

Identifikacija mesa lopatara molekularnim metodama

Gomerčić¹, T., M. Sindičić², T. Trupeć³, I. Vranešević³, D. Konjević⁴, Z. Janicki²

Originalni znanstveni rad

SAŽETAK

Utvrđivanje vrste od koje potječe meso u prehrambenim proizvodima pouzdano i jednostavno se može provoditi korištenjem vrsno specifičnih početnica koje ciljaju točno određene kratke odsječke DNK. Cilj našeg istraživanja bila je izrada vrsno specifičnih početnica za umnažanje kontrolne regije mitohondrijske DNK jelena lopatara (*Dama dama*), te optimiziranje protokola lančane reakcije polimeraze (PCR) za korištenje navedenih početnica. Početnice se koriste za identifikaciju jelena lopatara i njegovo razlikovanje od ostalih vrsta, koristeći samo izolaciju DNK, PCR i elektroforezu. Upotreba početnica ispitana je na osam uzoraka jelena lopatara, tri uzorka jelena običnog i tri uzorka srne obične.

Ključne riječi: početnica, mitohondrijska DNK, jelen lopatar, *Dama dama*

UVOD

Identifikacija vrsta na temelju DNK ima sve važniju ulogu u kontroli prehrambenih proizvoda, osobito onih koje sadrže meso divljači. Meso divljači smatra se delikatesom, obilježava ga karakterističan i intenzivni okus, niže razine masnoća i kolesterola, a visoke razine višestruko nezasićenih masnih kiselina, te činjenica da divljač nije tretirana hormonima i steroidima (Fajardo i sur., 2008b). Zbog toga meso divljači ima veću tržišnu cijenu od mesa domaćih životinja i namirnice koje sadrže meso divljači mogu biti neispravno deklarirane u svrhu postizanja većeg profita (Brodmann i sur., 2001). Netočno deklariranje vrste i količine mesa u prehrambenim proizvodima, osim što je protuzakonito, može uzrokovati i zdravstvene probleme potrošača osjetljivih na alergene koji nisu navedeni na deklaraciji, a dolazi i do problema uzrokovanih prehrambenim ograničenjima iz vjerskih razloga (Fajardo i sur., 2007b). Sve to upućuje na potrebu za pouzdanim i jednostavnim metodama za utvrđivanje od koje vrste domaćih i divljih životinja potječe meso u namirnicama (Pfeiffer i sur., 2004).

Tijekom posljednja dva desetljeća lančana reakcija polimerazom (PCR) i sekvencioniranje DNK, kao osnovne istraživačke metode u molekularnoj genetici, postale su učinkovite i ekonomski prihvatljive širem krugu znanstvenika (Awise, 2004). Stoga je danas najpouzdaniji način identifikacije vrsta analiza DNK putem metoda molekularne genetike. Identifikacija se temelji na izolaciji DNK, umnažanju određenog dijela DNK (najčešće mitohondrijske DNK) PCR metodom, te sekvencioniranju PCR produkta, odnosno određivanju sljedova nukleotida. Sljedovi nukleotida se zatim analiziraju pomoću računalnih programa i uspoređuju s referentnim sekvencama, na temelju kojih se određuje pripadnost određenoj vrsti (Awise, 2004). Korištenjem vrsno specifičnih početnica koje umnažaju dijelove DNK isključivo kod jedne vrste, identifikacija se može provesti samo potvrdom umnažanja PCR proizvoda elektroforezom na gelu, bez utvrđivanja slijeda nukleotida sekvencioniranjem.

Cilj našeg istraživanja je bila izrada vrsno specifičnih početnica za identifikaciju jelena lopatara (*Dama dama*) i razvijanje genetičke metode za razlikovanje jelena

1 dr. sc. Tomislav Gomerčić, docent, Zavod za biologiju, Veterinarski fakultet Sveučilište u Zagrebu, Heinzelova 55, 10000 Zagreb.

2 dr. sc. Magda Sindičić, viši asistent, dr. sc. Zdravko Janicki, redoviti profesor, Zavod za biologiju, patologiju i uzgoj divljači, Veterinarski fakultet Sveučilište u Zagrebu, Heinzelova 55, 10000 Zagreb.

