

OPTIMALISATION OF SPECIES IDENTIFICATION OF COMMON CARP (*CYPRINUS CARPIO*) USING SYBR® GREEN I REAL-TIME PCR METHOD

Pavol Bajzík, Radoslav Židek, Jozef Golian, Eubomír Belej, Jozef Čapla, Lenka Maršáľková, Ondrej Revák

ABSTRACT

European Union Member States, together with a number of countries around the world, places great emphasis on ensuring the protection of consumers as a potential food allergic from food allergies. to inform consumers that their product may contain any of the risk of allergenic ingredients. For species identification of fish and fish products as a potential food allergens are used by many analytical methods as well as their authentication. We are in our work applied the method of SYBR® Green I. Real-Time PCR. We focused on pre-designed molecular - genetic marker of common carp (*Cyprinus carpio*), which comes from the mtDNA control D - loop area. We analyzed its presence in DNA isolates from the 5 kinds of freshwater fish, diluted to 10 % concentration. Results of using the optimized SYBR® Green I Real-Time PCR method for species identification common carp (*Cyprinus carpio*) indicate to its suitability.

Keywords: species identification, SYBR® Green I. Real-Time PCR, *Cyprinus carpio*

ÚVOD

Potreba identifikácie rybiech produktov v potravinách je v súčasnosti aktuálnou témou pre spotrebiteľov, ako aj producentov potravín. Záujem spotrebiteľov je motivovaný na jednej strane zdravou životosprávu, ktorá preferuje rybie produkty, ako nenahraditeľnú zložku potravy a na druhej strane, je to potenciálny alergén spôsobujúci zdravotné problémy u ľudí alergických na rybie proteíny. Alergia je jav, ktorý výrazne ovplyvňuje ľudské zdravie, ako aj celkovú dĺžku života jedinca. Prevažná časť populácie znáša rôzne druhy potravín bez akýchkoľvek zdravotných problémov. U malého percenta ľudí určité druhy potravín môžu vyvolať negatívne reakcie, v rozmedzí od ľahkého začervenania kože až po fatálne, život ohrozujúce alergické reakcie (Rimárová, Lovayová, 2007).

Potravinové alergie predstavujú v súčasnosti rastúci problém pre rýchlo sa rozvíjajúci potravinársky priemysel. Štatistiky uvádzajú, že celosvetovo v priemere 4 - 6 % detí a 2 - 4 % dospelaj populácie trpí rôznymi formami potravinových alergií (Boye, 2010).

V USA sa výskyt nežiaducich imunitných reakcií na potraviny neustále zvyšuje. Potravinovými alergiami pritom trpí približne 5 % malých detí a 3 - 4 % dospelých. Alergické reakcie sú zodpovedné za celý rad symptómov od poškodenia kože, cez poruchy dýchacieho ústrojenstva až po gastrointestinálne ťažkosti (Sicherer, Sampson 2010).

Na území Európy sú ryby a výrobky z rýb hneď po vajciach a kravskom mlieku tretím najčastejším potravinovým alergénom spôsobujúcim ochorenia u detí mladších ako 2 roky. Prevencia spočíva hlavne v eliminácii konzumácie rýb a rybiech zložiek v potravinách, a to najmä v takých krajinách, kde je ich konzumácia vysoká. Jedná sa hlavne o Škandinávске krajiny, Španielsko a Portugalsko (Pascual, 2008).

Detekcia alergénnych zložiek v potravinách si získava v posledných rokoch stále väčšiu pozornosť potravinárskeho priemyslu a taktiež legislatívnych a regulačných orgánov. Výsledkom toho sú zlepšené opatrenia zamerané na ochranu spotrebiteľov pred

alergénymi potravinami. Riadená výroba potravinárskych výrobkov a kontrolná činnosť inšpekčných orgánov dohliada na dostupnosť metód schopných zistiť prítomnosť alergénnych zložiek v potravinách. Rozvoj týchto metód však čelí množstvu analytických problémov. Výskumní pracovníci na celom svete neustále vyvíjajú nové metódy pre detekciu prítomnosti množstva potravinových alergénov v rôznych potravinárskych výrobkoch. Niekoľko metód, ktoré boli doteraz vyvinuté, sú schopné odhaľovať prítomnosť alergénov, čo vedie k zlepšeniu ochrany zdravia spotrebiteľov. Avšak, nie všetky hlavné alergény sa dajú detegovať z rovnakou spoľahlivosťou. Stále je tu potrebný výskum týkajúci sa presnosti, citlivosti, časovej a finančnej náročnosti, selektivity a spoľahlivosti zvolených analytických metód (van Hengel, 2007).

