

Szarvasmarha és bivaly tej és tejtermékének elkülönítése DNS-alapú technika alkalmazásával

Soltész Beáta – Gulyás Gabriella – Csikós Ádám –
Koncós Gábor – Vass Nóra – Oláh János –
Jávor András – Czeglédi Levente

Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma,
Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar,
Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet,
Debrecen
czeglédi@agr.unideb.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során célunk egy olyan DNS metodikán alapuló eljárás optimalizálása volt, amely megbízhatóan, alacsony költséggel képes kimutatni tejből, illetve tejtermékből (sajt) az adott állatfaj jelenlétét, illetve arányát. Vizsgálatainkhoz tejkeverékekből származó mitokondriális DNS-t használtunk fel, ahol a bivalytejhez különböző arányokban (v/v%) – 0,1%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 5%, 10%, 15% – adottunk tehéntejet. Tejtermékként olyan sajtokat vontuk be a vizsgálatba, melyeket bivaly, illetve bivaly és tehéntej különböző arányú keverékéből (v/v%) állítottunk elő (0%, 2%, 5%, 10%, 15% – tehéntej jelenléte).

A tejkeverékek esetében a PCR reakcióban a fajspecifikus primerpárok felhasználásával 0,5 v/v%-os kimutatási határértéket állapítottunk meg, a 99,9/0,1 bivaly/tehén v/v%-os tej szarvasmarhára nem adott detektálható jelet. Sajtokból is sikeresen azonosítottuk a szarvasmarha és a bivaly DNS-ét. Mind a tej, mind a sajt esetén a PCR fragment intenzitásának változása jelezte a tehéntej részarányának növekedését.

Kulcsszavak: szarvasmarha, bivaly, tej, sajt, duplex PCR

SUMMARY

Aim of our study was the optimization of a DNA method, that is appropriate for reliable, low cost identification of animal species in milk and dairy product (cheese) and to determine the ratio of species. Mitochondrial DNA was used in our work to analyse buffalo/cow milk mixtures contained different ratio of bovine milk such as 0.1%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 5%, 10%, 15% (v/v%). Buffalo cheese were produced using buffalo and cows milk (0%, 2%, 5%, 10%, 15% – v/v% cows milk in buffalo milk).

In case of milk mixtures, using species specific primers, the PCR assay showed a 0.5 v/v% detection limit. Cattle, in the buffalo/cows milk 99.9/0.1 v/v% mixture, was not detectable. The identification of buffalo and cows DNA in cheese was successful. The intensity of electroforetic PCR fragment indicated the increase of cow milk ratio in milk and cheese samples as well

Keywords: cattle, buffalo, milk, cheese, duplex PCR

BEVEZETÉS

A tisztességtelen kereskedelmi gyakorlat, nevezetesen a tehéntej felhasználásával történő termékhamisítás, valamint a fogyasztók félretájékoztatása, megköveteli az élelmiszerek hatékony és rutinszerűen végezhető ellenőrzését. Az élelmiszerek összetevőinek és azok származásának ellenőrzésére az elmúlt évtizedekben számos molekuláris biológiai technikát dolgoztak ki.

A fehérjék (Rolland, 1995; Addeo et al., 1990) és a DNS kimutatására és mennyiségük mérésére alkalmazott, jól bevált technikákon kívül a fajokra jellemző zsírsavprofilra is dolgoztak ki metodikákat (Lumley, 1996), de ezek közel sem voltak olyan hatékonyak, mint a DNS vagy fehérjekomponensek vizsgálatára használt módszerek. A DNS-alapú technikák közül kiemelt hatékonyaságú a PCR eljárás (Higgins et al., 1992), illetve annak módosított változatai, mint például a PCR-RFLP (Kocher et al., 1989), PCR-SSCP (Plath et al., 1997) vagy a multiplex-PCR reakciók (Bottero et al., 2003). Ezekkel az eljárásokkal kis mennyiségű tehéntej jelenlétét is ki lehet mutatni a tejtermékekből.

Az irodalmi adatok alapján feltételezzük, hogy költséghatékonyabb és a szarvasmarha tejjel történő szennyezések kimutatására érzékenyebb eljárások dolgozhatók ki a tej és tejtermékek eredetigazolásának vonatkozásában. Célunk olyan DNS metodikán alapuló eljárás optimalizálása, amely megbízhatóan alacsony költséggel képes kimutatni tejből, illetve tejtermékből (sajt) az adott állatfaj jelenlétét, illetve arányát. Munkánk során bivaly és szarvasmarha fajokból származó tej és sajt mintákból, illetve azok keverékéből fajazonosítást végeztünk.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Tejminták begyűjtése, tárolása

4–4 bivaly és szarvasmarha tehéntől gyűjtöttünk elegy-
tej mintákat 50 ml-es Falcon csövekbe, melyeket felhasználásig -80 °C-on tároltunk.