3 Tajma Trupeć, Ines Vranešević, studentice, Veterinarski fakultet Sveučilište u Zagrebu, Heinzelova 55, 10000 Zagreb.

4 dr. sc. Dean Konjević, docent, Zavod za veterinarsku ekonomiku i epidemiologiju, Veterinarski fakultet Sveučilište u Zagrebu, Heinzelova 55, 10000 Zagreb.

autor za korespondenciju: magda.sindic@gmail.com

lopatare od ostalih vrsta punorožaca koje obitavaju u Hrvatskoj - jelena običnog (*Cervus elaphus*) i srne obične (*Capreolus capreolus*). Ovom metodom, tkivo jelena lopatare može se identificirati i razlikovati od ostalih vrsta koristeći samo izolaciju DNK, PCR i elektroforezu. Time se izostavlja sekvencioniranje, koje nije dostupno većem broju laboratorija te se olakšava, ubrzava i pojednostavljuje proces identifikacije.

MATERIJALI I METODE

Vrsno specifične početnice izradili smo pomoću aplikacije Primer-blast (Rozen i Skaletsky, 2000) na temelju slijeda mitohondrijske DNK jelena lopatare preuzetog iz genske baze podataka GenBank (GenBank No: AF291895.1). Pri tome su korišteni sljedeći programski parametri:

PCR template: AF291895.1

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Organism: *Homo sapiens*, *Cervus elaphus*, *Capreolus capreolus*, *Sus scrofa*, *Rupicapra rupicapra*

Database: nr

Učinkovitost početnica ispitana je na ukupno 14 uzoraka mišićnog tkiva, od toga na osam uzoraka jelena lopatare (*Dama dama*), tri jelena običnog (*Cervus elaphus*) i tri uzorka mišića srne obične (*Capreolus capreolus*). Uzorci su potjecali od životinja odstrjeljenih tijekom redovite provedbe lovnogospodarskih osnova u Hrvatskoj te su bili pohranjeni u 96% etanolu na -20°C . Za izolaciju DNK iz uzoraka mišića koristili smo komercijalni kit ChargeSwitch[®] gDNA Tissue Kits, Invitrogen, prema protokolu proizvođača.

Prvi korak analiziranja učinkovitosti početnica bila je optimizacija PCR protokola na uzorcima jelena lopatare. Cilj optimizacije je odrediti optimalnu temperaturu pri kojoj se početnica vrsno specifično veže na lanac DNK. Iz tog smo razloga napravili niz PCR reakcija na temperaturnom gradijentu od 57°C do 71°C . Pri tome je za aktivaciju polimeraze korištena temperatura od 92°C tijekom 2 minute, denaturacija kalupa 94°C tijekom 30 sekundi, prijanjanje početnica 57°C do 71°C 30 sekundi, produženje lanca 72°C 2 minute te završno produženje 72°C 10 min. Za pripremu PCR smjese korišten je komercijalni kit "Platinum[®] PCR SuperMix, Invitrogen". Umnažanje dijela kontrolne regije mtDNK je rađeno u smjesi volumena 10 μL koja je sadržavala: 1 μL DNK, 1 μL 2 μM otopine početnica i 9 μL Platinum[®] PCR SuperMix, Invitrogen. Reakcija se provodila koristeći uređaj GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems). Elektroforezom na 1,5%-tnom agaroznom gelu je provjereno da li je došlo da umnažanja PCR produkta Elektroforeza se odvijala na sobnoj temperaturi, pri konstantnom naponu od 90V, 30 min.

REZULTATI I RASPRAVA

Pomoću aplikacije Primer-blast (Rozen i Skaletsky, 2000) izradili smo vrsno specifične početnice za umnažanje dijela kontrolne regije mtDNK jelena lopatare (Dama dama). Početnice se vežu na 399. i 641. lokus kontrolne regije mtDNK jelena lopatare te daju PCR proizvod duljine 243 parova baza (pb) (Tablica 1.).