Niektoré z analytických metód nevyužívajú na detekciu prítomnosti alergénnych zložiek špecifické alergénne proteíny, ale skôr indikačný marker prítomnosti potenciálnych alergénnych potravín. V zásade však všetky komponenty, ktoré sú zodpovedné za alergénnosť potravín môžu slúžiť ako marker pre ich odhalenie prítomnosti v potravinárskych výrobkoch. V praxi sa ako cieľové markery pre tento účel využívajú špecifické proteíny, alebo špecificky navrhnuté primery komplementárne k cieľovej sekvencii DNA (Poms et al., 2004).

Identifikácia rybiech druhov v potravinových produktoch je problematická, pretože morfológické znaky rýb sú čiastočne alebo kompletne stratené počas tepelnej úpravy. Je dôležité určiť druh ryby, pretože zvyšujúci sa medzinárodný obchod s morskými produktmi a nariadenie Európskej komisie 104/2000 požadujú, aby boli korektné a správne označené. V posledných rokoch bol z dôvodu zmeny správania spotrebiteľov zaznamenaný veľký nárast v konzumácii rýb a to hlavne zo zdravotných a nutričných dôvodov. Rybie druhy môžu byť identifikované erudovanými rybármi, veľkoobchodníkmi, majiteľmi reštaurácií a spotrebiteľmi, pokiaľ je ryba v celku. Avšak, ak je ryba vo forme filetu, identifikácia je ťažšia. Ďalšie komplikácie prichádzajú

s úpravou rýb (mletie, obalovanie, pečenie). Tu je riziko, že môže úmyselne alebo neúmyselne prichádzať k zámene hodnotnejších rýb, za ryby s nižšou hodnotou (Mackie, 1996).

Pre rybie druhy bolo vyvinutých mnoho analytických metód, ktoré sú vykonávané prostredníctvom proteínových analýz: elektroforetické ako aj izoelektrické techniky a SDS-PAGE (Ataman et al., 2006; Kvasnička, 2005); chromatografické techniky (Hubalkova et al., 2007; Horstkotte a Rehbein, 2003) a imunologické techniky ako imunodifúzia a ELISA (Asensio et al., 2008; Civera, et al., 2003; Moretti et al., 2003). Hoci mnohé z týchto metód sú považované v určitých prípadoch za vhodné, nie sú použiteľné pre rutinnú analýzu, pretože proteíny strácajú biologickú aktivitu ihneď po smrti zvieratá a ich prítomnosť a charakteristika závisí od typu bunky. Okrem toho je väčšina z nich termolabilná. Preto sú pre identifikáciu tepelne spracovaných produktov z rybiech druhov preferované DNA metódy viac ako proteínové (Asensio, 2007; Dietrich et al., 2010).

V porovnaní s analýzami proteínov predstavujú DNA orientované metódy niekoľko zásadných výhod. Na analyzované vzorky DNA môžeme vplývať rôznymi druhmi spracovania (konzervovanie, tepelná úprava). Molekuly DNA sú odolnejšie a termostabilnejšie ako molekuly proteínov. Už aj veľmi malé DNA fragmenty, obsahujúce dostatočné množstvo informácií, je možné amplifikovať pomocou PCR reakcie a zabezpečiť ich identifikáciu. DNA môže byť potenciálne vyizolovaná z akéhokoľvek substrátu, pretože je prítomná takmer vo všetkých bunkách organizmu. Navyše degenerovanosťou genetického kódu a prítomnosťou mnohých nekódovaných regiónov, poskytuje DNA oveľa viac informácií ako bielkoviny. Znamená to obrovský pokrok v molekulárnej biológii, kde sú poskytnuté možnosti identifikácie všetkých druhov rýb, v podstate z akéhokoľvek druhu organického substrátu (svaly, plutvy, krv) (Lockley a Bardsley, 2000; Teletchea et al., 2005).

