

## AKTUÁLNÍ TRENDY DRUHOVÉ IDENTIFIKACE RYBÍHO MASA POMOCÍ MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÝCH METOD

SIMONA LENCOVÁ<sup>a</sup>, KAMILA ZDEŇKOVÁ<sup>a</sup>,  
DILIARA AKHATOVA<sup>a,b</sup> a KATEŘINA  
DEMNEROVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav biochemie a mikrobiologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, <sup>b</sup> Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i., Radiová 1285/7, 102 00 Praha 10  
lencovas@vscht.cz

Došlo 7.3.18, přepracováno 7.12.18, přijato 24.1.19.

Klíčová slova: falšování rybího masa, polymerasová řetězová reakce, izotermická amplifikace zprostředkovaná smyčkou (LAMP), Multi-Analyte Profiling (xMAP)

### Obsah

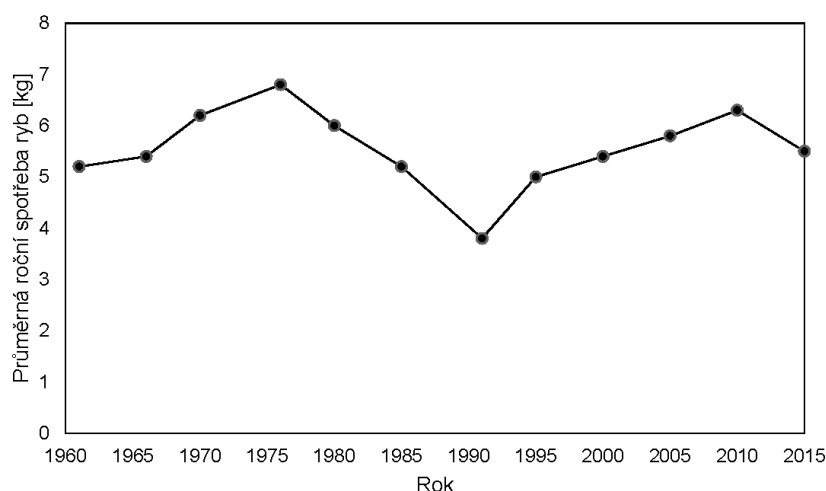
1. Úvod
2. Legislativní požadavky
3. Identifikace ryb
  - 3.1. Identifikační markery
    - 3.1.1. Mitochondriální markery
    - 3.1.2. Genomové markery

4. Nové molekulárně-biologické metody identifikace ryb
  - 4.1. Využití metody izotermické amplifikace DNA (LAMP) pro identifikaci ryb
  - 4.2. Využití metody Multi-Analyte Profiling (xMAP) pro identifikaci ryb
5. Závěr

### 1. Úvod

Falšování potravin je velkým problémem na současném světovém trhu. Nejčastěji jsou falšovány drahé potraviny (víno, koření) nebo potraviny prodávané ve velké míře (maso a masné výrobky, tuky, oleje), z čehož vyplývá, že ekonomický aspekt je hlavní příčinou pro falšování. Hlavním důvodem falšování potravin je v obou případech snaha výrobce o snížení nákladů na výrobu, přičemž v informacích pro spotřebitele uvedených na obalu výrobku deklaruje vyšší kvalitu, než ve skutečnosti prodává<sup>1,2</sup>.

Ryby a rybí výrobky patří stále častěji mezi falšované komodity zejména díky jejich zvýšené oblíbenosti u konzumentů. Roční průměrná světová spotřeba rybího masa na osobu vzrostla z 9,9 kg v roce 1960 na 14,4 kg v roce 1990 a v roce 2014 již dosahovala 20,1 kg (cit.<sup>3</sup>). V České republice není v uplynulých letech jednoznačný trend spotřeby ryb, od roku 2010, kdy byla spotřeba vyšší než 6,0 kg na osobu za rok, ale dochází ke snižování. V roce 2015 byla spotřeba ryb přibližně 5,5 kg na osobu za rok<sup>4</sup>. Grafické znázornění roční spotřeby ryb v České republice v letech 1961–2015 je zobrazeno na obr. 1.