Tablica 1. Slijed nukleotida vrsno specifičnih početnica za jelena lopatare

	Slijed nukleotida u početnici (5'→3')
Uzvodna početnica	TCGCTCCGGGGCCCATAGACT
Nizvodna početnica	GCTCCGGGGTCGGGGCCTAG

Optimizacijom PCR reakcije na temperaturnom gradijentu od 57°C do 71°C utvrdili smo da se početnice optimalno specifično vežu na temperaturi od 70°C . Zatim smo ispitali učinkovitost dizajniranih početnica za razlikovanje jelena lopatare od ostalih punorožaca prisutnih u Hrvatskoj na osam uzoraka DNK jelena lopatare, tri uzorka jelena običnog i tri uzorka srne obične. Kod šest od ukupno osam uzoraka (75%) jelena lopatare dobili smo PCR proizvod, dok kod uzoraka jelena običnog i srne obične nije dobiven PCR proizvod (Slika 1.). Provjerom izolacije DNK smo utvrdili da kod dva uzorka jelena lopatare kod kojih nismo dobili PCR proizvod izolacija DNK nije uspjela.



Slika 1. Prikaz agaroznog gela nakon elektroforeze PCR proizvoda uzoraka jelena lopatare (L1-L6), jelena običnog (J1-J3) i srne (S1-S3)

Većina znanstvenih istraživanja s ciljem analize mesa i mesnih prerađevina metodama molekularne genetike provedena je na domaćim životinjama (Girish i sur., 2004). Znatno je manje istraživanja identifikacije mesa divljači, iako tržište pokazuje sve veću potrebu za njima. Fajardo i sur. (2007a) dizajnirali su tri vrsno specifične početnice za razlikovanje divljih pripadnika šupljorožaca, divokoze (*Rupicapra rupicapra*), kozoroga (*Capra ibex*) i muflona (*Ovis musimon*). Isti tim znanstvenika (Fajardo i sur. 2008a) je također proveo istraživanje vrsno specifičnih početnica za razlikovanje divlje (*Sus scrofa scrofa*) od domaće svinje (*Sus scrofa domestica*) ciljajući D - petlju kontrolne regije mitohondrijske DNK i jezgrine melanokortin-receptor 1 (MC1R) gene. Pokazalo se da je korištenje vrsno specifičnih početnica koje ciljaju točno određene, kratke odsječke DNK, pouzdana metoda za kontrolu namirnica, posebno kod termički obrađenih uzoraka ili namirnica koje sadrže meso dviju ili više životinjskih vrsta (kobasice, paštete, mljeveno meso itd.) (Montiel-Sosa i sur., 2000). Također ova metoda je jeftinija, brža i pogodnija za rutinske analize velikog broja uzoraka (Herman, 2001).

LITERATURA

Aymerich, T., Picouet, P. A., & Monfort, J. M. (2008): *DecAvisé*, J. C. (2004): The hope, hype, and reality of genetic engineering, Oxford University Press, New York.

Brodmann, P.D., G. Nicholas, P. Schaltenbrand, E.C. Ilg (2001): Identifying unknown game species: experience with nucleotide sequencing of the mitochondrial cytochrome b gene and a subsequent basic local alignment search tool search. *European Food Research and Technology* 212, 491-496.

Fajardo, V., I. González, I. López-Calleja, I. Martín, M. Rojas, T. García, P.E. Hernández, R. Martín (2007a): PCR identification of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*), and mouflon (*Ovis ammon*) targeting specific sequences from the mitochondrial D-loop region. *Meat Science* 76, 644-652.

Fajardo, V., I. González, I. López-Calleja, I. Martín, M. Rojas, P.E. Hernández, T. García, R. Martín (2007b): Identification of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene, *Meat Science* 76, 234-240.

Fajardo, V., I. González, I. Martín, P.E. Hernández, T. García, R. Martín (2008a): Differentiation of European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and domestic swine (*Sus scrofa domestica*) meats by PCR analysis targeting the mitochondrial D-loop and melanocortin receptor 1 (MC1R) genes. *Meat Science* 78, 314-322.