Tabuľka 1 Vybrané druhy sladkovodných rýb

Číslo vzorky	Slovenský názov	Latinský názov
1.	Lipeň tymiánový	<i>Thymallus thymallus</i>
2.	Úhor sťahovavý	<i>Anguilla anguilla</i>
3.	Štuka severná	<i>Esox lucius</i>
4.	Jalec hlavatý	<i>Leuciscus cephalus</i>
5.	Kapor obyčajný (pozitívna kontrola)	<i>Cyprinus carpio</i>
6.	CYBR H ₂ O (negatívna kontrola)	

Tabuľka 2 Zloženie mastermixu pre vzorku

Číslo označenia v sklade	Komponenty PCR reakcie	Koncentrácia	Objem jednej vzory (μl)	Objem 6 vzoriek (μl)
126	CYBR H ₂ O		15	90,0
124	SYBR Green I	1x	2	12,0
125	CYBR MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	0,8	4,8
107	CARP – F	0,5 pmol/ μl	0,1	0,6
108	CARP – R	0,5 pmol/μl	0,1	0,6
	DNA		2	12,0
Σ			20	120,0

MATERIÁL A METÓDY

DNA sme izolovali z 5-tich druhov sladkovodných rýb (tabuľka 1) pričom sme pracovali podľa protokolu na izoláciu čistej DNA z jedla. DNA vzoriek sme následne zriedili na 10 % koncentráciu.

Primerový pár použitý na analýzy bol navrhnutý v súlade s metódkou (Židek a Golian, 2008). Sekvencie primerov boli nasledovné:

- Carp1-F (5'-TGGCATCTGGTTCCTATTTCA-3'),
 - Carp1-R(5'-CCAAAGGGGGCACTATGTAA-3'),
- pričom amplifikujú 321 bp dlhý úsek fragmentu DNA špecifického pre všetky druhové línie kapra obyčajného (*Cyprinus carpio*).

Hlavnou zložkou v objeme reakčnej zmesi (mastermix) bol 2 μl SYBR[®] Green I Hot Start Real-Time PCR, ktorý

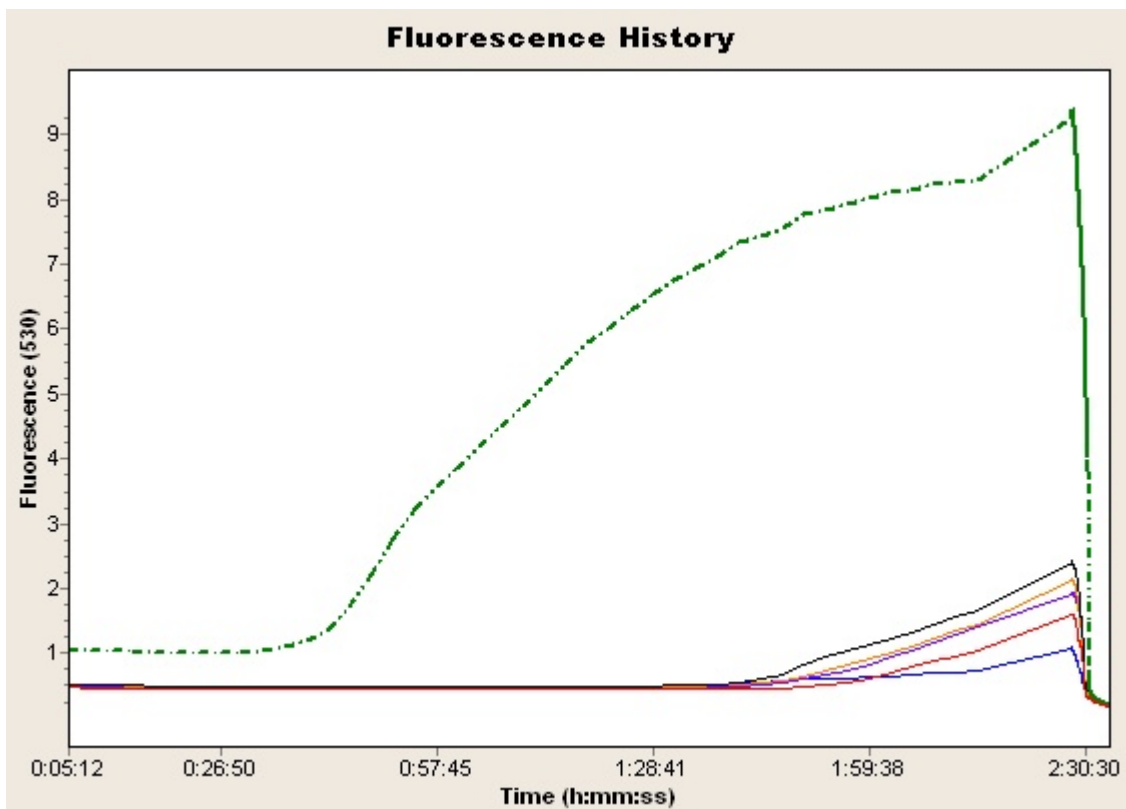
bol doplnený o 0,8 μl CYBR MgCl₂, ďalej 0,1 μl z každého primeru a 2 μl templátovej DNA na reakciu. Reakčný roztok bol doplnený 15 μl bidestilovanej vody do celkového objemu 20 μl (Tab. 2).