Sajtminták előállítása, tárolása

Bivaly és szarvasmarha tejből különböző keverési arányú sajtokat állítottunk elő. A sajtkeverékekben a tehéntej aránya 0, 2, 5, 10, 15 v/v% volt. A sajtokat -20 °C-on tároltuk.

DNS kivonás tejből

A tejmintákból a DNS-t az Orbán és Zsolnai (1999) által leírt módszer alapján végeztük, melyet zsírszeparálással egészítettünk ki. 1 ml tejet 7 percig centrifugáltunk 13 000 g-n. A felülúszó tetején összegyűlt tejszírt eltávolítottuk, majd a felülúszót a pellettel együtt felszuszpendáltuk. 500 µl mosó oldatot [10 mM Tris (pH 7,5); 0,2 mM EDTA (pH 7,43)] mértünk ki 1,5 ml-es eppendorf csövekbe, majd 50 µl tejmintát mostunk bele az oldatba. Ezután 2 percen át centrifugáltuk a csöveget 12 000 g-n, majd leöntöttük a felülúszót. A mosási lépést háromszor ismételtük. Ezt követően a

csövek alján lévő pelletet felszuszpendáltuk 100 µl lízis puffert (10 mM Tris; 50 mM KCl; 0,5 v/v% Tween 20) és 80 µg Proteináz K enzimet (Sigma) tartalmazó elegyben. Az emésztés 56 °C-os vízfürdőben 60 percig történt, majd az enzim inaktiválása céljából a mintákat 10 percig 94 °C-os vízfürdőbe helyeztük. A tisztítást követően az extraktumokban lévő DNS koncentrációját spektrofotométer segítségével mértük. Az előkészített mintákat -20 °C-on tároltuk a további vizsgálatig.

DNS kivonás sajtból

A sajtmintákból történő DNS kivonás De et al. (2011) által leírt fenol-kloroformos módszer alapján történt. A sajtmintákat folyékony nitrogénnel homogenizáltuk, ezekből 70 mg-ot kimértünk, majd 900 µl extrakciós puffer (75 mM NaCl; 2 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl; 0,45 v/v% SDS) és 120 µg Proteináz-K enzim (Sigma) elegyével inkubáltuk egy éjszakán át 50 °C-on. Ezt követően 900 µl fenolt [Sigma, (pH=8)] adtunk a mintákhoz és 15 700 g-n 10 percig centrifugáltuk, majd a felső vizes fázisból 800 µl-t átvittünk egy másik csőbe. 800 µl 25:24:1 arányban összeállított fenol-kloroform-izoamil-alkohol (Sigma) elegyet adtunk a mintákhoz, ismét centrifugáltuk 15 700 g-n 10 percen át, majd a felső vizes fázisból 500 µl-t másik csőbe vittünk át. 500 µl 24:1 arányú kloroform-izoamil-alkoholt (Sigma) mértünk a mintákra, majd újra centrifugáltuk 15 700 g fordulaton, ezután 300 µl mennyiséget vittünk át a felülúszóból 1,5 ml-es eppendorf csőbe. A DNS kicsapása 0,8 térfogat arányú izopropanolal történt, a csöveket 5 percre 4 °C-ra helyeztük, majd centrifugáltuk 12 500 g-n 10 percig, ekkor a nukleinsav a cső alján pelletként volt megfigyelhető. A pellet mosása 70 v/v%-os etanollal (VWR) történt, majd papírtöröltre fordítva szárítottuk a mintákat. Végül 100 µl TE pufferben (10 mM Tris-HCl (pH 8); 1 mM EDTA) eluáltuk a pelletet 65 °C-ra beállított vízfürdőben egy órán át. Az inkubálást követően -20 °C-ra helyeztük a mintákat a következő felhasználásig.

