



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Multiplexní detekce DNA skotu, prasete, ovce,
kozy a kura v potravinách a krmivech
metodou MOL-PCR (Multiplex
oligonucleotide ligation-polymerase
chain reaction)**

**MVDr. Zora Piskatá, Ph.D.
Mgr. Bc. Eliška Servusová
Mgr. Nikol Reslová
Mgr. Petr Králík, Ph.D.**

CERTIFIKOVANÁ METODIKA č. 95/2018

Multiplexní detekce DNA skotu, prasete, ovce, kozy a kura v potravinách a krmivech metodou MOL-PCR (Multiplex oligonucleotide ligation-polymerase chain reaction)

Autoři:

MVDr. Zora Piskatá, Ph.D. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.)

Mgr. Bc. Eliška Servusová (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.)

Mgr. Nikol Reslová (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.)

Mgr. Petr Králík, Ph.D. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.)

Certifikovaná metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu č. QJ1530107 (Metody pro identifikaci, sledovatelnost a ověřování autenticity potravin a krmiv s komponenty živočišného původu) programu Komplexní udržitelné systémy v zemědělství 2012-2018 vyhlášeném MZe ČR.

Osvědčení o uplatnění certifikované metodiky: 7/2018

Vydalo: Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI), Květná 15, 603 00 Brno

ISBN 978-80-88233-37-4 95

2018

Oponenti certifikované metodiky:

Mgr. Lenka Bartošová, Ph.D.

Státní zemědělská a potravinářská inspekce

Prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.

Mendelova univerzita v Brně

Předmluva

Prokazování falšování potravin patří mezi priority z hlediska ochrany zdravotních i ekonomických zájmů spotřebitele. Ověřování přítomnosti deklarovaných případně detekce nedeklarovaných živočišných druhů patří mezi základní kontrolní postupy stanovení autenticity potravin a krmiv vycházející z platné legislativy (z. 110/1997, z. 166/1999). Ne vždy se totiž označení na obalu shoduje s reálným obsahem výrobku. Pro identifikaci druhů ve zpracovaných potravinářských produktech je proto potřeba použít detekční postupy (Prusakova et al., 2018; Izadpanah et al., 2018), založené zejména na analýze proteinů nebo DNA molekuly extrahovaných z živočišných tkání (např. metoda polymerázové řetězové reakce - PCR (Matsunaga et al., 1999; Mousavi et al., 2015; Kim and Kim, 2017; Izadpanah et al., 2018), kvantitativní PCR - qPCR (Fajardo et al., 2008; Kesmen et al., 2009; Camma et al., 2012; Ren et al., 2017; Dalsecco et al., 2018), digitální PCR - ddPCR (Cai et al., 2017; Shehata et al., 2017), případně sekvenování nové generace - NG sekvenování (Carvalho et al., 2017; Ribani et al., 2018). Dosud publikované metodické postupy jsou z velké části založeny na detekci převážně mitochondriálního genomu (control regions, cytochrom *b*). Multiplexní array (xMAP technologie) založená na analýze genomové DNA představuje inovativní přístup v detekčních metodách pro ověření druhového složení potravin. Předmětem této metodiky je specifická forma xMAP array - multiplexní oligonukleotidová ligace (MOL-PCR), která pomocí fluorescenčně značených sond (oligonukleotidů) umožňuje specifickou detekci živočišných druhů (Reslova et al., 2017). V oblasti detekce falšování potravin byla technologie xMAP použita k průkazu rostlinných komponent v mouce a ve zpracovaných potravinách a krmivech (Ponzoni et al., 2013) a detekci parvalbuminu jako hlavního alergenu ryb v potravinách (Hildebrandt, 2010). Výsledky týkající se identifikace živočišných druhů v potravinách pomocí MOL-PCR nebyly dosud vědecky publikovány.

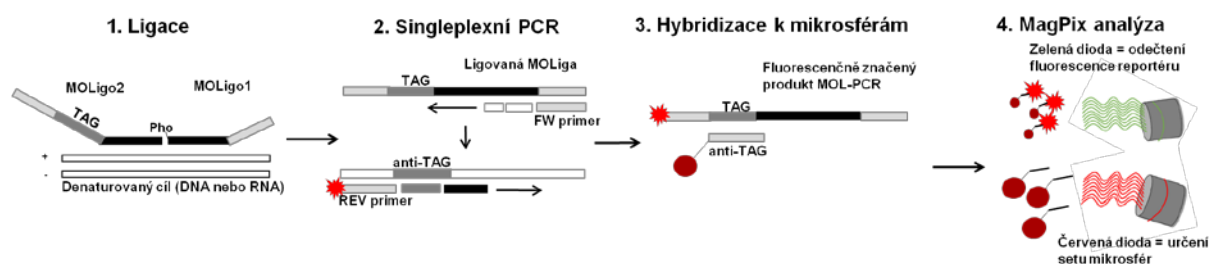
I. Cíl metodiky

Cílem metodiky je simultánní detekce DNA skotu (*Bos taurus*), prasete (*Sus scrofa domestica*), kura (*Gallus gallus f. domestica*), ovce (*Ovis aries*) a kozy (*Capra aegagrus hircus*) v potravinách a krmivech s ohledem na jejich složení, za účelem ověření autenticity druhů deklarovaných, případně průkaz druhů nedeklarovaných.