Obr. 1. Grafické znázornění dlouhodobého vývoje spotřeby ryb v České republice vyjádřen v kg na osobu za rok. Nejvyšší celková spotřeba byla zaznamenána v roce 1976 a minimální celková spotřeba v roce 1991. Upraveno dle (cit.<sup>4</sup>)

Ryby a výrobky z nich jsou falšovány různými způsoby, které obcházejí požadavky aktuálně platné legislativy. Mezi rozšířené způsoby falšování zmíněných potravinářských komodit patří záměna určitého druhu ryby za jiný, levnější, přídavek levnější složky – např. nedeklarovaný přídavek rostlinných bílkovin, nepovolené přibarvování pro zlepšení sensorických vlastností výrobků, nedodržení deklarovaného technologického postupu – např. vydávání mrazených ryb za čerstvé, uvádění nesprávného geografického původu ryby nebo uvádění jiného způsobu chovu. Za nejčastější způsob klamání zákazníků jsou považovány nedeklarované přídavky vody, které zvyšují finální hmotnost ryb nebo rybích výrobků<sup>2</sup>. Velkým problémem při zpracování ryb a jedním z důvodů pro jejich nepovolenou úpravu je, v porovnání s masem jatečných zvířat, jejich rychlé podléhání zkáze. Rybí svalovina obsahuje velké množství vody a bílkovin, a tak je vhodným substrátem pro psychrofilní a mesofilní bakterie. Po uplynutí doby, po kterou lze ryby uchovat čerstvé, dochází ke změnám jasně pozorovatelných sensorických vlastností – barva, chuť a konzistence, což vyústí ve změny kvality výrobků. Příklady způsobů falšování ryb a rybích výrobků jsou uvedeny v tab. I.

Nedostatky finálních výrobků z ryb zakoupených v běžné tržní síti v České republice a jejich jednotlivé procentuální zastoupení byly vyhodnoceny v roce 2017 Státní zemědělskou a potravinářskou inspekcí (SZPI). SZPI se zaměřila na hodnocení kvality prodávaných výrobků a na podmínky jejich prodeje. Výsledky ukázaly, že hlavními nedostatky jsou chybějící povinné údaje ve značení výrobků (20,5 %), značení výrobků bez údajů v českém jazyce (19,7 %), nevyhovující výsledky analytického stanovení (18,8 %), nevyhovující podmínky uchování (10,3 %), označení s nesprávně uvedenými údaji (8,5 %), zkažené výrobky (7,7 %), značení se zavádějícími údaji (6,8 %), pozměňování etiket (5,1 %), prodej výrobků s prošlým

datem spotřeby (1,7 %) a na závěr průkaz mikroorganismu *Listeria monocytogenes* ve výrobcích (0,9 %) (cit.<sup>5</sup>).

Na aktuálnost této problematiky poukazují i kontroly ryb a rybích výrobků prováděné po celém světě v obchodech i restauracích. Jedním z příkladů je kontrola provedená v roce 2014 v České republice Krajskou hygienickou stanicí Středočeského kraje se sídlem v Praze. Při kontrole bylo v několika stravovacích zařízeních odebráno 27 vzorků pokrmů ze svaloviny treskovitých ryb. Deset vzorků bylo vyhodnoceno jako nevyhovující a u všech byl prokázán jiný druh ryby (zejména štikozubec) nebo jiný druh tresky, než byl uveden<sup>6</sup>. Dalším příkladem je kontrola Státní zemědělské a veterinární inspekce z roku 2016, která odhalila několik příkladů falšování filet tresky. Jednalo se zejména o klamné uvedení obsahu masa ve výrobku a nepovolené přidání vody pro zvýšení hmotnosti.

