

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Fajspecifikus húszonosítás
polimeráz láncreakción alapuló
technikákkal

Jánosi Anna

Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet
Budapest
2006

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: Dr. Fekete András
egyetemi tanár, DSc
BCE, Élelmiszertudományi Kar,
Fizika-Automatika Tanszék

Témavezető: Dr. Hajós Gyöngyi
osztályvezető, egyetemi magántanár, DSc
Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet
Élelmiszerbiztonsági főosztály, Táplálkozástudományi Osztály

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.



Dr. Fekete András
iskolavezető



Dr. Hajós Gyöngyi
témavezető

1. ELŐZMÉNYEK

A húsok és hústermékek alapvető szerepet töltenek be táplálkozásunkban, elsősorban nagy biológiai értéket képviselő fehérje- és kedvező makróelem-összetételüknel fogva. A különböző húsok azonosítása napjainkban egyre fontosabbá váló feladat, mivel az élelmiszeriparban is meghatározóvá válik a fogyasztóvédelem és a minőségbiztosítás. Az állatfajok azonosítása a termékhamisítás, egészségvédelem, export-import ellenőrzések, vallási fogyasztási tabuk, állatvédelem, bűnügyek felderítésének területein válhat jelentőssé. Az élelmiszeripar számára a termék összetétel és a jelölés szabályozását tekintve a 2003. évi LXXXII. Élelmiszer Törvény, a 19/2004 (II.6) FVM-ESZCSM-GKM rendelet (a 90/2005 (X. 13) és 167/2004 (XI.29) módosításai) és a Magyar Élelmiszerkönyv előírásai irányadóak. Ennek megfelelően szükség van olyan analitikai módszerek kidolgozására és fejlesztésére, melyekkel egy összetett élelmiszer-rendszerben is megvalósítható a szelektív, faj-specifikus eredet azonosítás.

Az irodalom számos módszert ismertet, melyek jelentős része a gyakorlatban is alkalmazott fehérje- vagy DNS-alapú azonosítás elvén működik. Az izoelektromos fókuszálás (IEF) és az immunanalitikai technikák (ELISA, immunkromatográfia) általánosan használt fehérje- alapú módszerek. Az izoelektromos fókuszálás alapja a fehérjék pH gradiensben történő elválasztása, mely elválasztást követően a fehérjesávok *Commassie blue*, ezüst vagy pszeudoperoxidáz festéssel tehetőek láthatóvá. Ezek a módszerek azonban nem alkalmasak vörösáru és konzerv-típusú hústermékek vizsgálatára, mivel a legtöbb oldható fehérje a tartósítási eljárások során aggregálódik vagy degradálódik. A húsfhérjék és az ellenanyagok kovalens kötésű immunkomplexének kimutatásán alapuló immunanalitikai technikák egy része hőkezelt termékek esetében is működik. Hátrányuk azonban, hogy egyes fajok egymás melletti kimutatása esetében (csirke-pulyka; sertés-vaddisznó; marha-birka-szarvas) a kifejlesztett immunszérumok keresztaktivitást mutathatnak. Emellett probléma lehet az is, hogy a fehérjék mennyisége kortól, fajtától, takarmányozástól és szövet típustól függő ingadozást mutat. A DNS-alapú módszerek nagy előnye, hogy a DNS szekvencia az adott élőlényre jellemző, minden sejtjében azonos és nem változik meg a hőkezelés hatására, viszont a vizsgálati módszereknél figyelembe kell venni a fragment-méret jelentős csökkenését. A technikák közül leginkább a DNS sokszorozáson alapuló PCR-módszerek (egyszerű-PCR, RAPD-PCR, multiplex-PCR, PCR-RFLP, real-time PCR) különböző változatai terjedtek el. Élelmiszeranalitikai célú, faj-specifikus vizsgálatok publikációi a nemzetközi szakirodalomban megtalálhatók, kevés azonban a terméktípus modelleken alapuló vizsgálat. A hazai gyakorlatban elsősorban a fehérje bázisú ELISA kit-ek használata terjedt el, azonban egyre

többször merülnek fel olyan speciális analitikai feladatok, melynek megoldásához specifikus, nagyobb érzékenységű PCR technikák szükségesek.