II. Vlastní popis metodiky

1. Princip MOL-PCR

Technologie xMAP je založena na zachycení fluorescenčně značených cílových molekul ze vzorku pomocí navržených druhově specifických sond (MOLig), z nichž jedna obsahuje specifickou sekvenci (tzv. TAG), která je komplementární k antiTAGu na povrchu magnetické mikrosféry. Přístroj MagPix rozpozná typ kuličky podle fluorescence a pokud je na ní navázána cílová sekvence označená jinou fluorescenční barvou, je potvrzena přítomnost cíle ve vzorku. Tato technologie se používá především pro detekci např. alimentárních patogenů, ale také v oblasti detekce proteinů nebo nízkomolekulárních látek, protože na magnetické kuličky lze navázat také antigeny, protilátky nebo hapteny. MOL-PCR (Multiplexed Oligonucleotide Ligation-PCR) je založena na ligaci syntetizovaných oligonukleotidů v přítomnosti cílové molekuly DNA (Song et al., 2010), následné amplifikaci s univerzálními primery, hybridizaci MOL-PCR produktů smíchaných s kuličkovým mixem a po přidání analyzačního pufru vlastní analýze v přístroji MagPix, zpracování dat a interpretaci výsledků (Obr. 1).



Obrázek 1: Schéma průběhu MOL-PCR reakce a MAGPIX analýzy.

Pho = fosfátová skupina umožňující ligaci; černě = sekvence specifická pro zachycovaný cíl; šedě = vazebná sekvence pro univerzální PCR primery; TAG = sekvence komplementární k anti-TAGu na mikrosférách; červeně = fluorescenční reportér.

Univerzální primery:

Univerzální primery byly převzaty z publikace Thierry et al. (2013). Reverzní primer je značen fluoroforem BODIPY-TMRX, který v reakci slouží jako reportérová molekula značící výsledný produkt.

uni FW: 5' – CGCGGTAGTAAGAAGTGAGA – 3' (20)

uni REV: 5' – BODIPY-TMRX - ACTCGTAGGGAATAAACCGT – 3' (20)

Tato sada univerzálních primerů amplifikuje produkty ligace o výsledné délce 106 bp.

1.1. Detekční cíle metodiky

Sondy (MOLigo 1 a 2) pro všech pět živočišných druhů byly navrženy na základě selekce sekvencí dostupných v genové bance (GenBank). Po jejich vzájemném srovnání (14 živočišných druhů pro gen mical1, 25 druhů pro gen RPS7 a 23 druhů pro gen rps16) byly vytypovány druhově specifické oblasti pomocí programu BioEdit (Tab. 1).

Tabulka 1. Přehled cílových oblastí, TAGů a regionů mikrosfér pro jednotlivé živočišné druhy.

Živočišný druh	Cílová oblast	TAG na sondě MOLigo 2	Mikrosféry (region)
Skot	RPS7	MTAG-A056	013
Prase	mical1	MTAG-A027	021
Kur	mical1	MTAG-A057	014
Ovce	RPS16	MTAG-A061	015
Koza	mical1	MTAG-A029	029

Sekvence MOLig:

Tučně = sekvence pro vazbu univerzálních PCR primerů; podtržené = sekvence specifická pro prase/kozu/skot/ovci/kura; malá písmena = TAG sekvence MTAG-A027/A029/A056/A061/A057 umožňující specifickou vazbu k mikrosférám; PHO = fosfátová skupina.

Prase

Su_MOLigo1_V01

5' - Pho-TATGGTTTAGAATGCAAAGGCTCTCACTTCTTACTACCGCG - 3'

Su_MOLigo2_V01

5'-

ACTCGTAGGGAATAAACCGTaagatgatagttaagtgtaaGTTATGAAATCATTAAATGTGTAAAGGGTG - 3'

Koza

Cap_MOLigo1_v02

5' - Pho-TTCAGTGAGAGCCCAGCAGTCTCACTTCTTACTACCGCG - 3'

Cap_MOLigo2_v02

5'-

ACTCGTAGGGAATAAACCGTttaaagtgagttatagaagtaGTAGGCCAGAAGGACAAGAAA
CAG - 3'

Skot

Bo_MOLigo1_v01

5' - Pho-CGGGTAAAGGAGGAGCGTCTCACTTCTTACTACCGCG - 3'

Bo_MOLigo2_v01

5'-

ACTCGTAGGGAATAAACCGTaattagaagtaagtagagtttaagGCGACTTTGATCCGGTTCTT
- 3'

Ovce

Ovi_MOLigo1_V02

5' - Pho-TCTGCTGACCTCCATGAGCTCTCACTTCTTACTACCGCG - 3'

Ovi_MOLigo2_V02

5'

ACTCGTAGGGAATAAACCGTtattagagagaaattgtagagattCCTGAGCAGAGCTTCACTG -
3'

Kur

Gal_MOLigo1_V01

5' - Pho-CCTCATCGTGTGGGTTTGCTCTCACTTCTTACTACCGCG - 3'

Gal_MOLigo2_V01

5'

ACTCGTAGGGAATAAACCGTagagtattagtagttattgtaagtTCTTCACAGCCTCGTTGCTT -
3'

1.2. Interní amplifikační kontrola

Interní kontrola (IC) je přidávána do každé reakce a slouží k odhalení falešně negativních výsledků v důsledku inhibice MOL-PCR reakce. IC byla navržena tak, aby pro všechny MOL-PCR systémy mohl být použit stejný pár IC MOLig a stejná sada univerzálních PCR primerů; jedná se tedy o univerzální IC. Při přípravě IC byla použita nekompetitivní syntetická sekvence založená na DNA sekvencích dvou vyhynulých druhů; konkrétně se jedná o mitochondriální

DNA vakovlka tasamánského (*Thylacinus cynocephalus*, Acc. No. FJ515781.1) a ptáka moa (*Dinornis struthoides*, Acc. No. AY326187.1). Tato kontrolní syntetická sekvence o délce 150 bp byla převzata z Mikel et al. (2016), syntetizována *de novo* a klonována do plazmidu. Takto připravený konstrukt je zcela arteficiální a podobná sekvence se nevyskytuje v žádném známém živočišném, rostlinném, či bakteriálním druhu. IC je tedy možné použít pro jakýkoliv templát či matrici.

