



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Identifikace masa pangase dolnookého
a pangase obecného metodou real-time PCR**

Mgr. Pavel Krčmář, Ph.D.

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA č. 109/2018

Identifikace masa pangase dolnookého a pangase obecného metodou real-time PCR

Autor

Mgr. Pavel Krčmář, Ph.D.

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu č. QJ1530272 s názvem: Komplexní strategie pro efektivní odhalování falšování potravin v řetězci (prvo)výroba – spotřebitel

Osvědčení o uplatnění certifikované metodiky č.: svspes743abe71a

Vydala: Státní veterinární správa se sídlem Slezská 100/7, 120 56 Praha, dne 14. 1. 2019

ISBN 978-80-88233-54-1

2018

OPONENTI CERTIFIKOVANÉ METODIKY:

prof. Ing. Alžbeta Jarošová, Ph.D.

Agronomická fakulta Mendelovy univerzity, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno

MVDr. Jan Váňa

Státní veterinární správa, Slezská 100/7, 120 56 Praha

I. Cíl metodiky

Cílem práce bylo vypracovat metodu pro identifikaci masa pangase dolnookého (*Pangasianodon hypophthalmus*) a pangase obecného (*Pangasius pangasius*) založenou na amplifikaci druhově specifických sekvencí mitochondriální DNA metodou real-time PCR.

II. Vlastní popis metodiky

Úvod

Pangas patří na potravinovém trhu České republiky mezi oblíbené druhy ryb. Jde o sladkovodní rybu s bílým masem. Je oblíben hlavně u dětí, protože nemá žádné kosti a charakteristickou rybí vůní. Lze ho upravit na různé způsoby - vařit, grilovat, smažit i zapékat. V současné době je nabízen pangas dolnooký (*Pangasianodon hypophthalmus*), a dříve se často prodával i pangas obecný (*Pangasius pangasius*). Tyto ryby jsou obvykle dodávány jako mražené filety. Odlišná kvalita a cena různých druhů ryb může vést výrobce k záměně.

Pro rozlišení jednotlivých druhů ryb na základě sekvencí DNA lze u syrových tj. tepelně neopracovaných vzorků, použít metodu DNA barcodingu, která je založena na sekvenování 655 nukleotidů dlouhého úseku mitochondriální DNA kódujícího část genu cytochrom oxidasy, a následném porovnání získané sekvence s databází DNA sekvencí (Handy S. M., et al., 2011). U tepelně opracovaných výrobků dochází během výrobního procesu k degradaci DNA, proto je nutné použít metodiku, která pro druhové rozlišení využívá kratší úseky sekvencí DNA. Tento požadavek splňuje metoda real-time PCR, která umožňuje stanovit sekvence DNA o velikosti 80 až 300 nukleotidů.

Hlavní obtíží pro vypracování metody pro rozlišení ryb založené na analýze druhově specifických sekvencí DNA je vysoká shodnost sekvencí DNA mezi příbuznými druhy ryb. Kompletní sekvence jaderné DNA je popsána jen u *Pangasianodon hypophthalmus* (Kim O. T. P., et al. 2018). Hlavní pozornost byla proto zaměřena na mitochondriální DNA, neboť tato je popsána u více druhů (Jondeung A., et al.: 2007; Mohindra V., et al.: 2015a; Mohindra V., et al.: 2015b; Nakatani M., et al.: 2011; Zhao H., et al.: 2014).

Navržení primerů a prob pro real-time amplifikaci a určení druhové specificity:

Programem Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) byly srovnány všechny kompletní i částečné sekvence mitochondriální DNA pangasů obsažené v Genové bance (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=>) (viz tabulka níže). Byly určeny oblasti, které jsou variabilní i v rámci téhož druhu, a vyloučeny z dalšího posuzování. Dále byly určeny oblasti, které jsou nejvíce variabilní mezi druhy, a v této části byly navrženy primery a proby pro druhově specifickou amplifikaci *Pangasianodon hypophthalmus* (amplifikační produkt má velikost 300 párů bází) a *Pangasius pangasius* (amplifikační produkt má velikost 145 párů bází).