2. CÉLKITÚZÉSEK

A fentiek ismeretében céloom volt:

- DNS-re alapozott, polimeráz láncreakción (PCR) alapuló analitikai eljárások kifejlesztése haszonállatok (marha, sertés, csirke) húsmintáinak szelektív elkülönítésére.
- Modell vizsgálati módszer kidolgozása a DNS kivonás hatékonyságának és a polimeráz láncreakción alapuló technikák (egyszerű-PCR, PCR-RFLP) kimutatási határértékének meghatározására.
- Haszonállatok húsanak (marha, sertés, csirke) faj-specifikus kimutatásához alkalmazott egyszerű-PCR és PCR-RFLP technika vizsgálata vörösáru típusú modellek alapján.
- Haszonállatok húsanak (marha, sertés, csirke) faj-specifikus kimutatásához felhasznált egyszerű-PCR és PCR-RFLP módszerek vizsgálata konzerv típusú modellek alapján.
- Kereskedelmi forgalomból származó hústermékek véletlenszerű szűrése faj-specifikus húseredet kimutatás céljából.
- Egyszerű-PCR, valamint restrikciós fragmenthossz polimorfizmust detektáló PCR módszerek fejlesztése nagyvad fajok (vaddisznó, szarvas, őz, muflon) húsmintáinak haszonállatok húsmintáitól való elkülönítésére, illetve az egyes nagyvad fajok meghatározására.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgálati minták. A sertés és marha húsokat közvetlenül a vágóhídról, a csirke és pulyka húsokat kereskedelmi forgalomból szereztem be. A vadhúsok a Mavad Rt. Vecsési és az Öreglaki Vadfeldolgozóból származtak, a muflon húst a Pilisi Parkerdő Gazdaság biztosította. A PCR-módszer tesztelésére 30% összhús tartalmú vörösáru típusú modellt, és 60% összhús tartalmú, konzerv-jellegű modellt használtam fel, melyek hozzáadott sót, vizet és szójafehérje-izolátumot is tartalmaztak.

Polimeráz láncreakción alapuló technika. A DNS-izolálást proteináz-K enzimes előkezelést követően Wizard DNA Clean Up technikával végeztem húsmintákból, összetett modellekből és élelmiszerekből (vörösáruk, májasok és konzervek). Összehasonlításként a húsmintákból proteináz enzimes kezeléssel kombinált, cetil-trimetil-ammónium-bromidos extrakciós (CTAB) technikával is végeztem DNS-izolálást. A sterilizett mintáknál és konzerv élelmiszereknél a mintamátrix izolálás előtti koncentrálásához Amicon ultraszűrő (vágási érték 10000 Dalton \approx 50 bp duplaszálú DNS) rendszert használtam fel. A tiszta DNS-oldat koncentrációjának és tisztaságának (jellemzője: $R = A_{260/280}$) ellenőrzésére spektrofotometriás mérést, összetöredezetttségének meghatározására gél-elektroforézist végeztem, 2% -os agarózgél felhasználásával Tris-bórsav-EDTA pufferben.

A sokszorozódó DNS-szakasz a sertés-specifikus primerpár (Sw01-Sw02) esetében a növekedési hormont kódoló gén 108 bázispár hosszúságú szakasza volt. A marhahús faj-specifikus vizsgálatának alapja, a marha növekedési hormont kódoló gén 130 bázispár hosszú szakaszának felsokszorozása volt Ca03-Ca04 primerpár segítségével. A mitokondriális, citokróm b fehérjét kódoló gén 359 bp-os fragmensének, RsaI enzimmel végzett PCR-RFLP vizsgálatán alapult a csirke faj-specifikus detektálása.