Sekvence MOLig pro IAC:

IC_2_M1

5'- PHO- ATTAGCACAATGAATAATCATCGTCTCACTTCTTACTACCGCG- 3'

IC_2_M2

5'-

ACTCGTAGGGAATAAACCGTtattgtgaaagaaagagaagaaattTATACACACGCAATCACCA
C- 3'

Tyto sondy jsou komplementární k úseku kontrolní syntetické sekvence o délce 43 bp. Celková délka produktu ligace detekčních sond, a tím i amplikonu = 107 bp.

2. Předmět a působnost

Tato metodika popisuje multiplexní oligonukleotidovou ligační polymerázovou řetězovou reakci (MOL-PCR) s interní amplifikační kontrolou (IAC) sloužící k simultánní identifikaci pěti druhů potravinářsky významných zvířat v potravinách a krmivech na základě detekce vybraných oblastí genomové DNA. Kvalitativní detekce probíhá prostřednictvím odečtení fluorescenčního signálu vzorku oproti negativní kontrole. Vyvinutý systém umožňuje dodatečné přidání dalších cílů podle aktuálních požadavků. Metodika je využitelná jako diagnostický nástroj pro odhalování falšování potravin a krmiv způsobeným druhovou záměnou.

3. Přístroje a pomůcky

Váhy

Centrifuga MiniSpin

Termoblok

Vortex
Chladnička (do 5 °C)
Mraznička (do -20 °C)
Ultrasonic Cleaning Bath (BioTech, Česká republika)
Magnetický separátor
Mikroskop - hemocytometr (Bürkerova komůrka)
Termocykler
UV box
Bio-Plex MAGPIX Multiplex Reader (Bio-Rad, USA)
Bio-Plex Manager™ MP software (Bio-Rad, USA)
Bio-Plex Manager™ 6.1 software (Bio-Rad, USA)
Sada pipet s nastavitelným rozsahem (100 – 1000 µl, 10 – 100 µl, 1 - 10 µl, 0.1 - 2 µl)
Špičky s filtrem k pipetám s příslušným rozsahem
Sterilní mikrozkuřavky o objemu 1.5 a 2 ml
Sterilní mikrozkuřavky o objemu 0,2 ml x 96 se separátními víčky
PCR deska s jamkami na objem 0,2 ml

4. Chemikálie a roztoky

Izolační kit DNeasy mericon Food Kit (Qiagen, Němceko)
Chlorofom
Magnetické kuličky (MagPlex® Microspheres 12,5 x 10⁶, Luminex Corp., USA; XX = 12-78, dle seznamu dostupných setů)
Pierce EDC Powder
anti-TAGy
validační TAGy
EDC
Tween-20 (promývací pufr I) 0.02%
SDS, 10% roztok (promývací pufr II) 0.1%
MagPix Performance Verification kit
MagPix Calibration kit
Hifi Taq DNA ligační pufr 10x
Hifi Taq DNA ligáza
2X EliZyme™ HS Robust MIX
PCR H₂O

MES (aktivační pufr) 0.1 M

NaCl 5 M

TE pufr, 100X (uchovávání), 1X

Analyzační pufr (1 M Tris-Cl, 0.5 M EDTA, 5 M NaCl, Tween 20, H₂O)

dH₂O

70% isopropanol

0,1 N NaOH

15% Savo Original

MAGPIX® Drive Fluid (Luminex Corp., USA)

Univerzální primery (1. Princip MOL-PCR)

Druhově specifická MOLiga (1.1. Detekční cíle metodiky)

IAC (1.2. Interní amplifikační kontrola)

4.1. Příprava magnetických kuliček

4.1.1. Potahování kuliček antiTAGem

Aktivace kuliček: Vybrané sety kuliček určené k potažení vortexujeme a sonifikujeme asi 30 s. Přeneseme 400 μ l (5.0×10^6) kuliček (objem kuliček závisí na počtu reakcí, např. 400 μ l odpovídá 800 reakcím) do Eppendorf Low Bind zkumavek a necháme odstát na magnetickém separátoru 1-2 min. Opatrně odstraníme supernatant, pelet resuspendujeme na vortexu ve 45 μ l 0.1 M MES pufru (pH 4.5), sonifikujeme 20 s.

Párování antiTAGů s kuličkami: V H₂O resuspendujeme anti-TAGy na 100 μ M (100 pmol/ μ l), přidáme 2 μ l 100 μ M anti-TAGu do resuspendovaného mixu kuliček, vortexujeme. V H₂O připravíme čerstvý roztok 10 mg/ml EDC, přidáváme 2.5 μ l EDC ke kuličkám a ihned vortexujeme. Inkubujeme 30 min při laboratorní teplotě a v temnu, každých 10 min vortexujeme. Připravíme druhý čerstvý roztok 10 mg/ml EDC a opět přidáváme 2.5 μ l ke kuličkám a vortexujeme. Inkubujeme 30 min za laboratorní teploty a v temnu, každých 10 min zvortexujeme.

Promývání spárovaných kuliček: Ke spárovaným kuličkám s anti-TAGy přidáme 1.0 ml 0.02% Tween-20, vortexujeme, dáme na magnetický separátor 1-2 min, pelet resuspendujeme v 1 ml 0.1% SDS, vortexujeme, umístíme na magnetický separátor, pelet resuspendujeme v 80 μ l TE pufru, vortexujeme a sonifikujeme. Potažené kuličky uchováme v lednici a v temnu.

Počítání na hemocytometru (Bürkerova komůrka): Kuličky resuspendujeme na vortexu 40 s, rozředíme 1:100 v H₂O, zvortexujeme, 10 μ l napipetujeme do hemocytometru, počítáme

kuličky v 4 velkých čtvercích. Pro výpočet celkového počtu kuliček použijeme vzorec: koncentrace kuliček (kuličky/ μl) = (suma kuliček ze 4 čtverců) x 2.5 x 100.

4.1.2. Validace kuliček

Validační TAG je sekvence shodná s MTAGem použitým v MOLigo2 sondě, která na svém 5'konci nese fluorofor BODIPY. Pro ověření kvality párovací reakce (použijeme validační TAGy komplementární k anti-TAGům, kterými jsme potáhli kuličky) je nutné provést validaci kuliček. Správná párovací reakce vykazuje velké rozdíly v MFI (median fluorescence intensity) hodnotách mezi kuličkami saturevanými validačními TAGy a kuličkami inkubovanými bez validačních TAGů.