Duplex PCR reakció és agaróz gélelektroforézis

Fajonként eltérő SNP-k alakulhatnak ki a DNS szekvenciákban, amelyek megfelelő markerként szolgálnak a fajok, illetve fajták elkülönítésére. Az előzetes vizsgálatok során, az adatbázisokban szereplő szakirodalmi adatok alapján választottuk ki a két faj együttes kimutatásához szükséges primereket, és használtuk fel a PCR vizsgálatokhoz. Mindkét faj esetén mitokondriális DNS-t használtunk, a szarvasmarha esetén a 12S rRNS gén, a bivaly kimutatásánál a D loop régió fajspecifikus szakaszát amplifikáltuk. A használt primerek szekvenciája szarvasmarhánál:

– F: 5' GTACTACTAGCAACAGCTTA 3' és
– R: 5' GCTTGATTCTCTTGGTGTAGAG 3'
(Bottero et al., 2003);

bivalynál:

– F: 5' ACTAGATCACGAGCTTGATCACCATGC 3' és
– R: 5' GTTATGTGTGAGCATGGGCTGATTGGA 3'
(De et al., 2011) volt.

A duplex-PCR reakciókhoz alkalmazott reakcióelegy összetétele 20 µl reakcióközegben: 4 mM MgCl₂ (Fermentas), 1×DreamTaq-puffer (Fermentas), 200 µM

dNTP (Fermentas), 2 pmol Reverse primer (szarvasmarha), 2 pmol Forward primer (szarvasmarha), 3,6 pmol Reverse primer (bivaly), 3,6 pmol Forward primer (bivaly) 1U DreamTaq-polimeráz (Fermentas). A PCR Mixhez 100 ng DNS-t adtunk. A felhasznált primerek mennyiségének egymáshoz viszonyított arányát optimalizálási előkísérletekben állapítottuk meg, melyek eredményeit az Eredmények részben ismertetjük. A primerpárok tapadási hőmérsékletét hőmérséklet-gradiens PCR-ben határoztuk meg, így megállapítottuk, hogy a kiválasztott primerpárok olvadási hőmérséklete 60 °C. A felszaporított PCR termék mérete a szarvasmarha specifikus primerpár esetén 256 bp, a bivaly specifikus primerpárnál 226 bp. Az amplikonokat GelRed-del (Biotium, USA) festett 2 m/v%-os agaróz gélen, elektroforézissel (4 V/cm-en, 1×TAE puffer) vizsgáltuk.

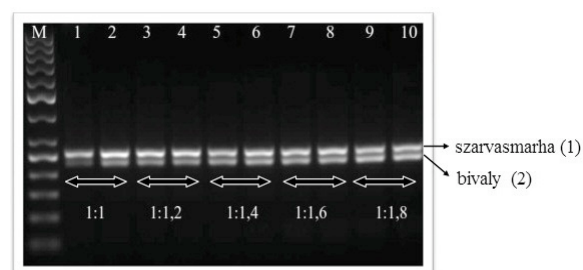
EREDMÉNYEK

Tejkeverékek vizsgálati eredményei

A szarvasmarha és a bivaly primerek arányának optimalizálása során a DNS sávintenzitások egységesítése volt a cél. Azért tartottuk meghatározó lépésnek az egységesítést, hogy a későbbi munka során a különböző v/v%-ban kevert tejekből tisztított DNS-sel elvégzett PCR-reakciók eredményei jelezzék az adott faj részarányát. Ennek megfelelően az azonos mennyiségű (ng) genomiális DNS alapján történő optimalizálás során a különböző primerarány beállításokat korábbi duplex PCR vizsgálatok alapján terveztük meg, a szarvasmarha/bivaly primerpár arányt a bivaly-specifikus primerpár arányát növelve állítottuk be.

A LabWorks™ program által elvégzett sávintenzitások kvantifikálása alapján a 9. minta két sávjának aránya 51,4/48,6 (szarvasmarha/bivaly), a 10. minta két sávja esetében az arány 50,647/49,353 (szarvasmarha/bivaly). A mért értékeket alapul véve a szarvasmarha-bivaly együttes kimutatásához 1:1,8 (szarvasmarha/bivaly) primerpár arányt alkalmaztunk (1. ábra).