A vadhúsok szelektív meghatározására és a marha, valamint sertés hústól való elkülönítésére egy egyszerű, citokróm b fehérjét kódoló, mitokondriális DNS-alapú PCR-rendszert (RD1-RD-2 primerek), valamint két különböző restrikciós enzimmel (AluI és HinfI) végzett PCR-RFLP technikát használtam. Ez utóbbi esetekben a kimutatás alapja szintén a mitokondriális gén 175 bp (Scytb1-Scytb2 primerek) és 359 bp (Cytb1-Cytb2 primerek) szakasza volt.

A termékanalízist minden esetben poliakrilamid gélelektroforézissel végeztem, a géleket 15 percig etidium-bromiddal festettem, majd megfelelő szűrőfeltét alkalmazása mellett KODAK EDAS 290 rendszerrel fotóztam és értékeltem.

4. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Haszonállatok (marha, sertés, csirke) húsmintáinak szelektív elkülönítése és kimutatása modell rendszerekben, valamint kereskedelemről származó élelmiszermintákban PCR - és PCR-RFLP módszerekkel

Különböző haszonállat fajokból származó minták (marha, sertés, csirke) egymás melletti szelektív kimutatását DNS-alapú, egyszerű polimeráz láncreakcióval (egyszerű-PCR) és restriktív fragmenthossz polimorfizmuson alapuló polimeráz láncreakcióval (PCR-RFLP) végeztem el. A módszer megalapozását, a DNS kivonás hatékonyságának vizsgálatát és a láncreakciók kimutatási határértékének meghatározását vörösáru és konzerv-típusú, szójafelhérjé is tartalmazó húsmodellek felhasználásával végeztem el.

Az egyszerű PCR-rendszerekben az SW01-SW02 primerpárral kizárólag a sertéshús DNS mintájából, a Ca03-Ca04 primerpárral egyedül a marhahúsból izolált DNS mintából kaptam jól látható, erős jelet. A többi vizsgált húsminta (csirke, pulyka) DNS-e, valamint a szója és a búza DNS mintái nem adtak PCR jelet. A csirkehús kimutatására a mitokondriális gén, citokróm b fehérjé kódoló régiójának Cytb1 – Cytb2 primerpárral felszaporított, 359 bp hosszú szakaszának fragmenthossz-polimorfizmusán alapuló PCR-RFLP-rendszert alkalmaztam. Ez esetben minden vizsgálatba vont faj (marha, sertés, csirke és pulyka) DNS mintájából kaptam PCR terméket, majd ezt RsaI restriktív enzimmel hasítva a csirke esetében kettő (210 bp, 149 bp), a pulykánál három (149 bp, 109 bp és 101 bp) kisebb méretű fragmenst nyertem. Friss húsok esetében a Wizard technikával megfelelő mennyiségű (átlagosan 8,59 µg DNS/100 mg minta) és „PCR tiszta” ($1,7 < R < 2,0$) DNS-oldatot tudtam izolálni, míg a CTAB módszerrel az átlagos R érték nem érte el az 1,7-et ($R=1,54$). 1,7-es R érték alatt a minta fehérje szennyezést, 2,0 fölött RNS szennyezést tartalmaz. A későbbiekben ezért a Wizard technikát használtam a modellek és az élelmiszerek DNS-izolálásához.

A konzerv modellek és sterilizált hústermékek fragmentálódott DNS-tartalmának kinyerésére megnöveltem a kiindulási minta mennyiségét (300 mg-ról 1,5 g-ra) és az enzimes előkezelés után a mintatérfigotot szűrővel koncentráltam. Ezzel a módosítással egy lépésben növelhető volt a DNS kinyerés. A kialakított módszereket laboratóriumban előállított, nyers hús-hús keverékeken, összetett, vörösáru típusú (78 °C térhőmérsékleten, 45 percig) és sterilizált konzerv (121 °C, 50 percig) modelleken teszteltem. Az izolálás során 300 mg mintából kinyerhető összes DNS mennyisége a kiindulási nyers keverékhez képest 24-29 µg-ról,

sterilezett mintában lecsökkent 7-9 μg -ra, mellyel párhuzamosan a DNS átlagos fragmensmérete 500 bp alá esett vissza. Vörösárukból és a májasokból mintától függően 8-45 μg DNS/ 300 mg minta volt kinyerhető.