Tabulka: In siliko srovnané sekvence pangasů (seznam sekvencí k 1. 7. 2018).

Druh	Sekvence mitochondriální DNA (Sequence ID)
<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	KC846907
	HM355767
	AY458881
<i>Pangasius pangasius</i>	KC572135
<i>Pangasianodon gigas</i>	AY762971
	HM355768
<i>Pangasius sanitwongsei</i>	HM355780
<i>Pangasius macronema</i>	HM355776
	HM355777
<i>Pangasius conchophilus</i>	HM355771
	HM355772
<i>Pangasius krempfi</i>	HM355773
<i>Pangasius bocourti</i>	HM355769
	HM355770
<i>Pangasius polyuranodon</i>	HM355779
<i>Pangasius nasutus</i>	HM355778
<i>Pangasius larnaudii</i>	AP012018
	HM355774
	HM355775

<i>Helicophagus leptorhynchus</i>	HM355763
<i>Helicophagus typus</i>	HM355764
<i>Pseudolais pleurotaenia</i>	HM355765
	HM355766

Druhová specifická navržených primerů a prob byla ověřena na vzorcích DNA těchto druhů ryb: *Oncorhynchus mykiss*, *Sparus aurata*, *Oncorhynchus keta*, *Sardinops sagax*, *Salvelinus fontinalis*, *Pollachius virens*, *Theragra chalcogramma*, *Gadus morhua*, *Micromesistius poutassou*, *Katsuwonus pelamis*, *Thunnus albacares*, *Thunnus alalunga*, *Thunnus thynnus*, *Thunnus obesus*, *Thunnus maccoyii*, *Auxis rochei*, *Auxis thazard*, *Euthynnus affinis*, *Euthynnus alletteratus*, *Sarda sarda*.

Dále pro kontrolu přítomnosti amplifikovatelné DNA ryb (zejména pangasů) ve vzorku byly navrženy primery a proba pro stanovení části sekvence mitochondriálního genu 12S rRNA v oblasti konzervativní sekvence pro ryby o velikosti amplifikačního produktu 79 párů bází.

Detekční limit pro tepelně neopracované vzorky izolované za daných podmínek byl určen na hodnotu 37,0 ng DNA/ml vzorku. Limit byl stanoven za základě stanovení koncentrace DNA izolované ze 3 náhodně vybraných vzorků filet po jejich naředění odpovídající 0.1% původního obsahu. Koncentrace DNA byla určena fluorescenční metodou s využitím Qubit dsDNA HS Assay Kitu (Thermo Fisher Scientific) a kvantifikována pomocí Qubit fluorometru (Thermo Fisher Scientific).

Real-time PCR metoda pro stanovení uvedených druhů pangasů byla ověřena na 20 vzorcích rybích filet s deklarovaným obsahem pangase.

Sekvence primerů a sond a detaily o cílových sekvencích jsou na požádání k dispozici u Mgr. Pavla Krčmáře, PhD. z Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 70, Brno, 621 00, email: krcmar@vri.cz, tel 533 331 815.

Popis metodiky

Přístroje a pomůcky

Izolace DNA

váhy PB 303-S/A (třída přesnosti II) (Mettler Toledo)

homogenizátor Mini Beadbeater (Biospec Products)

homogenizátor MagNA Lyser (Roche)

centrifuga 5417 C (Eppendorf)

míchačka VSM 3 (Shelton)

Finpipeta digitální 10-100 µl (třída přesnosti 3,0 %) (ThermoLabsystems)

Finpipeta digitální 100-1000 µl (třída přesnosti 1,0 %) (ThermoLabsystems)

špičky s filtrem (Thermo Scientific Scientific)

suchý blok Bio TDB 100 (Biosan)

zkumavky DNA LoBind 1.5 ml a 2.0 ml (Eppendorf)

Amplifikace DNA

Combi Spin (Biosan)

Multi Spin (Biosan)

Bio Vortex V1 (Biosan)

LightCycler 1.5 (Roche)

LightCycler 480 II (Roche)

LightCycler kapiláry (Roche)