## 2. Legislativní požadavky

Nezbytným aspektem pro udržování kvality prodáváných potravin je důsledně nastavená legislativa a prostředky kontroly jejího dodržování, tedy zejména kontrolním orgánem SZPI. Pro maso, masné výrobky, ryby, ostatní vodní živočichy a výrobky z nich, a pro vejce a výrobky z nich je dána vyhláška č. 69/2016 Sb. v platném znění<sup>7</sup>, která navazuje na předpisy Evropské unie, a to na Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1308/2013, kterým se stanoví společná organizace trhů se zemědělskými produkty a Nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu, v platném znění.

Vyhláška stanovuje požadavky na vybrané masné výrobky, které musí výrobci plnit. Jsou zde definovány požadavky na složení výrobků, minimální obsah masa a tuku, obsah čistých svalových bílkovin apod. Na produk-

Tabulka I

Příklady způsobů falšování rybiho masa a rybích výrobků<sup>2</sup>. Ceny ryb odpovídají průměrným cenám v tržní síti v České republice

Způsob falšování potravin	Konkrétní příklad falšování ryb a rybích výrobků
Záměna potravin za jinou, levnější	1. Vydávání pražmy zpěvné (79,-/kg) za pražmu královskou (335,-/kg) 2. Vydávání pangase (106,-/kg) za tresku (320,-/kg) 3. Vydávání mořského pstruha (220,-/kg) za lososa (620,-/kg)
Nastavování potravin levnější složkou	1. Nedeklarované přídavky sójových, cereálních, hrachových a jiných rostlinných bílkovin do masných a rybích výrobků 2. Nedeklarované přídavky vody pro zvýšení váhy produktu
Nastavení nebo falšování potravin ke zlepšení jejich vlastností	Nedeklarované nebo nepovolené přibarvování masných a rybích výrobků
Nedodržení deklarovaného technologického postupu	Vydávání rozmrazeného masa a ryb za čerstvé
Nesprávné uvádění geografického původu nebo způsobu produkce	1. Uvádění nesprávného geografického původu 2. Vydávání ryb chovaných na farmách za divoké

ty rybolovu a ostatní vodní živočichy je zaměřen oddíl 3, § 16 až § 19. Ve vyhlášce jsou dále uvedeny i požadavky na označení výrobků, na jakost a na jejich uvádění do oběhu<sup>5</sup>. V příloze 9 této vyhlášky jsou dále uvedeny povolené záporné hmotnostní odchylky pro rybí výrobky, které jsou uváděny na obalech konečných výrobků.

Požadavky na jakost výrobků jsou důležitou částí vyhlášky. V případech, kdy tyto požadavky na jakost nestanoví přímo použitelné předpisy Evropské unie upravující produkty rybolovu a akvakultury, platí požadavky uvedené v odstavcích 2 až 6 této vyhlášky. Odstavec 2 uvádí, že čerstvé produkty rybolovu a akvakultury a ostatní vodní živočichové musí vykazovat konzistenci s vlastnostmi charakteristickými pro strukturu svaloviny. Třetí odstavec se týká tepelného zpracování ryb. Uvádí se zde, že zpracované produkty rybolovu je nutné tepelně zpracovat tak, aby ve všech částech výrobků bylo dosaženo minimálně tepelného účinku srovnatelného s působením teploty 70 °C po dobu 10 min. Solených produktů rybolovu se týká odstavec 4, který definuje silně solené (více než 14 % soli), středně solené (10–14 % soli) a slabě solené (4–10 % soli) produkty. Pátý odstavec omezuje obsah soli v sardelové pastě na maximálních 25 % a poslední šestý odstavec vymezuje povolený obsah vody ve výrobcích na méně než 18 %. Vyhláška obsahuje i požadavky na uvádění produktů do oběhu. Polotovary z produktů rybolovu mohou být prodávány pouze balené nebo zabalené. Produkty se nesmějí uvádět na trh společně s dalšími potravinami takovým způsobem, při němž by mohlo dojít k vzájemnému nepříznivému ovlivnění pachy<sup>7</sup>.