Příprava validačního mixu: V H_2O resuspendujeme validační TAGy na koncentraci 1 mM. Čtyři μl od každého validačního TAGu (1mM) napipetujeme do 1x TE pufru, vortexujeme, 2,5 μl tohoto mixu přeneseme do 997 μl TE pufru, vortexujeme.

Příprava pracovního kuličkového mixu - 5 μl na 1 vzorek obsahuje: 2500 kuliček od každého setu (2500 kuliček / koncentrace kuliček [kuličky/ μl] = objem daného mixu kuliček k přidání [μl]). 0,8 μl 5 M roztoku NaCl (finální koncentrace 0.8 M), 2.5 μl 0.1 M roztoku MES (finální koncentrace 0,05 M), TE pufr 1x – doplnit do celkového objemu 5 μl .

Test hybridizace: Do každé jamky (A-F) napipetujeme 5 μl kuličkového mixu, pracujeme v duplikátech. Následně přidáme mix validačních TAGů (10fmol/ μl) a TE pufr 1x dle Tabulky 2 (celkový objem bude 15 μl).

Tabulka 2. Test hybridizace.

Jamka	Množství TAGů	Množství TE pufru
A	0 μl TAGů	10 μl TE
B	0,5 μl TAGů	9,5 μl TE
C	1 μl TAGů	9 μl TE
D	2 μl TAGů	8 μl TE
E	5 μl TAGů	5 μl TE
F	10 μl TAGů	0 μl TE

Protokol hybridizace: 94°C/1 min, pomalé ochlazení na 25°C rychlostí 0.1°C za sekundu, udržování při 10° do dalšího zpracování.

4.2. Složení a příprava analyzačního pufru

Tabulka 3. Složení a příprava analyzačního pufru.

Složka	Katalog. č.	Výsledná koncentrace	Množství/250 ml	pH
1 M Tris-Cl	Sigma T1503 ^a	10 mM	2,5 ml	8,0
0,5 M EDTA	Amresco E522	0,1 mM	50 µl	
5 M NaCl	Carl ROTH 3957	90 mM	4,5 ml	
100% Tween 20	Alpha Diagnostic Intl Inc TW-100100	0,02 %	50 µl	
ultračistá H ₂ O	Millipore		242,9 ml	

^a = zásobní Trizma base neobsahuje Cl⁻, ten je doplněn během úpravy pH pomocí HCl kyseliny

4.3. Roztoky pro údržbu přístroje MagPix

Tabulka 4. Roztoky pro údržbu přístroje MagPix.

Složka	Katalog. č.	Výsledná koncentrace	Množství/250 ml	Skladování
100% isopropanol	PENTA 17510-20005 (Česká republika)	70%	180 ml	pokojová teplota
NaOH	PENTA 15760-31000 (Česká republika)	0,1 N	0,1 g	pokojová teplota
Savo Original	Unilever SAVO (Nizozemsko)	15%	37 ml	pokojová teplota

5. Postup, provedení zkoušky

5.1. Izolace DNA

Izolace DNA ze svaloviny a dalších tkání a potravinových produktů byla provedena pomocí komerčního kitu DNeasy mericon Food Kit (Qiagen, Hilden, Německo) dle návodu výrobce. Optimalizované protokoly jsou založeny na modifikované CTAB (cetyltrimethylamonium bromid) extrakci, kdy v kombinaci s proteinázou K dojde nejprve k rozpadu kompaktní tkáně a poté následuje vysrážení proteinů a případných inhibitorů přítomných v potravine. Inhibitory se vysráží centrifugací, zatímco extrahovaná DNA zůstává v roztoku. Při následné extrakci chloroformem jsou veškeré komplexy CTAB-proteinů, CTAB-polysacharidů převedeny do organické fáze. Pouze vodná fáze obsahující DNA je dále zpracovávána. Smíchá se s vazebným pufrem a aplikuje na kolonky (QIAquick Spin Columns). Podle charakteru výchozí suroviny je možné použít různé varianty extakčních protokolů dodaných výrobcem. Pro potraviny, které

byly podrobeny vyššímu stupni tepelného opracování (vaření, pasterizace), vysokého tlaku, ozáření, změn pH nebo sušení, a předpokládá se tak vyšší fragmentace DNA (100-200 párů bazí), je doporučen protokol pro detekci malých fragmentů (Small Fragment Protocol), pro všechny ostatní potraviny by měly být použity standardní protokoly (Standard Protocol). Podle velikosti vstupního vzorku jsou připraveny vždy dvě varianty protokolů (pro vstupní vzorek o hmotnosti 2 g a vstupní vzorek o hmotnosti 200 mg).

Standardní protokol pro extrakci celkové DNA ze vzorku (200 mg) syrové nebo zpracované svaloviny:

1. Do 2 ml zkumavky se naváží 200 mg vzorku, přidá se 1 ml lyzačního pufru (Food Lysis Buffer) a 2,5 μ l proteinázy K, zvořetxuje.
2. Směs se inkubuje v třepací zahřívací lázni při teplotě 60°C po dobu 30 minut a následně ochladí na teplotu 15-25°C.
3. Směs se centrifuguje 5 minut při 2 500 x g.
4. Do 2 ml zkumavky se napipetuje 500 μ l chloroformu a přidá se 700 μ l čirého supernatantu. Směs se vortexuje pro dobu 15 s a centrifuguje 15 minut při 14 000 x g.
5. Do další 2 ml zkumavky se napipetuje 350 μ l pufru Buffer PB, přidá se 350 μ l horního čirého roztoku z kroku 4 a vše se zvortexuje.
6. Směs z kroku 5 se napipetuje do kolonky (QIAquick spin column) umístěné v 2 ml mikrocentrifugační zkumavky a centrifuguje se po dobu 1 minuty a rychlosti 17 900 x g. Zcentrifugovaný roztok se vylíje.
7. Přidá se 500 μ l pufru Buffer AW2 a zcentrifuguje za stejných podmínek jako v kroku 6. Zcentrifugovaný roztok se vylíje a kolonka umístěná v mikrocentrifugační zkumavce se znovu zcentrifuguje.
8. Kolonka se přemístí do 1,5 ml zkumavky a na střed kolonky se napipetuje 150 μ l elučního pufru (Buffer EB). Inkubuje se 1 minutu při laboratorní teplotě a zcentrifuguje 1 minutu při 17 900 x g.