LightCycler stripy (Roche)

Finpipeta digitální 1-10 µl (třída přesnosti 2,5 %) (ThermoLabsystems)

Finpipeta digitální 10-100 µl (třída přesnosti 3,0 %) (ThermoLabsystems)

špičky s filtrem (Thermo Scientific Scientific)

lednička

mrazák

Chemikálie a roztoky

Izolace DNA

chloroform molecular biology grade, kat. č. 39553 (Serva)

etanol absolutní, kat. č. 39556 (Serva)

DNeasy mericon Food kit, kat. č. 69 514 (Qiagen)

Amplifikace DNA

QuantiTect Probe PCR Kit, kat. č. 204 343 (Qiagen)

Oligonukleotidy a proby. Proby jsou značené na 5' konci FAM a na 3' konci zhášedčem BHQ1 (Generi Biotech s.r.o.)

Provedení zkoušky

Izolace DNA

Izolace DNA ze vzorku rybí svaloviny se provádí pomocí komerčního kitu – DNeasy mericon Food Kitu (Qiagen) dle návodu výrobce:

1. Do 2 ml mikrocentrifugační zkumavky se naváží 200 ± 2 mg vzorku rybí svaloviny, přidá se 5 až 10 skleněných kuliček o průměru 2,0 mm, 1,5 ml Food Lysis Bufferu a 10 μ l roztoku Proteinasy K. Směs se zhomogenizuje pomocí přístroje Mini Beadbeater nebo MagNA Lyser.
2. Směs se zahřeje na teplotu 60 °C po dobu 30 min a následně se ochladí ve vodní lázni s kousky ledu po dobu 15 min.
3. Směs se centrifuguje 5 min při rychlosti 2 500 g.
4. Do 2 ml mikrocentrifugační zkumavky se napipetuje 500 μ l chloroformu a přidá se 700 μ l čirého supernatantu. Směs se vortexuje po dobu 15 sec a centrifuguje se 15 min při rychlosti 14 000 g.
5. Do další 2 ml mikrocentrifugační zkumavky se napipetuje 350 μ l Bufferu PB, přidá se 350 μ l horního čirého roztoku z kroku 4, a směs se promýchá pomocí vortexu.
6. Směs z kroku 5 se přeleje do QIAquick kolonky umístěné v 2 ml mikrocentrifugační zkumavce a centrifuguje se 1 min při rychlosti 18 000 g. Zcentrifugovaný roztok se vyleje.
7. Přidá se 500 μ l Bufferu AW2 do QIAquick kolonky umístěné v 2 ml mikrocentrifugační zkumavce a centrifuguje se 1 min při rychlosti 18 000 g. Zcentrifugovaný roztok se vyleje. QIAquick kolonka umístěná v 2 ml mikrocentrifugační zkumavce se centrifuguje 1 min při rychlosti 18 000 g.

8. QIAquick kolonka se přemístí do 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky, a na střed kolonky se napipetuje 100 µl Bufferu EB. QIAquick kolonka se nechá inkubovat při laboratorní teplotě (15 - 25 °C) po dobu 1 min, a centrifuguje se 1 min při rychlosti 18 000 g. Získaný roztok se použije pro amplifikaci DNA.

Amplifikace DNA

Amplifikace se provede v 10 µl reakční směsi obsahující 5 µl QuantiTect Probe PCR Master Mixu, 1 µl roztoku primerů a proby (o koncentraci 5 µM každého primeru a 1 µM proby), 2 µl H₂O a 2 µl vzorku.

Amplifikaci se provádí s následujícím programem:

1. Počáteční denaturace (50 °C po dobu 2 min a 95 °C po dobu 15 min)
2. Amplifikace (35 cyklů 95 °C po dobu 15 s, a 60 °C po dobu 60 s – při tomto kroku je snímána fluorescence).

III. Srovnání „novosti postupů“ oproti původní metodice, případně jejich zdůvodnění, pokud se bude jednat o novou metodiku (§ 2, odst. 1, písm. b) a písm. c) zákona č. 130/2002 Sb.).