Fajardo, V., I. González, I. Martín, M. Rojas, P.E. Hernández, T. García, R. Martín (2008b): Real-time PCR for detection and quantification of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) in meat mixtures. *Meat Science* 79, 289-298.

Girish, P.S., A.S.R. Anjaneyulu, K.N. Viswas, M. Anand, N. Rajkumar, B.M. Shivakumar (2004): Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. *Meat Science* 66, 551-556.

Herman, B. L. (2001): Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR. *Journal of Dairy Reserch* 68, 429-436.

Montiel-Sosa J.F., Ruiz-Pesini E., Montoya J., Rocalés P., López-Pérez M.J., Pérez-Martos, A. (2000): Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 2829-2832.

Pfeiffer, I., Burger J., Brenig B. (2004): Diagnostic polymorphisms in the mitochondrial cytochrome b gene allow discrimination between cattle, sheep, goat, roe buck and red deer by PCR-RFLP, *Genetics* 5, 30.

Rozen, S., Skaletsky H.J. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. U: Krawetz, S., S. Misener (urednici) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, 365-386.

Doštavljeni: 22.5.2015.

Prihvaćeno: 24.6.2015.

Identifizierung von Damhirschfleisch anhand von molekularen Methoden

ZUSAMMENFASSUNG

Die Bestimmung der Sorte, von der das Fleisch in Lebensmittelprodukten stammt, kann zuverlässig und einfach durch den Einsatz von artenspezifischen Primern durchgeführt werden, die auf genau festgelegte kurze DNA-Abschnitte ausgerichtet sind. Ziel unserer Untersuchung war der Entwurf von artenspezifischen Primern für die Vermehrung der Kontrollregion mitochondrialer DNA beim Damhirsch (*Dama dama*) und die Optimierung des Protokolls der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für den Einsatz der genannten Primer. Die Primer werden für die Identifizierung des Damhirsches und seine Differenzierung von anderen Sorten eingesetzt, ausschließlich anhand der DNA-Reinigung, Polymerase-Kettenreaktion und Elektrophorese. Der Einsatz von Primern wurde an acht Damhirschproben untersucht, wovon drei vom Rothirsch und drei vom Europäischen Reh.

Schlüsselwörter: Primer, mitochondriale DNA, Damhirsch, *Dama dama*

Identificación de la carne de los gamos comunes por los métodos moleculares

RESÚMEN

La identificación de la especie de la que proviene la carne en los productos alimentarios se puede realizar fiable- y simplemente, usando los cebadores específicos que se unen a las secuencias del ADN específicas. El objetivo de este estudio fue formar cebadores específicos para multiplicación de la región control del ADN mitocondrial del gamo común (*Dama dama*) y la optimización del protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el uso de los cebadores mencionados. Los cebadores se usan para la identificación del gamo común y su diferenciación de otras especies, usando solamente la isolación del ADN, PCR y electroforesis. El uso de los cebadores fue examinado en ocho muestras del gamo común, tres muestras del ciervo común y en tres muestras del corzo.

Palabras claves: cebador, genoma mitocondrial (ADNmt), gamo común, *Dama dama*

Identificazione della carne di daino con metodi d'indagine molecolare

SUNTO

L'accertamento della specie da cui proviene la carne nei prodotti alimentari può essere compiuto in modo affidabile e semplice mediante l'uso di specifici inneschi (primer) che puntano esattamente determinati corti frammenti di DNA. Lo scopo della nostra ricerca consiste nel produrre inneschi specifici per la moltiplicazione della regione di controllo del DNA mitocondriale del daino (*Dama dama*), e ottimizzare il protocollo della reazione a catena della polimerasi (PCR) per l'impiego dei suddetti inneschi. Gli inneschi sono impiegati per l'identificazione della carne di daino e per la sua differenziazione dalle altre specie mediante isolamento del DNA, reazione a catena della polimerasi (PCR) ed elettroforesi. L'impiego degli inneschi è stato testato su otto campioni di daino, tre campioni di cervo comune e tre campioni di capriolo.

Parole chiave: innesco (primer), DNA mitocondriale, daino, *Dama dama*