5.2. Ligace

Detekční sondy se navzájem naváží k cílovým sekvencím prostřednictvím komplementárních částí, zatímco sekvence TAGu a vazebných míst pro PCR primery ční do prostoru. Tato sekvence zligovaných sond vytvoří templát pro následnou PCR s univerzálními primery, z nichž jeden je fluorescenčně označen. Složení reakční směsi pro jednu reakci v objemu 25 μ l (vždy pracujeme v duplikátu) je popsáno v Tabulce 5.

Tabulka 5. Složení reakční směsi pro ligaci.

Reagencie	1 reakce	Výsledná koncentrace
PCR H ₂ O	doplnit objem	
Hifi <i>Taq</i> DNA Ligase Buffer 10x	2,5 µl	1X
MOLigo 1 a 2 pro druh (1 pmol/µl)	2 x 0,125 µl	5 nM
MOLigo 1 a 2 pro IAC (1 pmol/µl)	2 x 0,125 µl	5 nM
IC plazmid 10 ⁴ /µl	0,1 µl	1x10 ³ kopií
Hifi <i>Taq</i> DNA Ligase	0,5 µl	
DNA	2,5 µl	
Celkem	25 µl	

Ligační protokol:

95°C/10 min, 95°C/30 sec + 59°C/1 min, 20 x opakování, udržování při 10°C do dalšího zpracování

5.3. PCR

Složení reakční směsi pro jednu reakci v objemu 24 µl je popsáno v Tabulce 6.

Tabulka 6. Složení PCR reakční směsi.

Reagencie	1 reakce	Výsledná koncentrace
PCR H ₂ O	5,25 µl	
EliZyme™ HS Robust MIX (2x)	12 µl	1X
Fw primer uni (10 pmol/µl),	0,15 µl	0,0625 µM
Rev primer uni BODIPY (10 pmol/µl)	0,6	0,25 µM
Produkt ligace	6 µl	
Celkem	24 µl	

PCR protokol:

95°C/2 min, 95°C/15 sec + 60°C/15 sec + 72°C/15 sec, 40 x opakování, udržování při 10°C do dalšího zpracování.

5.4. Analýza MOL-PCR produktů

Fluorescenčně značený MOL-PCR amplikon hybridizuje prostřednictvím své TAG sekvence a antiTAG sekvence na magnetické kouli.

Do každé jamky podle počtu vzorků (neznámý vzorek, negativní kontrola, BLANK = kontrola pozadí), napipetujeme 5 µl kuličkového mixu (Tab. 7):

Tabulka 7. Příprava kuličkového mixu

Reagencie	1 reakce	Výsledná koncentrace
MES 0,1 M	2,5 µl	0,05 M
NaCl 5 M	0,8 µl	0,8 M
Směs potažených MagPlex® Microspheres	2 500* mikrosfér/set	
TE pufr 1X	doplnit objem	
Celkem	5 µl	

*2 500 kuliček / koncentrace kuliček [kuličky/µl] = objem daného mixu kuliček k přidání [µl]

Přidáme 10 µl MOL-PCR produktu, do BLANKů přidáme 10 µl H₂O.

Protokol hybridizace: 94°C/1 min, pomalé ochlazení na 25°C rychlostí 0.1°C za sec, udržování při 4°C do dalšího zpracování.

Ke každému vzorku přidáme dále 45 µl analyzačního pufru (Tab. 3) do konečného objemu 60 µl. Vzorky analyzujeme na přístroji MagPix: program v PC softwaru Bio-Plex Manager MP → Create/Run protocols, New → Select Analytes → Select panel → MagPix Quick Start, kde označíme příslušné regiony kuliček. V kategorii Format plate naformátujeme rozložení jednotlivých vzorků (X – neznámý vzorek, B – BLANK, C – kontrola, S – standard). Analýzu spustíme přes ikonu Start, z přístroje vyjede rampa, na které doplníme chemikálie do příslušných kolonek dle požadavků zobrazeného schématu (dH₂O – kolonka A, 70% isopropanol – kolonka B, 0.1 M NaOH – kolonka C). V zobrazeném okně navolíme typ používaných zkumavek/desek (PCR plate) a spustíme analýzu. Po ukončení analýzy provedeme Export výsledků přes hlavní panel do požadované složky a můžeme výsledky analyzovat v softwaru Bio-Plex Manager 6.1.

5.5. Kalibrace, verifikace a údržba přístroje MagPix

Kalibrace a verifikace se provádí pomocí kalibračního kitu MAGPIX® Calibrator Kit, RUO, 25 Uses (Luminex Corp., USA) a verifikačního kitu MAGPIX® Performance Verification Kit, RUO, 25 Uses (Luminex Corp., USA). Před každým použitím je nutno všechny složky kitů řádně vortexovat a sonifikovat asi 30 s. Bio-Plex Manager™ MP software sám naznačí, kdy je třeba provést kalibraci a verifikaci přístroje; kalibrace se provádí asi jednou týdně, verifikace po každém spuštění přístroje před analýzou vzorků. Dále je potřeba provádět údržbu sací jehly, která se promyje a sonifikuje v destilované vodě (dH₂O), zkontrolovat naplnění kontejnerů pro Drive fluid a odpad (waste container). Údržbové rutiny přístroje i samotná analýza vyžadují doplnění dH₂O, 70% isopropanolu, 0,1 N NaOH a 15% sava do kolonek v přístroji. Roztoky se připravují za použití ultračisté vody (Tab. 4). Po skončení analýz se před vypnutím přístroje vždy provádí rutina Shut Down.