1. ábra: A bivaly- és szarvasmarha-specifikus primerpárok arányának optimalizálása



Megjegyzés: az ábrán feltüntetett arányok a szarvasmarha:bivaly primerarányok

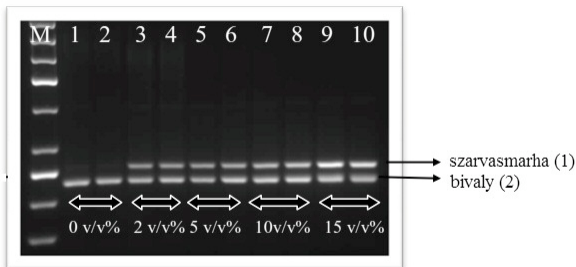
Figure 1: Optimisation of ratio of cattle and buffalo specific primers

Cattle(1), Buffalo(2), Note: the ratios in the figure are the primary proportions of cattle/buffalo

A vizsgálatok során tejkeverékekből származó genomiális DNS-t használtunk fel, ahol a bivalytejet kü-

lönböző arányokban (v/v%) – 0,1%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 5%, 10%, 15% – kevertünk tehéntejjel. Megállapítható, hogy a bivaly/szarvasmarha tejkeverékben 0,5 v/v% volt a kimutathatósági küszöb (2. és 3. ábra).

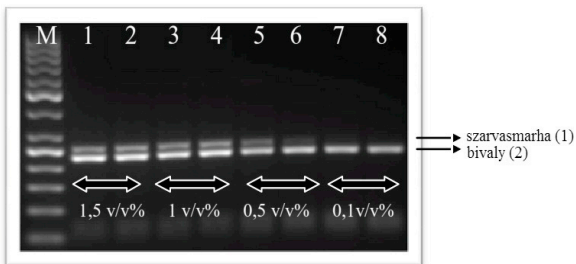
2. ábra: A bivaly/szarvasmarha tejkeverékből származó DNS gélmintázata



Megjegyzés: az ábrán feltüntetett v/v% értékek a szarvasmarhatej jelenlétét jelzik a tejkeverékben

Figure 2: DNA gelpattern of buffalo/cattle milk mixture Cattle(1), Buffalo(2), Note: the v/v% values in the figure represent the presence of cow's milk in the milk mixture

3. ábra: A bivaly/szarvasmarha tejkeverékből származó DNS gélmintázata



Megjegyzés: az ábrán feltüntetett v/v% értékek a szarvasmarhatej jelenlétét jelzik a tejkeverékben

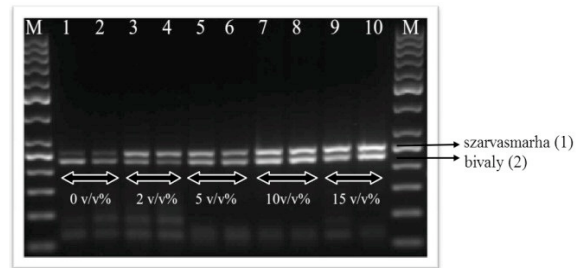
Figure 3: DNA gelpattern of buffalo/cattle milk mixture Cattle(1), Buffalo(2), Note: the v/v% values in the figure represent the presence of cow's milk in the milk mixture

Sajtminták vizsgálati eredményei

A sajtminták vizsgálata során szintén az optimalizált primerpár arányokat használtuk. A vizsgálatokhoz sajtmintákból származó DNS-t amplifikáltunk, ahol a sajt készítés során a bivalytejhez különböző arányokban (v/v%) – 2%, 5%, 10%, 15% – adtunk tehéntejet.

Megállapítható, hogy a bivaly/szarvasmarha tejkeverékben a kimutathatósági küszöb 2 v/v% volt, valamint, hogy a 100 v/v%-ban bivalytejből készített sajt a várakozással ellentétben szarvasmarha DNS-t is tartalmazott (4. ábra). Ennek oka lehet, hogy a sajt készítés során az edények, eszközök elmosása nem volt tökéletes, így tudatos „szennyezés” nem történt, mégis kimutatható a szarvasmarhatej jelenléte. Ez felhívja a figyelmet arra, hogy kis arányú jelenlét a gélen várhatóan nem helytelen piaci gyakorlatot jelent.

4. ábra: A bivaly/szarvasmarha tejkeverékből készült sajtból származó DNS elektroforézisének gélképe



Megjegyzés: az ábrán feltüntetett v/v% értékek a szarvasmarhatej jelenlétét jelzik a sajtkeverékben

Figure 4: DNA gelpattern of cheese from buffalo/cattle milk mixture Cattle(1), Buffalo(2), Note: the v/v% values in the figure represent the presence of cow's milk in the cheese mixture

KÖVETKEZTETÉSEK

A kimutatáshoz felhasznált tejkeverékek a tehéntejet 0,1; 0,5; 1; 1,5; 2; 5; 10; 15 v/v% arányban tartalmazták, a sajtkeverékekben a tehéntej aránya 0; 2; 5; 10; 15 v/v% volt. A tejkeverékek esetében a PCR reakcióban a fajspecifikus primerpárok felhasználásával sikerült elérni a 0,5 v/v%-os kimutatósi határértéket, azonban a 0,1 v/v%-os tehéntej koncentráció kimutatása sikertelennek bizonyult. Így is elmondható azonban, hogy a módszer érzékeny a fajspecifikus szekvenciák kimutatása terén. A sajtkeverékek vizsgálata során mind a négy keverési arány esetében sikerült duplex-PCR reakcióban kimutatni és elkülöníteni a két fajt.