### 3. Identifikace ryb

Identifikace ryb byla dříve založena na analýze morfologických znaků. Hodnoceny byly charakteristiky kvalitativní i kvantitativní. Mezi kvalitativní charakteristiky patří hodnocení tvaru rybiho těla, rozmístění ploutví, zbarvení, poloha úst a event. vousků a další. Mezi kvantitativní znaky, které lze vyjádřit matematicky, patří délky různých částí těla, počet šupin, počet obratlů, kostí a další. Konkrétní znaky jsou vždy charakteristické pro určitou skupinu ryb v závislosti zejména na charakteru prostředí výskytu daného druhu a na etologii (zejména na způsobu získávání potravy) daných druhů ryb.

Aplikace těchto požadavků není možná při zpracování ryb do jednotlivých výrobků. V konečných produktech ve většině případů nelze rozeznat jednotlivé druhy jen na základě morfologických charakteristik. Proto je nutné vyvíjet nové metody pro odhalování falšování rybiho masa. Obecně je pro detekci falšování potravin využíváno celé spektrum metod. Jmenovitě se jedná o plynovou a kapalinovou chromatografii, hmotnostní spektrometrii, infračervenou spektroskopii, nukleární magnetickou rezonanci, imunochemické metody (např. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, ELISA), elektroforézu a další. Nejčastěji používanými metodami se však staly metody založené na analýze nukleových kyselin<sup>8,9</sup>.

V kontrolních laboratořích prakticky zdomácněla molekulárně biologická metoda založená na amplifikaci DNA – polymerasová řetězová reakce (PCR), současně používaná v mnoha oborech jako např. v kriminalistice, prenatalní diagnostice nebo archeologii a dalších oblastech. Tato metoda se využívá pro určení DNA přítomné v čerstvém nebo mraženém mase, ale i ve zpracovaných a vícedruhových výrobcích. Výhodou PCR je malé množství vstupního vzorku<sup>8</sup>.

#### 3.1. Identifikační markery

Samotnou druhovou identifikaci ryb metodou PCR lze provést na základě analýzy tzv. identifikačních markerů. Identifikační markery jsou části sekvencí DNA, které mají jedinečnou primární strukturu pro daný živočišný druh. Tyto markery musí splňovat základní požadavky na analýzu, předně musí vykazovat dostatečnou specifitu pro konkrétní druh, který s jejich pomocí má být stanoven. Volba vhodného markeru pro dané účely je závislá na požadavcích, zejména, zda je prováděna kvalitativní nebo kvantitativní analýza. V současnosti jsou za tímto účelem využívány markery mitochondriální i genomové. Oba druhy markerů mají své výhody i nevýhody. Nejvyužívanějšími markery jsou mitochondriální cytochrom-b a cytochrom-c-oxidasa I a genomové markery beta-aktin a parvalbumin.

V literatuře je řada odkazů na použití mitochondriálních markerů pro identifikaci ryb. Analýzy jsou nejčastěji zaměřeny na cytochrom-b (cit.<sup>11–16</sup>). Mitochondriální markery se ukázaly být spolehlivé pro identifikaci ryb. Výhodou je vysoká citlivost díky velkému počtu kopií oproti jaderné DNA, ale použití mitochondriální DNA pro identifikaci různých druhů ryb nese i své nevýhody. Hlavní nevýhodou mitochondriálních markerů, ve srovnání s genomovými, je nemožnost kvantifikace DNA, protože koncentrace mitochondriální DNA se mění v závislosti na množství mitochondrií v buňce a na typu tkáně<sup>17</sup>.

Genomová DNA je naopak obsažena v každé buňce v závislosti na počtu jader, který bývá pro daný druh organismu téměř vždy stejný<sup>17</sup>. Identifikace ryb pomocí analýzy genomových markerů tak umožňuje nejen kvalitativní, ale i kvantitativní analýzu. Této skutečnosti lze využít při analýze obsahu rybiho podílu ve zpracovaných výrobcích apod., což je při dnešní stoupající oblíbenosti ryb a výrobků z nich velmi užitečné.