Sterilezett mintáknál a koncentrációval a modellekben 20-37 μg , a termékekben 127-320 μg DNS volt izolálható egy lépésben 1,5 g kiindulási anyagból. Megállapítottam, hogy az ismert összetételű mintákkal nyers és vörösáru típusú, összetett modellrendszerben a kimutatás azonos érzékenységgel 0,5 %-os keverékben is megvalósítható. A konzerv modellkeveréknél azonban a feldúsított DNS tartalommal és nagyobb ciklusszámmal javított reakció is csak a 10 %-os keverékben adott pozitív jelet.

A továbbiakban a beállított PCR és PCR-RFLP technikákkal kereskedelmi forgalomból származó húsipari termékminták elemzését végeztem el marha, sertés, csirke eredetű összetevők kimutathatóságára, majd az eredményeket összevettem a címke jelölésekkel. A vizsgálatok során eltéréseket tapasztaltam minden vizsgált termék-csoportban. Élelmiszervizsgálati eredményeimmel hézagpótló adatokat gyűjtöttem a belföldi gyártóktól származó húsipari termékek DNS-alapú jellemzésével.

Haszonállatok (marha, sertés) és nagyvad fajok (vaddisznó, őz, szarvas, muflon) húsmintáinak egymás melletti szelektív kimutatása

Kutatásaim másik iránya a vadhúsok egymás melletti meghatározása és haszonállatoktól való elkülönítése volt. Ez esetben a mitokondriális gén 175 bp, 194 bp és 359 bp szakaszát sokszoroztam, majd a 175 és a 359 bp méretű PCR termékeket AluI és HinfI restriktív enzimekkel hasítottam el. A vizsgálatok során eredményesen különítettem el a hazai nagyvadak (gímszarvas, őz, muflon, vaddisznó) húsmintáit a sertés és a marhahústól a citokróm b fehérjét kódoló gén kimutatásán alapuló 194 bp egyszerű PCR-rendszer felhasználásával. A vadhúsok DNS mintái pozitív jelet adtak, míg a sertés és marha DNS mintákból PCR jel nem képződött. A nemzetközi irodalomban publikált eredményektől eltérően, a vecsési feldolgozókból származó vaddisznó minták mitokondriális génre épített 359 bp PCR-RFLP rendszerben történt vizsgálati eredményei azt mutatták, hogy ennél a populációnál hiányzik a HinfI restriktív enzim hasítási helye.

Vadhúsokból nyert DNS mintákra elsőként alkalmaztam a citokróm b fehérjét kódoló génre épített 175 bp PCR eljárást, melynek segítségével el tudtam különíteni a muflon és vaddisznó húsokat a szarvas-félék mintáitól.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

I. Haszonállatok (marha, sertés, csirke) húsmintáinak kimutatása modell rendszerekben

- 1) A húsipari élelmiszervizsgálatok kibővítése érdekében új, a termékeket jellemző összetételű modellrendszert vezettem be a PCR és PCF-RFLP módszerek adaptációjához.
- 2) A sterilizett, konzerv típusú modellrendszer alkalmazása esetén az erősen fragmentálódott DNS-szakaszokat Amicon Ultraszűrővel besűrítve PCR-sokszorozásra alkalmas, megfelelő mennyiségű és minőségű DNS szakaszokat nyertem.

II. Kereskedelmi minták vizsgálata

- 1) Belföldi húszemek által gyártott termékek esetében hézagpótló összesítő adatokat gyűjtöttem a jelölésekben megadott húsösszetétel, és a DNS alapú vizsgálatokkal igazolt faj-specifikus eredet között.