PCR cyklus začal pre-denaturáciou pri teplote 95 °C po dobu 2 minút. Následne bolo zopakovaných 50 cyklov s teplotným profilom: 45 s. pri 95 °C, 45 s. pri 60 °C, 1 min. 20 s. pri 72 °C s následným meraním fluorescence. Finálne predĺžovanie fragmentov prebehlo pri 72 °C po dobu 10 minút. Krivka topenia PCR produktov bola spustená zahriatím vzorky na 95 °C a okamžitým schladením na 65 °C po dobu 15 sekúnd. Vzorka bola zahrievaná rýchlosťou 0,1 °C za sekundu a pri každej zmene teploty o desatinu stupňa bola odmeraná fluorescence. PCR reakcia prebiehala v kapilárovom

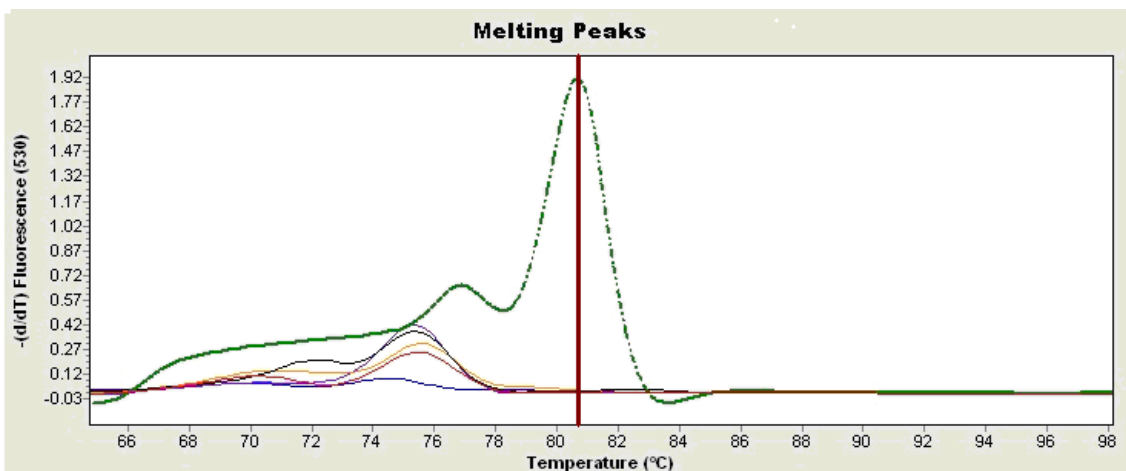
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Ako vyplýva z obrázku 1 k najvčasnejšiemu nárastu fluorescence a k vytvoreniu špecifickej krivky so svojou exponenciálnou a lineárnou fázou došlo pri pozitívnej kontrole (kapor obyčajný). V ostatných vzorkách (lípeň tymiánový, úhor s'ahovavý, jalec hlavatý, š'uka severská, negatívna kontrola - CYBR H₂O) došlo k minimálnemu nárastu fluorescence, pričom vytvorené krivky neboli natoľko špecifické, aby sme mohli povedať, že došlo ku prekročeniu špecifického pozadia.