Kemény sajtok esetében, a β -kazein gén specifikus szakaszainak felszaporításával a tehéntej 0,5 v/v%-os jelenlétét kimutatták. Ez az eredmény jelzi a módszer érzékenységét, ugyanis a sajtok érési folyamata során jelentősen degradálódhat a szomatikus sejtekből származó DNS, rontva a kimutatósi lehetőségét (Plath et al., 1997). Tehéntejjel kevert kecsketej vizsgálata során olyan keverékeket készítettek, amelyek 1 v/v%-ban, 0,5 v/v%-ban és 0,1 v/v%-ban tartalmaztak tehéntejet a kecsketej mellett. Ebben a vizsgálatban a tehéntej 0,5 v/v%-os arányát még lehetett detektálni, de a 0,1 v/v%-os arányt már nem, azonban a PCR-rel történő kimutatósi ebben az esetben is érzékenynek mutatkozott (Bottero et al., 2003). Több tanulmány során is a 0,5 v/v%-os arány bizonyult a vizsgálat kimutatósi határértékének (Mayer, 2005; Rodríguez et al., 2005).

Ugyanakkor az eredmények értelmezéséhez érdemes megjegyezni, hogy a termékhamisítások során nem az alacsony részarányban megjelenő idegen faj kimutatása az elsődleges cél, hiszen egy ilyen kismértékű „szennyezés” a gyártó számára nem jár gazdasági előnnyel, ezért jellemzően az nem utal tudatos termékhamisításra sem.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A publikáció elkészítését a TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007 és a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 számú projektek támogatták. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

IRODALOM

- Addeo, F.–Moio, L.–Chianese, L.–Stingo, C.–Di Luccia, A. (1990): Improved procedure for detecting bovine and ovine milk mixtures in cheese by isoelectric focusing of para- κ -casein. *Milchwissenschaft*. 45: 221–224.
- Bottero, M. T.–Civera, T.–Nucera, D.–Rosati, S.–Sacchi, P.–Turi, R. M. (2003): A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows', goats' and sheeps' milk in dairy products. *International Dairy Journal*. 13: 277–282.
- De, S.–Brahma, B.–Polley, S.–Mukherjee, A.–Banerjee, D.–Gohaina M.–Singh, K. P.–Singh, R.–Datta, T. K.–Goswami, S. L. (2011): Simplex and duplex PCR assays for species specific identification of cattle and buffalo milk and cheese. *Food Control*. 22: 690–696.
- Higgins, D. G.–Bleasby, A. J.–Fuchs, R. (1992): CLUSTAL W: Improved software for multiple sequence alignment. *Computer Applications in the Biosciences*. 8: 4420–4449.
- Kocher, T. D.–Thomas, W. K.–Mayer, A.–Edwards, S. V.–Pääbo, S.–Villablanca, F. X.–Wilson, A. C. (1989): Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 86: 6196–6200.
- Lumley, I. D. (1996): Authenticity of meat and meat products. [In: Ashurst, P. R.–Dennis, M. J. (eds.) *Food authentication*.] Blackie Academic and Professional. 108–139.
- Mayer, H. K. (2005): Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. *International Dairy Journal*. 15: 595–604.
- Plath, A.–Krause, I.–Einspanier, R. (1997): Species identification in dairy products by three different DNA-based techniques. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*. 205: 437–441.
- Rodríguez, M. A.–García, T.–González, I.–Hernández, P. E.–Martín, R. (2005): TaqMan real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures. *Meat Science*. 70: 113–120.
- Rolland, M. P.–Bitri, L.–Besancon, P. (1995): Monospecificity of the antibodies to bovine α s1-casein fragment 140–149: application to the detection of bovine milk in caprine dairy products. *Journal of Dairy Research*. 62: 83–88.
- Zsolnai, A.–Orbán, L. (1999): Accelerated separation of random complex DNA patterns in gels: comparing the performance of discontinuous and continuous buffers. *Electrophoresis*. 7: 1462–1468.