III. Haszonállatok (marha, sertés) és nagyvad fajok (vaddisznó, őz, szarvas, muflon) húsmintáinak egymás melletti szelektív kimutatása:

- 1) A citokróm b fehérjét kódoló, mitokondriális-eredetű gén 194 bp méretű fragmensének RD1-RD2 primerpárral történő sokszorozásán alapuló PCR-rendszer adaptálásával eredményesen különítettem el a hazai nagyvadak (gímszarvas, őz, muflon, vaddisznó) és a haszonállatok húsának DNS mintáit.
- 2) A citokróm b fehérjét kódoló gén, Cytb1-Cytb2 primerpárral sokszorozott, 359 bp-os PCR-RFLP rendszerű vizsgálatával felderítettem, hogy a vecsési vadfeldolgozóból, négy különböző mintából származó vaddisznó DNS mintából hiányzik a HinfI restrikciós enzim hasítási helye, és megállapításaim szerint ez alkalmas lehet a földrajzi eredet meghatározására.
- 3) Vadhúsokból izolált DNS mintákon elsőként alkalmaztam az Scytb1-Scytb2 primerpárral felszaporított, mitokondriális gén citokróm b fehérjét kódoló génszakaszának 175 bp-os fragmensére épített PCR-RFLP eljárást, amellyel lehetővé vált a muflon és a vaddisznó hús elkülönítése a szarvashústól.

6. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

Az egyszerű-PCR és a PCR-RFLP módszerek az általam kidolgozott modellrendszer és koncentráló lépés együttes alkalmazásával megfelelő analitikai módszert fejlesztettem ki az állatfajok egymás melletti, specifikus kimutatására húsipari alapanyagokban és a feldolgozott húskészítményekben egyaránt.

A továbbiakban azonban lényegesnek tartom a nem izom eredetű összetevők (zsír, zselatin, bőrke és ínpép, tojás) vizsgálatát is, mivel pozitív eredményt adhatnak PCR-rendszerben, amennyiben a termékekben megtalálhatók. A sokszorozandó génszekvenciák kiválasztásánál mitokondriális DNS-módszerek alkalmazását javaslom az erősen hőkezelt termékek vizsgálatára, a sejtekben lévő nagyobb kópiaszámuk miatt. Nagy érzékenységgű, minőségi és mennyiségi vizsgálatokra alkalmazható láncreakciós rendszerek kidolgozásához javaslom a mintavételi módszerek egységesítését, különböző izolálási módszerek fejlesztését és összehasonlítását, valamint a mennyiségi analitika fejlesztéséhez a megfelelő referencia standard sorok kidolgozását.

7. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK ÉS ELŐADÁSOK:

Publikációk

Folyóiratcikkek

1. Szamos, J., **Jánosi A.**, Tamás, B., Kiss, É. (1998): A novel partitioning method as a possible tool for investigating meat I. *Z.Lebensm. Unters. Forsch. A*, 206. p. 208-212.
2. **Jánosi, A.**, Szamos, J. (2001): Comparison of two methods in purification of meat-DNA for PCR. *Acta Alimentaria*, Vol. 30 (1). p. 113- 118.

Konferencia kiadványok

Magyar nyelvű (összefoglalók)

1. **Jánosi, A.**, Gelencsér, É., Hajós, Gy. (1998): Húsok eredetének meghatározására alkalmas immunológiai módszer.
XII. Élelmiszertudományi Konferencia 05.28-29., Előadás összefoglalók 24.o.
2. **Jánosi, A.**, Molnár Mihályné, Gelencsér, É. (1998): Húsok eredetének meghatározása immunológiai és PCR módszerrel.
Magyar Táplálkozástudományi Társaság XXIII. Vándorgyűlése, Pécs, 11.05-07.
Előadás összefoglalók