##### 3.1.1. Mitochondriální markery

Cytochrom-c-oxidasa I. Prvním mitochondriálním markerem používaným pro účely autentizace ryb je enzym cytochrom-c-oxidasa I (Cox I, EC 1.9.3.1). Segment tohoto mitochondriálního genu o délce 600 bp se stal základem pro taxonomické rozlišení ryb, tzv. DNA-barcoding. DNA-barcoding je metoda založená na skutečnosti, že všechny eukaryotní buňky mají mitochondrie a mitochondriální DNA poměrně snadno podléhá mutacím. Velká míra mutací tak způsobuje diverzitu v jednotlivých druzích i během krátkého evolučního období (např. tisíc generací). Zároveň je však mitochondriální DNA na základě mater-

nální dědičnosti přenášena z matky na potomstvo, a tak nedochází k velkým změnám mitochondriální DNA mezi populacemi. Naopak u diploidní genomové DNA dochází ke značným změnám. Základem myšlenky „barcodingu“ je tedy velká míra mutací vedoucí k divergenci mitochondriální DNA mezi druhy a zároveň malé rozdílnosti DNA v rámci jednoho druhu. Segment Cox I se díky těmto skutečnostem stal globálním bioidentifikačním systémem živočichů<sup>18,19</sup>.

Výsledné sekvence DNA jsou přirovnávány k čárovým kódům, pomocí nichž jsou jednotlivé druhy vymezeny. Tento koncept se stal v současnosti nejvyužívanějším systémem identifikace ryb a ptáků. Mezinárodní výzkum v této oblasti je zaměřen na sestavení referenční knihovny DNA barcodů (DNA čárových kódů) všech druhů ryb s názvem The Fish Barcode of Life Initiative (FISH-BOL). FISH-BOL je společným projektem celkem dvaceti pracovních skupin – devatenácti přímořských a jedné vnitrozemské skupiny, která nese název Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Tyto výzkumné týmy jsou odpovědné za kontrolu sbírky údajů a za barcoding ryb v příslušné oblasti. V databázi FISH-BOL jsou jednotlivé příspěvky děleny do pěti skupin podle stupně identifikace (vysoce spolehlivá identifikace jedince; identifikace jedince s vysokým stupněm spolehlivosti; identifikace genu s vysokým stupněm spolehlivosti, ale nižším pro jedince; identifikace s omezeným stupněm spolehlivosti; identifikace zběžná s nízkým stupněm spolehlivosti)<sup>20</sup>. Výzkum má za cíl vytvořit účinný, spolehlivý, rychlý a ekonomicky efektivní způsob identifikace ryb na základě DNA analýzy<sup>21</sup>.

Důležitým aspektem jednotnosti a snadné orientace v nashromážděných údajích je nutné dodržování stejné formy dokumentace. FISH-BOL je proto vázán na Barcode Data Standard, který zaznamenává kódy jednotlivých druhů dle Darwinova tripletu, jenž zahrnuje údaje o instituci, sbírce a katalogovém čísle. Dále je zde definováno minimální množství informací nutné pro vložení kódu do genomové banky<sup>20</sup>. Vzorok pro barcoding jsou získávány na principu nadbytku, ideálně jsou získány dva vzorky tkání každého jedince. Jeden vzorek je poté zmrazen pro zachování co největšího množství charakteristik a druhý vzorek je umístěn do ethanolu nebo jiného konzervačního prostředku s cílem sloužit jako náhrada, pokud by došlo k rozmrznutí, poškození nebo ztrátě zmrazeného vzorku. Ze získaných exemplářů jsou pak zvoleny vhodné tkáně pro izolaci DNA. Nejvhodnějšími tkáněmi pro tento účel jsou části svaloviny o velikosti 5–7 mm z pravé strany ryby, žábry odebrané z pravé strany jedince, pravé oko (pouze v případě malých jedinců, kdy nelze odebrat dostatečně velkou část svaloviny nebo žaber) nebo celý jedinec v případě extrémně malých jedinců.

