtani H., Ismail E., Hayat K., Jaswir I. (2017). Identification and verification of porcine DNA in commercial gelatin and gelatin containing processed foods. *Food Control*, 78: 297–303 (<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.024>).
- Das A., Xu L., Jia W. (2019). Development of conventional and real time PCR assays for rapid species authentication of mammalian cell lines commonly used in veterinary diagnostic laboratories. *Res. Vet. Sci.*, 126: 170–177 (<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.08.029>).
- Fotedar S., Lukehurst S., Jackson G., Snow M. (2019). Molecular tools for identification of shark species involved in depredation incidents in Western Australian fisheries. *PloS one*, 14 (1): e0210500 (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210500>).
- Gil L. (2007). PCR-based methods for fish and fishery products authentication. *Trends Food Sci. Technol.*, 18: 558–66 (<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.04.016>).
- Grochau I., Caten C.S. (2012). A process approach to ISO/IEC 17025 in the implementation of a quality management system in testing laboratories. *Accreditation and Quality Assurance*, 17 (5): 519–527 (<https://doi.org/10.1007/s00769-012-0905-3>).
- Hołda K., Natonek-Wiśniewska M., Krzyścin P., Głogowski R. (2018). Qualitative and quantitative PCR verification of undeclared chicken protein in dry dog foods. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 102: 37–42.
- Hossain M., Uddin S., Sultana S., Bonny S., Khan M., Chowdhury Z., Ali M. (2019). Heptaplex polymerase chain reaction assay for the simultaneous detection of beef, buffalo, chicken, cat, dog, pork, and fish in raw and heat-treated food products. *J. Agricult. Food Chem.*, 67 (29): 8268–8278 (<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02518>).
- Lifschitz C. (2015). Cow's milk allergy: evidence-based diagnosis and management for the practitioner. *Europ. J. Pediatrics*, 174: 141–150.
- Liyana L., Sahilah A.M., Nur Qistina Z., Mohd Khan A., Aminah A., Abdul Salam B. (2018). Detection of porcine DNA in cooked meatballs using polymerase chain reaction (PCR) assay. *Int. Food Res. J.*, 25 (5): 1953–1958.
- Mata W., Chanmalee T., Punyasuk N., Thitamadee S. (2018). Simple PCR-RFLP detection method for genus- and species-authentication of four types of tuna used in canned tuna industry. *Food Control*, 108: 106–842

(<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106842>).

Prusakova O., Glukhova X., Afanas'eva G., Trizna Y., Nazarova L., Beletsky I. (2018). A simple and sensitive two-tube multiplex PCR assay for simultaneous detection of ten meat species. *Meat Sci.*, 137: 34–40 (<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.10.017>).

Rosalee R., Morrissey M. (2008). DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 7, 3: 280–295 (<https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2008.00046.x>).

Urząd Ochrony Konsumentów i Konkurencji (2019). Sprawozdanie za 2018 rok w sprawie wykonania przez inspekcję handlową krajowego planu kontroli żywności. Warszawa; 8.

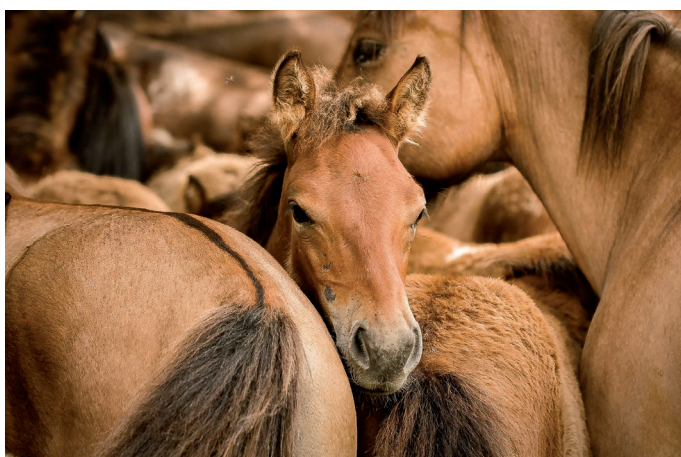
Vandenpla Y., Dupont C., Eigenmann P., Host A., Kuitunen M., Ribes-Koninckx C., Von Berg A. (2015). A workshop report on the development of the cow's milk-related symptom score awareness tool for young children. *Acta Paediatrica*, 104 (4): 334–339 (<https://doi.org/10.1111/apa.12902>).

## DETERMINATION OF SPECIES COMPOSITION OF BIOLOGICAL MATERIAL WITH MITOCHONDRIAL DNA – CAPABILITIES OF MODERN LABORATORIES

### Summary

The reliability of species composition is a frequent subject of laboratory studies associated with food products or microtraces. The need to know the real species composition is mainly motivated by health issues, religious beliefs, and economic reasons. Therefore, knowledge of the methods for quantitative and qualitative determination of species composition becomes essential in modern laboratory, providing an opportunity to control manufacturer's declaration of conformity with the actual composition, and to identify the species origin of any matrix. The analyses most often use mtDNA. Molecular methods allow detecting DNA in any matrix, whatever its form. We can easily determine species composition of raw tissues and those processed from meat, bones, blood or hair. The most efficient methods of species determination are based on conventional PCR as well as monoplex and multiplex real-time PCR. These methods should be constantly improved to satisfy increasing societal demands in this area while mobilizing the staff to acquire new skills and continuously upgrade qualifications. Attention should be given to the dynamic nature of work in a laboratory, which is associated with maintaining the quality of applied methods and using the equipment.

**Key words:** determination of species composition, biological material, mtDNA, laboratory



Żrebię rasy huculskiej – Stadnina Koni Huculskich w Gładyszowie (fot. M. Pasternak)  
*Hucul foal – Gładyszów Stud (photo M. Pasternak)*