5.6. Ověření validity (interní kontrola kvality)

5.6.1. Negativní izolační kontrola

Jako vzorek při izolaci DNA je použita místo tkáně voda v ekvivalentním množství. Při každé sérii izolací musí být provedena jedna negativní izolační kontrola.

5.6.2. Negativní kontrola použitá při ligaci

Jako vzorek je do ligační směsi přidána místo DNA voda. Jeden slepý vzorek musí být použit při každé analýze.

5.6.3. Kontrola pozadí (Blank)

Při přípravě kuličkového mixu dáme kromě vzorků a negativní kontroly také Blank pro kontrolu pozadí (místo MOL-PCR produktu přidáme do Blanku ekvivalentní množství vody).

5.6.4. Pozitivní kontrola

Jako pozitivní kontrola slouží DNA alikvot izolovaný ze svaloviny příslušného živočišného druhu, jehož identifikace byla provedena před porážkou.

5.6.5. Interní kontrola amplifikace

Interní kontrola (IC) je přidávána do každé reakce. Slouží k odhalení falešně negativních výsledků v důsledku inhibice MOL-PCR reakce.

5.6.6. Duplicitní analýzy

V průběhu metody se provádí duplicitní analýza všech vzorků.

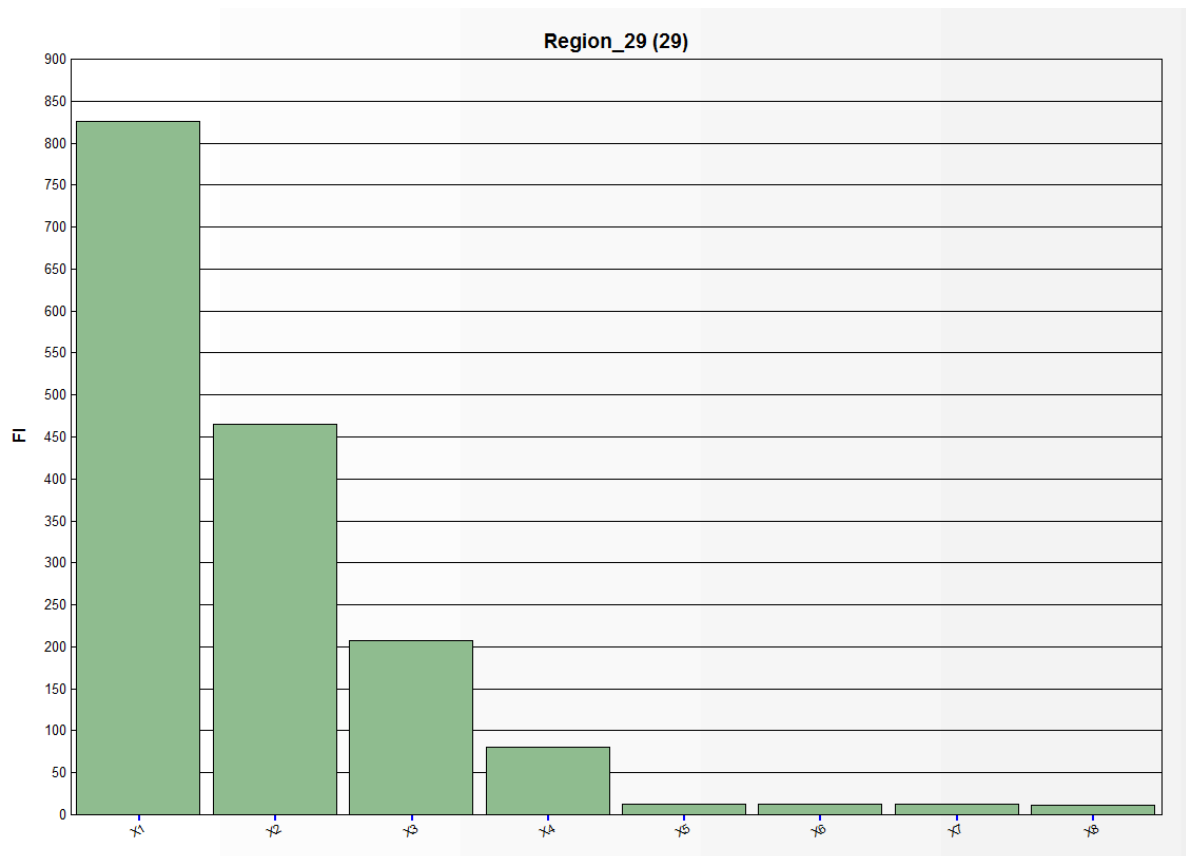
5.6.7. Specifita

Specifita MOLig byla porovnána pomocí programu BioEdit (14 živočišných druhů pro gen mical1, 25 druhů pro gen RPS7 a 23 druhů pro gen rps16). Navržené sekvence MOLig pro všech pět živočišných druhů jsou 100% identické s referenčními sekvencemi dostupnými v databázi BLAST (whole genome shotgun) a současně nevykazují shodu se sekvencemi jinými živočišných druhů. Specifita byla navíc prakticky testována na celé řadě živočišných druhů, které mohou být využity pro potravinářské účely (skot, prase, kůň, králík, ovce, koza, kuře a další). Specifita převzatých univerzálních primerů byla ověřena na 13-ti genotypech *Bacillus anthracis* v případě Thierry et al. (2013), ale mimo jiné také na 11-ti sérotypech *Escherichia coli* (STEC) v publikaci Woods et al. (2016).

5.6.8. Detekční limit

Detekční limit MOL-PCR systému byl proveden v podobě koncentračního gradientu izolované DNA (100 – 0,01 ng pro daný cíl) a byl stanoven na 1 ng/μl (MFI > 200).