3. **Jánosi, A.**, Gelencsér, É., Hajós, Gy. (2000): Sertéshús kimutatása PCR módszerrel. MKE Vegyészkonferencia '2000, Debrecen, 07.05-07.07.
Előadás összefoglalók: Agro és élelmiszeranalitikai szekció
4. **Jánosi, A.** (2002): Marha eredetű alkotók detektálása hústermékekben simplex PCR-technikával. XXIX. Óvári Tudományos Napok, Mosonmagyaróvár 2002. okt. 3-4.
Előadások és poszterek összefoglaló anyaga 107.o
5. **Jánosi, A.** (2003): Marha eredetű komponensek detektálása hústermékekben PCR-technikával. HUNGALIMENTARIA 2003, Budapest, 04.23-24.
Előadások és poszterek összefoglaló anyaga 22.o.
6. Ujhelyi, G., **Jánosi, A.** (2003): Génmódosítás tényének kimutatása különböző hústermékekből PCR-technikával.
Lippay J.-Ormos I.-Vas K. Tudományos Ülésszak, Budapest 11.06.-07.
Előadások összefoglaló anyaga 166.o
7. **Jánosi, A.**, Ujhelyi, G., Gelencsér, É. (2005) PCR technika alkalmazási lehetőségei a hústermékek vizsgálatában.
Lippay J.-Ormos I.-Vas K. Tudományos Ülésszak, Budapest 10.19-21.
Előadások összefoglaló anyaga 200.o.

Magyar nyelvű (teljes anyag)

1. **Jánosi, A.**, Ujhelyi, G., Gelencsér, É. (2005) GM és húseredet kimutatási módszerek és lehetőségek élelmiszerekben.
Élelmiszerbiztonsági közlemények III. kötet, "Genetikailag módosított növények" közlésre elfogadva

Nemzetközi konferencia (összefoglaló)

1. **Jánosi, A.**, Gelencsér, É. (2002): Species-specific detection in raw and processed meat products. CEFood Congress, 22-25 September, Ljubljana 2002.,
Book of Abstracts p.163.
2. Gelencsér, É., Hajós, Gy., **Jánosi, A.**, Szabó, E., Pauk, J. (2002): Nutritional evaluation of transformed wheat. CEFood Congress, 22-25 September, Ljubljana 2002., Book of Abstracts, p. 28.
3. Gelencsér, É., Nagy, A., **Jánosi, A.**, Hajós, Gy., Szabó E., Pauk, J. (2003) Biological evaluation of transformed wheat. Novas Perspectivas sobre Conservacao, 22-25 de Junho 2003, Lisboa,
Book of Abstracts, p. 845
4. **Jánosi, A.**, Gelencsér, É. (2004): Species-specific identification of raw meat from wild animal species by PCR-RFLP analysis.
CEFood Congress 27-28 April 2004, Budapest Book of Abstracts, p.172.
CD-ROM Proceedings, Full papers, Poster session 2-Safety P-S-04

5. Ujhelyi, G., **János**, A., Gelencsér, É. (2004): GMO detection in raw and processed meat products by PCR technics.
CEFood Congress 27-28 April 2004, Budapest Book of Abstracts, p.209.
CD ROM Proceedings, Full papers, Poster session 2-Safety P-S-41
6. **János**, A., Ujhelyi, G., Gelencsér, É. (2004.) Determination of foreign DNA uptake from the GM soy in rat model.
Conference of Contaminants and influence of agricultural practices. 18-19 March, 2004. Brussels Book of Abstracts, p.55.
7. **János**, A., Ujhelyi, G., Gelencsér, É. (2005): Species specific detection of chicken in meat models and commercial products by PCR-RFLP analysis.
Rapid methods EUROPE 2005, 24-25, May, Noorwijk
Book of Abstracts, p.96.
8. Ujhelyi, G., **János**, A., Gelencsér, É. (2005): Qualitative and semi-quantitative GMO detection from food samples derived from the hungarian market.
Rapid methods EUROPE 2005, 24-25, May, Noorwijk
Book of Abstracts, p.98.