Pro stanovení uvedených druhů pangasů dosud nebyla publikována real-time PCR metoda. Metoda real-time PCR pro stanovení pangasů připravená na pracovišti VUVeL je nová v tom, že byla navržena pro co největší druhově specifické stanovení s využitím všech současných znalostí sekvencí DNA pangasovitých ryb. Pro navržení primerů a prob byly využity mitochondriální sekvence, které jsou nejvíce variabilní mezi příbuznými druhy pangasů, a zároveň nejsou variabilní v rámci druhu. Metoda byla dále navržena tak, aby byla vhodná pro stanovení sekvencí DNA ve vysoce tepelně opracovaných výrobcích.

IV. Popis uplatnění Certifikované metodiky, informace pro koho je určena a jakým způsobem bude uplatněna.

Metodika bude uplatněna orgány státní správy (SVS ČR) prostřednictvím akreditované laboratoře „Centrum laboratoří“ – Laboratoř pro detekci falšování potravin a krmiv na Výzkumném ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. Brno, jako prostředek pro monitorování českého trhu a odhalování klamavého jednání výrobců i zpracovatelů z hlediska možné záměny druhů a nesprávné deklarace druhů pangasů na obalech výrobků. Bude zajišťováno vyšetření vzorků jak pro státní dozorové orgány, tak i pro odbornou a laickou spotřebitelskou veřejnost.

V. Ekonomické aspekty – odhad nákladů (v tis. Kč) na zavedení postupů uvedených v metodice a odhad ekonomického přínosu (v tis. Kč) pro uživatele.

Náklady na zavedení postupů jsou odhadovány na přibližně 30 000 Kč, a zahrnují především prostředky na nákup izolačního a amplifikačního kitu, kapilár a špiček.

Kvalifikovaný odhad je vyšetření 40 až 60 vzorků ročně, což při ceně vyšetření 1 850 Kč plus DPH za jeden vzorek umožní zisk 74 000 až 111 000 Kč plus DPH.

VI. Seznam použité související literatury.

Handy S. M., Deeds J. R., Ivanova N. V., et al.: A single-laboratory validated method for the generation of DNA barcodes for the identification of fish for regulatory compliance. *Journal of AOAC International* 94, 201-210, 2011.

Jondeung A., Sangthong P., Zardoya R.: The complete mitochondrial DNA sequence of the Mekong giant catfish (*Pangasianodon gigas*), and the phylogenetic relationships among Siluriformes. *Gene* 387, 1-2, 49-57, 2007.

Kim O. T. P., Nguyen P. T., Shoguchi E. et al.: A draft genome of the striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*, for comparative analysis of genes relevant to development and a resource for aquaculture improvement. *BMC Genomics* 19, Article Number: 733, 2018.

Mohindra V., Singh R. K., Kumar R., et al.: Complete mitochondrial genome sequences of two endangered Indian catfish species, *Clarias batrachus* and *Pangasius pangasius*. *Mitochondrial DNA* 26, 678-679, 2015a.

Mohindra V., Singh R. K., Kumar R., et al.: Genetic divergence in wild population of endangered yellowtail catfish *Pangasius pangasius* (Hamilton-Buchanan, 1822) revealed by mtDNA. Mitochondrial DNA 26, 182-186, 2015b

Nakatani M., Miya M., Mabuchi K., et al.: Evolutionary history of Otophysi (Teleostei), a major clade of the modern freshwater fishes: Pangaeon origin and Mesozoic radiation. BMC Evolutionary Biology 11, Article Number: 177, 2011.

Zhao H., Kong X., Zhou C.: The mitogenome of *Pangasius sutchi* (Teleostei, Siluriformes: Pangasiidae). Mitochondrial DNA 25, 342-344, 2014.

VII. Seznam publikací, které předcházely metodice a byly publikovány, pokud existují, případně výstupy z určité znalosti, jestliže se jedná o originální práci. U jednotlivých publikací je třeba uvést dedikaci, která je v jednotlivých publikacích uvedena.

Připravuje se publikace metodiky v impaktovaném a v odborném časopise.



Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic
Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz