



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Průkaz masa tuňáka žlutoploutvého
metodou PCR v kombinaci s vysokorozlišovací
analýzou křivek tání**

Mgr. Pavel Krčmář, Ph.D.

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA č. 110/2018

Průkaz masa tuňáka žlutoploutvého metodou PCR v kombinaci s vysokorozlišovací analýzou křivek tání

Autor

Mgr. Pavel Krčmář, Ph.D.

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu Ministerstva zemědělství č. QJ1530272.

Osvědčení o uplatnění certifikované metodiky č.: svspes743abe71b

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

ISBN 978-80-88233-55-8

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 průkaz masa tuňáka žlutoploutvého (*Thunnus albacares*) ve vysoce tepelně opracovaných výrobcích založenou na amplifikaci druhově specifických sekvencí mitochondriální DNA metodou PCR v kombinaci s vysokorozlišovací analýzou křivek tání (HRM).

II. Vlastní popis metodiky

Úvod

V České republice patří tuňáci (zejména rodu *Thunnus* a *Katsuwonus pelamis*) mezi oblíbené potraviny. Na potravinovém trhu jsou nejčastěji nabízeny jako tepelně opracované produkty – konzervy, a syrové nebo mražené filety. Odlišná kvalita a cena různých druhů tuňáků 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 PCR s následnou vysokorozlišovací analýzou křivek tání (High Resolution Melting analysis - HRM analýzou). HRM analýza je založena na disociačním chování nukleových kyselin vlivem teplotního gradientu. Je to účinná metoda vhodná pro genotypování, která umožňuje stanovit sekvence DNA o velikosti 70 až 150 nukleotidů.

Hlavní obtíží pro vypracování metody pro rozlišení těchto druhů 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 *Thunnus orientalis* (Nakamura Y., et al. 2013). Hlavní pozornost byla proto zaměřena na mitochondriální DNA, neboť tato je popsána u všech sledovaných druhů, a to u několika jedinců každého druhu (Catanese G., et al. 2008; Guo L., et al. 2016; Chen C., et al. 2016; Li M. M., et al. 2016a; Li M. M., et al. 2016b; Li Y. L. et al. 2016a; Li Y. L. et al. 2016b; Manchado M., et al. 2004; Marquez E. J., et al. 2016; Pang J. H., et al. 2016a; Pang J. H., et al. 2016b; Yang S., et al. 2016).

Navržení primerů pro PCR amplifikaci a určení druhové specificity:

Programem Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) byly srovnány všechny sekvence kompletní mitochondriální DNA tuňáků 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 pro druhově specifickou amplifikaci *Thunnus albacares* (amplifikační produkt má velikost 122 párů bází).

Tabulka: In siliko srovnané sekvence tuňáků (seznam sekvencí k 1. 10. 2017).

Druh	Kompletní mitochondriální DNA (Sequence ID)
<i>Thunnus albacares</i>	KP259550
	KT724724
	KM588080
	JN086153
	GU256528
<i>Thunnus alalunga</i>	JN086151
	KP259549
	GU256526
	AB101291
<i>Thunnus tonggol</i>	HQ425780
	JN086154
<i>Thunnus thynnus</i>	JN086149
	GU256522
	KF906720
	AY302574
	AB097669
	AP006034
<i>Thunnus atlanticus</i>	KU955344
	KM405517
	KU955343

<i>Thunnus orientalis</i>	KF906721
	GU256524
	AB185022
<i>Thunnus obesus</i>	JN086152
	GU256525
<i>Thunnus maccoyii</i>	JN086150
	GU256523
	KF925362
<i>Katsuwonus pelamis</i>	KM605252
	JN086155
	GU256527
	AB101290
<i>Auxis rochei</i>	AB103468
	KP259548
	KM651784
	AB105165
	AB103467
<i>Auxis thazard</i>	KP259551
	AB105447
<i>Euthynnus affinis</i>	AP012946
	KM651783
<i>Euthynnus alletteratus</i>	AB099716
<i>Sarda orientalis</i>	AP012949

Druhová specifická navržených primerů byla ověřena na vzorcích DNA těchto druhů tuňáků: *Thunnus albacares*, *Thunnus alalunga*, *Thunnus tonggol*, *Thunnus thynnus*, *Thunnus obesus*, *Thunnus maccoyii*, *Katsuwonus pelamis*, *Auxis rochei*, *Auxis thazard*, *Euthynnus affinis*, *Euthynnus alletteratus*, *Sarda sarda*.

Dále pro kontrolu přítomnosti amplifikovatelné DNA ryb (zejména tuňáků) ve vzorku byly navrženy primery pro stanovení části sekvence mitochondriálního genu 12S rRNA v oblasti konzervativní sekvence pro ryby o velikosti amplifikačního produktu 80 párů bází.

Detekční limit pro tepelně opracované vzorky izolované za daných podmínek byl určen na hodnotu 2,5 ng DNA/ml vzorku. Limit byl stanoven za základě stanovení koncentrace DNA izolované ze 3 náhodně vybraných vzorků konzerv po jejich naředění odpovídající 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).

PCR HRM metoda pro stanovení tuňáka žlutoploutvého byla ověřena na 20 vzorcích rybích konzerv s deklarovaným obsahem tuňáka.

Sekvence primerů 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 480 II (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

Type-it HRM PCR Kit, kat. č. 206 542 (Qiagen)

Oligonukleotidy (Generi Biotech s.r.o.)

Provedení zkoušky

Izolace DNA

Izolace DNA ze vzorku tepelně opracované (konzervované) 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 2,5 mm, 1,5 ml Food Lysis Bufferu a 10 µl 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 μ l 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 μ l reakční směsi obsahující 5 μ l HRM PCR Master Mixu, 1 μ l roztoku primerů (o koncentraci 7 μ M každého primeru), 2 μ l H₂O a 2 μ l vzorku.

Amplifikaci se provádí s následujícím programem:

Úvodní aktivace		95°C 5 minut
Denaturace	40 cyklů	95°C 10s
Annealing		55°C 30s
Extenze		72°C 10 s
HRM	70-90°C 1s Ramp rate: 0,02°C/s	

	25 acquisitions per second
Cooling	40°C 1s

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 tuňáků v tepelně opracovaných výrobcích bylo popsáno několik metod, např. PCR-RFLP (Lin W. F. and Hwang D. F., 2007), PCR-ELISA (Santaclara et al., 2015) a real-time PCR (Liu et al., 2016; Bojolly et al., 2017). Metoda PCR HRM pro stanovení tuňáků dosud nebyla publikována.

Metoda PCR HRM pro stanovení tuňáka žlutoploutvého připravená na pracovišti VUVeL je nová v tom, že byla navržena pro co největší druhově specifické stanovení s využitím všech současných znalostí sekvencí DNA tuňákovitých ryb. Pro navržení primerů byly využity mitochondriální sekvence, které jsou nejvíce variabilní mezi příbuznými druhy tuňáků, a zároveň nejsou variabilní v rámci druhu. Použití DNA sekvencí s těmito vlastnostmi je hlavní rozdílem proti metodám uvedeným výše. 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 tuňáků 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, amplifikačních destiček 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.

Bojolly D., Doyen P., Le Fur B., et al.: Development of a qPCR method for the identification and quantification of two closely related tuna species, Bigeye Tuna (*Thunnus obesus*) and Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*), in canned tuna. Journal of Agricultural and Food Chemistry 65, 913-920, 2017.

Catanese G., Infante C., Manchado M.: Complete mitochondrial DNA sequences of the frigate tuna *Auxis thazard* and the bullet tuna *Auxis rochei*. DNA Sequence 19, 159-166, 2008.

Guo L., Li M. M., Zhang H., et al.: Next-generation sequencing of the yellowfin tuna mitochondrial genome reveals novel phylogenetic relationships within the genus *Thunnus*. Mitochondrial DNA 27, 2089-2090, 2016.

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.

Chen C., Li Y. L., Yu H., et al.: The complete mitochondrial genome of the juvenile Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Perciformes, Scombridae). Mitochondrial DNA 27, 71-72, 2016.

Li M. M., Guo L., Zhang H., et al.: Complete mitochondrial genome of the kawakawa tuna *Euthynnus affinis*. Mitochondrial DNA 27, 2147-2148, 2016a.

Li M. M., Guo L., Zhang H., et al.: Mitochondrial genome of the bullet tuna *Auxis rochei* from Indo-West Pacific collection provides novel genetic information about two subspecies. Mitochondrial DNA 27, 3071-3072, 2016b.

Li Y. L., Chen C., Yu H., et al.: The complete mitochondrial genome of the juvenile Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* (Perciformes, Scombridae). Mitochondrial DNA 27, 96-97, 2016a.

Li Y. L., Chen C., Yu H., et al.: The complete mitochondrial genome of the Southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii*. Mitochondrial DNA 27, 3921-3922, 2016b.

Lin W. F., Hwang D. F.: Application of PCR-RFLP analysis on species identification of canned tuna. Food Control 18, 1050-1057, 2007.

Liu S., Xu K., Wu Z., et al.: Identification of five highly priced tuna species by quantitative real-time polymerase chain reaction. Mitochondrial DNA 27, 3270-3279, 2016.

Manchado M., Catanese G., Infante C.: Complete mitochondrial DNA sequence of the Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus*. Fisheries Science 70, 68-73, 2004.

Marquez E. J., Isaza J. P., Alzate J. F.: Mitochondrial genome of the blackfin tuna *Thunnus atlanticus* Lesson, 1831 (Perciformes, Scombridae). Mitochondrial DNA 27, 1771-1772, 2016.

Nakamura Y., Mori K., Saitoh K., et al.: Evolutionary changes of multiple visual pigment genes in the complete genome of Pacific bluefin tuna. Proc. Natl Acad Sci USA 110, 11061-11066, 2013.

Pang J. H., Cheng Q. Q., Sun D. D., et al.: The sequence and organization of complete mitochondrial genome of the yellowfin tuna, *Thunnus albacares* (Bonnaterre, 1788). Mitochondrial DNA 27, 3111-3112, 2016a.

Pang J. H., Cheng Q. Q., Sun D. D., et al.: The complete mitochondrial genome sequence of *Thunnus alalunga* (Bonnaterre, 1788). Mitochondrial DNA 27, 4189-4190, 2016b.

Santaclara F. J., Velasco A., Perez-Martin R. I., et al.: Development of a multiplex PCR-ELISA method for the genetic authentication of *Thunnus* species and *Katsuwonus pelamis* in food products. Food Chemistry 180, 9-16, 2015.

Yang S., Li M. M., Zhang H., et al.: The complete mitochondrial genome of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) determined by HiSeq sequencing. Mitochondrial DNA 27, 3973-3974, 2016.

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 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