Obrázek 2. Detekční limit MOL-PCR pro kozu (*Capra aegagrus hircus*)



X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8
100 ng	10 ng	1 ng	100 pg	10 pg	1 pg	100 fg	K-

5.7. Zpracování dat a interpretace výsledků

Od naměřených hodnot mediánu intenzity fluorescence (MFI) se odečte hodnota BLANKu 30 MFI (empiricky stanovená hodnota). Jednotlivé MFI hodnoty vzorků se podělí MFI hodnotou negativní kontroly NTC (no template control). Je-li výsledný **poměr (P) vyšší než 4** a zároveň **hodnota MFI daného vzorku vyšší než 200**, vzorek je pozitivní.

$$P_{\text{vzorku}} = \text{MFI}_{\text{vzorku}} / \text{MFI}_{\text{NTC}}$$

Příklad:

$$\text{MFI}_{\text{vzorku}} = 950 \text{ (} > \mathbf{200} \text{)}$$

$$\text{MFI}_{\text{NTC}} = 65$$

$$P = 950 / 65 = 14 \text{ (} > \mathbf{4} \text{)}$$

Kvalitativní hodnocení se provádí podle následující tabulky.

Tabulka 8. Kvalitativní hodnocení.

Cíl	IAC	Celkový výsledek
Pozitivní	Pozitivní	Vzorek je pozitivní
Pozitivní	Negativní	Vzorek je pozitivní
Negativní	Pozitivní	Vzorek je negativní
Negativní	Negativní	Vzorek je inhibován

Vzorek je považován za pozitivní, pokud je pozitivní alespoň v jednom opakování.

III. Srovnání novosti postupů

Metodika je založená na komplexním postupu zahrnujícím izolaci DNA ze vzorku, přípravu magnetických kuliček (potahování, validace), ligaci, PCR a vlastní analýzu MOL-PCR produktů v přístroji MagPix. Metoda MOL-PCR založená na ligaci oligonukleotidů nebyla dosud pro průkaz autenticity potravin a krmiv vědecky publikována a vytváří tak nový diagnostický nástroj pro ověření druhové deklarace v potravinách a krmivech. Metodika představuje inovaci v metodologii kontroly složení potravin a krmiv, jejíž přínos spočívá především v multiplexním simultánním stanovení pěti živočišných druhů v rámci jedné analýzy s potenciálem dodatečného přidání dalších druhů s dosahem 50-100 cílů. Výhodou metody je

také její schopnost detekce velmi krátkých PCR fragmentů (do 100 bp), čímž může být usnadněna druhová identifikace ve zpracovaných potravinách, kdy vlivem technologických procesů dochází často k degradaci DNA a jejímu rozpadu na kratší fragmenty. Navržené MOL-PCR systémy jsou navíc založeny na amplifikaci genomové DNA, která oproti standardně používaným cílům v mitochondriální DNA poskytuje vyšší specifitu a především bude zaručeno, že v tkáních bude vždy stejné množství kopií cílové DNA, na rozdíl od mitochondriální DNA. V kombinaci s interní kontrolou dochází k eliminaci falešně negativních výsledků způsobených přítomností inhibitorů, a s ohledem na provedené optimalizace, stanovení detekčního limitu, systému kontrol a hodnocení, tak umožňuje rychlý skrínig vyšetřovaného vzorku na širokou škálu živočišných druhů.

IV. Popis uplatnění Certifikované metodiky

Metodika bude uplatněna orgány státní správy (SZPI, SVS) prostřednictvím akreditované laboratoře pro detekci falšování potravin a krmiv na Výzkumném ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. Brno jako prostředek pro monitorování autenticity výrobků ve smyslu ověření správné druhové deklarace potravin a krmiv. Kromě orgánů státní správy může být metodika využita také soukromými subjekty a spotřebiteli pro prokazování jakosti potravin a krmiv.

V. Ekonomické aspekty

Náklady na zavedení metodiky do laboratoře

Náklady na zavedení metodiky do běžné laboratorní praxe zahrnují náklady na pořízení spotřebního materiálu, kitu na izolaci DNA, chemikálií, magnetických koulí, sond a dalších reagensů. Kalkulace nákladů na materiál na vyšetření jednoho vzorku (duplicitně) je popsáno v Tabulce 9.

Tabulka 9. Náklady na materiál na vyšetření jednoho vzorku (duplicitně)

Položka	Cena (kč)
Izolace DNA (komerční kit)	345
Ligace, PCR, MagPix analýza	105
Spotřební materiál (špičky s filtrem, zkumavky, rukavice, desinfekce)	50
Celkem	450

Náklady na přístrojové vybavení (centrifuga, horký blok, vortex, 2 sady pipet, ultrasonic clean bath, magnetický separátor, termocykler, UV box) jsou předpokládaným vybavením laboratoře

využívající metodiku, tudíž nejsou započítány do nákladů. Pořízení přístroje Bio-Plex MAGPIX Multiplex Reader představuje položku cca 700 000 – 800 000 Kč.

Ekonomický přínos

Vyvinutá metodika představuje účinný nástroj pro odhalování falšování potravin ve smyslu záměny živočišných druhů v potravinách a krmivech s ohledem na druhovou deklaraci uvedenou na obalu výrobku. Při zavedení metodiky do diagnostické praxe se ušetří čas i náklady spojené s analýzou, protože při simultánním stanovení v jedné komplexní reakci dojde nejen k ověření druhové deklarace doprovázející potraviny, ale zároveň umožní zachycení i dalších případných nedeklarovaných živočišných druhů ve výrobku. Vzhledem ke komplexnosti analýzy je úspora nákladů reálná, protože komplexní analýza vzorku v jedné reakci představuje vždy výhodu ve srovnání s prováděním oddělených, jednodruhově cílených PCR nebo ELISA postupů.