Na základe obrázku 2 môžeme vytvoriť analýzu sledovaných kriviek, pričom krivka predstavujúca PCR produkt pozitívnej kontroly (kapor obyčajný) obsahuje charakteristický pik (vytvorený pri teplote topenia 80,72 °C), ktorý nám poukazuje na špecifické nasadenie použitého primerového páru. Pri ostatných krivkách PCR produktov zo vzoriek (lípeň tymiánový, úhor s'ahovavý, jalec hlavatý, š'uka severská, negatívna kontrola - CYBR H₂O) môžeme pozorovať vytvorenie nešpecifického pik, čo znamená, že použitý primerový pár je pre tieto vzorky nešpecifický.



Obrázok 1 Priebek nárastu fluorescence PCR produktov pri vzorkách vybraných druhov rýb



Obrázok 2 Priebek krivky topenia PCR produktov pri vzorkách vybraných druhov rýb

Trotta et al., (2005) využili real-time PCR pre identifikáciu rybiech filetov kanic (druh západoindickej a austrálskej ryby) a jej príbuzných druhov. Hird et al., (2005) túto metódu využili na identifikáciu treskovitých rýb. Prítomnosť tejto ryby s koncentráciou viac ako 7 %

ZÁVER

V priebehu evolúcie a domestikácie rýb sa vyvinulo veľké množstvo línií a tým vznikla v ich genóme početná medzidruhová variabilita. Vzhľadom na tento fakt, je potrebné vyvinúť univerzálny marker na identifikáciu druhov vo všetkých ich líniách. Ďalšou podmienkou pre zabezpečenie alergénnej bezpečnosti finálnych výrobkov je identifikácia a detekcia rybiech proteínov aj v rôzne tepelne upravených potravinových výrobkoch.

Ako prostriedok na zohľadnenie oboch vyššie spomenutých požiadaviek sme využili vlastnosti mitochondriálnej DNA. Mitochondriálna DNA vo svojom genóme obsahuje vysoko konzervované úseky

LITERATÚRA

ASENSIO, L., MONTERO, A., 2008. Analysis of fresh fish labeling in Spanish fish retail shops. In *Food Control*, vol. 19, 2008, p. 795-799.

ATAMAN, C., CELIK U., REHBEIN H., 2006. Identification of some Aegean fish species by native isoelectric focusing. In *European Food Research and Technology*, vol. 222, 2006, p. 99-104.

BOYE, J. I., 2010. *Allergen management in the food industry*. New Jersey : Wiley, 2010. 624 p. ISBN 978-0-470-22735-0.

CIVERA, T., 2003. Species identification and safety of fish products. In *Veterinary Research Communications*, vol. 27, 2003, p. 481-489.

DIETRICH, M. A., NYNCA, J., BILIŇSKA, B., KUBA, J., KOTULA-BALAK, M., KAROL, M., CIERESZKO, A., 2010. Identification of parvalbumin-like protein as a major protein of common carp (*Cyprinus carpio L*) spermatozoa which appears during final stage of spermatogenesis. In *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, vol. 157. 2010, p. 220-227.

GIL, L. A., 2007. PCR-based methods for fish and fishery products authentication. In *Food Science & Technology*, vol. 18, 2007, p. 558-566.

HIRD, H. J., HOLD, G. L., CHRISHOLM, J., REECE, P., RUSSELL, V. J., BROWN, J., 2005. Development of a method for the quantification of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) in commercial products using real-time PCR. In *European Food Research and Technology*, vol. 220, 2005, p. 633-637.

HORSTKOTTE, B., REHBEIN, H., 2003. Fish species identification by means of restriction fragment length polymorphism and high performance liquid chromatography. In *Journal of Food Science*, vol. 68, 2003, p. 2658-2666.

HUBALKOVA, Z., KRALIK, P., TREMLOVA, B., 2007. Methods of gadoid fish species identification in food and their economic impact in the Czech Republic:

môže byť detegovaná v surovom, alebo mierne tepelne upravenom produkte.

PCR metódy vrátane komerčných kitov sú vhodné na zistenie autenticity rýb a rybiech produktov, čo dokázal vo svojej práci Gil (2007) a podľa neho sa dajú použiť pri ochrane zákazníka pred falšovanými výrobkami.

v kontrolných oblastiach spoločné pre všetky línie jednotlivých druhov. Okrem toho počas tepelnej úpravy DNA nedenukuje, len fragmentuje, čím sa stáva vhodným analytom.