VI. Seznam použité související literatury

Cai, Y., He, Y., Lv, R., Chen, H., Wan, Q., Pan, L. (2017). Detection and quantification of beef and pork materials in meat products by duplex droplet digital PCR. Plos One, 3:1-12.

Camma, C., Di Domenico, M., Monaco, F. (2012). Development and validation of fast real-time PCR assays for species identification in raw and cooked meat mixtures. Food Control, 23:400-404.

Carvalho, D.C., Palhares, R.M., Drumond, M.G., Gadanho, M. (2017). Food metagenomics: Next generation sequencing identifies species mixtures and mislabeling within highly processed cod products. Food Control, 80:183-186.

Dalsecco, L.S., Palhares, R.M., Oliveira, P.C., Teixeira, L.V., Drummond, M.G., De Oliveira, D.A.A. (2018). A fast and reliable real-time PCR method for detection of ten animal species in meat products. Food Chem, 83:258-265.

Fajardo, V., Gonzalez, I., Martin, I., Rojas, M., Hernandez, P.E., Garcia, T., Martin, R. (2008). 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.

Hildebrandt, S. (2010). Multiplexed identification of different fish species by detection of parvalbumin, a common fish allergen gene: a DNA application of multi-analyte profiling (xMAP(TM)). Analytical and Bioanalytical Chemistry, 397(5):1787-1796.

Izadpanah, M., Mohebbali, N., Elyasi gorji, Z., Farzaneh, P., Vakhshiteh, F., Fazeli, A.S. (2018). Simple and fast multiplex PCR method for detection of species origin in meat products. J Food Sci Technol, 55:698-703.

Kesmen, Z., Gulluce, A., Sahin, F., Yetim, H. (2009). Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay. Meat Science, 82:444-449.

Kim, M. and Kim, H. (2017). Species identification of commercial jerky products in food and feed using direct pentaplex PCR assay. Food Control, 78:1-6.

Matsunaga, T., Chikuni, K., Tanabe, R., Muroya, S., Shibata, K., Yamada, J., Shinmura, Y. (1999). A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. Meat Science, 51:143-148.

Mikel, P., Vasickova, P., Tesarik, R., Malenovska, H., Kulich, P., Vesely, T., Kralik, P. (2016). Preparation of MS2 Phage-Like Particles and Their Use As Potential Process Control Viruses for Detection and Quantification of Enteric RNA Viruses in Different Matrices. Frontiers in Microbiology, 7. doi:10.3389/fmicb.2016.01911.

Mousavi, S.M., Khaniki, G.J., Eskandari, S., Rabiei, M., Samiee, S.M., Mehdizadeh, M. (2015). Applicability of species-specific polymerase chain reaction for fraud identification in raw ground meat commercially sold in Iran. Journal of Food Composition and Analysis, 40:47-51.

Ponzoni, E., Breviario, D., Mautino, A., Giani, S., Morello, L. (2013). A multiplex, bead-based array for profiling plant-derived components in complex food matrixes. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 405 (30):9849-9858.

Prusakova, O.V., Glukhova, X.A., Afanas'eva, G.V., Trizna, Y.A., Nazarova, L.F., Beletsky, I.P. (2018). A simple and sensitive two-tube multiplex PCR assay for simultaneous detection of ten meat species. *Meat Science*, 137:34-40.

Ren, Y., Li, X., Liu, Y., Yang, L., Cai, Y., Quan, S., Pan, L., Chen, S. (2017). A novel quantitative real-time PCR method for identification and quantification of mammalian and poultry species in foods. *Food Control*, 76:42-51.

Reslova, N., Michna, V., Kasny, M., Mikel, P., Kralik, P. (2017). xMAP Technology: Applications in detection of pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 8(55): 10.3389/fmicb.2017.00055

Ribani, A., Schiavo, G., Utzeri, V.J., Bertolini, F., Geraci, C., Bovo, S., Fontanesi, L. (2018). Application of next generation semiconductor based sequencing for species identification and analysis of within-species mitotypes useful for authentication of meat derived products. *Food Control*, 91:58-67.

Shehata, H.R., Li, J., Chen, S., Redda, H., Cheng, S., Tabujara, N., Li, H., Warriner, K., Hanner, R. (2017). Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) assays integrated with an internal control for quantification of bovine, porcine, chicken and turkey species in food and feed. *Plos One*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182872>

Song, J., Li, P.E., Gans, J., Vuyisich, M., Deshpande, A., Wolinsky, M., White, P.S. (2010). Simultaneous pathogen detection and antibiotic resistance characterization using SNA-based multiplexed oligonucleotide ligation-PCR (MOL-PCR). *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 680:455-464.

Thierry, S., Hamidjaja, R.A., Girault, G., Löfström, C., Ruuls, R., Sylviane, D. (2013). A multiplex bead-based suspension array assay for interrogation of phylogenetically informative single nucleotide polymorphisms for *Bacillus anthracis*. *Journal of Microbiological Methods* 95: 357-365. doi:10.1016/j.mimet.2013.10.004.

Woods, T. A., Mendez, H.M., Ortega, S., Shi, X., Marx, D., Bai, J., Moxley, B.A., Nagaraja, T.G., Graves, S. W., Deshpande, A. 2016. Development of 11-Plex MOL-PCR Assay for the

Rapid Screening of Samples for Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 6, doi:10.3389/fcimb.2016.00092.

VII. Seznam publikací a dalších výstupů, které předcházely metodice

Servusová, E., Piskatá, Z., Reslová, N., Králík, P. Identifikace živočišných druhů v potravinách a krmivech pomocí metody MOL-PCR. Ve sborníku z konference: XLVIII. Lenfeldovy a Höklovy dny, 17.-18.10.2018, s. 79-80, Brno. ISBN: 978-80-7305-807-4.

Reslova, N., Michna, V., Kasny, M., Mikel, P., Kralik, P. (2017). xMAP Technology: Applications in detection of pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 8(55): 10.3389/fmicb.2017.00055



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