Výsledky použitia SYBR® Green I Real-Time PCR metódy, na druhovú identifikáciu kapra obyčajného (*Cyprinus carpio*) poukazujú na jej vhodnosť. Včasný nárast intenzity fluorescencie, vytvorenie charakteristickej krivky a vytvorenie charakteristického piketu, nám pri pozitívnej kontrole poukazujú na špecifické nasadenie použitého primerového páru a vhodnosť navrhnutého molekulárno-genetického markera.

a review. In *Veterinary Medicine*, vol. 52, 2007, p. 273-292.

KVASNIČKA, F., 2005. Capillary electrophoresis in food authenticity. In *Journal of Separation Science*. vol. 28, 2005, p. 813-825.

LOCKLEY, A. K., BARDSLEY, R. G., 2000. DNA-based methods for food authentication. In *Trends in Food Science and Technology*, vol.11, 2000, p. 67-77.

MACKIE, I. M., 1996. Authenticity of fish. P. R. Ashurt, M. J. Dennis (Eds.), In *Food authentication*, London: Blackie Academic and Professional, 1996, p.140-170.

MORETTI, V. M., TURCHINI, G. M., BELLAGAMBA, F., 2003. Traceability issues in fishery and aquaculture products. In *Veterinary Research Communications*, vol. 27, 2003, p. 497-505.

PASCUAL, C. Y., RECHE, M., FIANDOR, A., VALBUENA, T., CUEVAS, T., MARTIN-ESTEBAN, M. M., 2008. Fish allergy in childhood. In *Pediatric Allergy and Immunology*, vol. 19, 2008, p. 573-579.

POMS, R. E., KLEIN, C. L., ANKLAM, E., 2004. Methods for allergen analysis in food: a review. In *Food Additives & Contaminants*, vol. 21, 2004, p. 1-31.

RIMÁROVÁ, K., LOVAYOVÁ, V., 2007. Alergény a lepky v potravinách, prístupy k ich detekcii a označovaniu v EÚ. In: *HYGIENA ALIMENTORUM XXVIII „Bezpečnosť a kvalita mlieka a mliečnych výrobkov“*. Slovakia : Štrbské Pleso – Vysoké Tatry, 2007, p. 165-169. ISBN 978-80-8077-055-6.

SICHERER, S. H., SAMPSON, H. A., 2010. Food allergy. In *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 125, 2010, p. S116-S126.

TELETCHEA, T., MAUDET, C., HÄNNI, C. 2005. Food and forensic molecular identification: update and challenges. In *Trends in Biotechnology*, vol. 23, 2005, p. 359-366.

TROTTA, M., SCHÖNHUTH, S., PEPE, T., CORTESI, M. L., PUYET, A., BAUTISTA, J. M., 2005. A multiplex

– PCR Metod for use in real – time PCR for identification of fish fillets from grouper (*Epinephelus spp.* and *Mycteroperca spp.*) and common substitute species. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, 2005, p. 2039 – 2045.

VAN HENGEL, A. J., 2007. Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 389, 2007, p. 111-118.

ŽIDEK, R., GOLIAN, J., 2008. Detection of carp (*Cyprinus carpio*) proteins using genetic markers. In

Proteiny : Sborník příspěvků V. ročníku mezinárodní konference. Zlín : Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008, ps.235-237.

Acknowledgments:

This article was part of the project VEGA 1/0619/10, VEGA 1/1074/11 and KEGA 3/7255/09.

Contact address:

Pavol Bajzík, Department of Food Hygiene and Safety, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: bajzik2@gmail.com

Radoslav Židek, Department of Food Hygiene and Safety, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: radoslav.zidek@uniag.sk

Jozef Golian, Department of Food Hygiene and Safety, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: Jozef.Golian.AF@uniag.sk

Lubomír Belej, Department of Food Hygiene and Safety, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak

University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: lubkoobubko@azet.sk

Jozef Čapla, Department of Food Hygiene and Safety, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: capla@potravinarstvo.com

Lenka Maršáľková, Department of Food Hygiene and Safety, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: marsalkova@gmail.com

Onrej Revák, Department of Food Hygiene and Safety, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, E-mail: ondrej.revak@gmail.com