Z odebrané tkáně je pak vhodnou metodou izolována DNA. Klasickými metodami izolace DNA, které poskytují dostatečnou čistotu a kvalitu izolované DNA, jsou metody využívající enzym proteinasu K (EC 3.4.21.64) nebo Chelex a dále komerční kity. U izolované DNA je pomocí PCR amplifikován gen pro Cox I a výsledné PCR produk-

ty jsou analyzovány agarosovou elektroforézou. Takto získané PCR produkty jsou následně sekvenovány a ze získaných primárních sekvencí jsou vytvořeny kódy jednotlivých druhů ryb<sup>20</sup>.

Funkčnost DNA-barcodingu byla ověřena mnoha studii<sup>19,22</sup>, avšak i tato metoda má určité limity. Největší nevýhodou je nepoužitelnost pro identifikaci ryb ve směsných vzorcích, a dále, stejně jako u všech mitochondriálních markerů, nemožnost kvantifikace obsahu rybí DNA ve vzorku.

Cytochrom-b. Dalším z často využívaných identifikačních markerů je cytochrom-b. Ten je katalytickou podjednotkou chinol-cytochrom-c-reduktasy (chinol:ferricytochrom-c-oxidoreduktasa, komplex III, EC 1.10.2.2). Cytochrom-b byl použit v mnoha studiích zabývajících se identifikací rybích druhů a ukázal se být vhodným markerem druhové identifikace ryb<sup>14–16</sup>. I u tohoto markeru však byly zaznamenány významné limitace, zejména degradace DNA ve zpracovaných produktech z důvodu poměrně dlouhých amplifikovaných úseků s délkou obvykle 600 bp. S tím souvisí i nemožnost druhové identifikace ve finálních výrobcích a v neposlední řadě i diskutovatelná spolehlivost sekvence<sup>13</sup>.

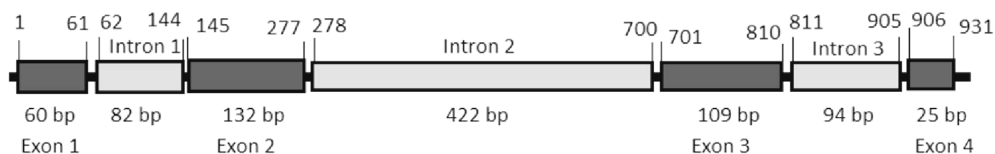
### 3.1.2. Genomové markery

Beta-aktin. Často využívaným markerem pro autentizaci ryb je beta-aktin. Aktiny jsou proteiny obsažené ve všech eukaryotních buňkách a hrají klíčovou roli v zachování cytoskeletu, v buněčné pohyblivosti a v buněčném dělení<sup>23</sup>. Aktiny se vyskytují v několika isoformách a právě beta-aktin je jednou z nich. Gen pro beta-aktin se stal často využívanou interní kontrolou pro kvantifikaci mRNA<sup>24–26</sup>.

Parvalbumin. Parvalbuminy jsou proteiny o molekulové hmotnosti 12 kDa. Vyskytují se pouze u obratlovců, a to zejména v cytosolu kosterních svalů, které se rychle stahují, v centrální nervové soustavě a v endokrinních žlázách. Ve svalovině ryb jsou zastoupeny ve velké míře<sup>27–29</sup>.

Analýzy prováděné na základě amplifikace genu kódujícího parvalbumin jsou výhodné z mnoha důvodů. Jako genomový marker je parvalbumin použitelný pro kvantifikaci DNA ve výrobcích. Velkou výhodou je jeho struktura, která je vhodná pro druhovou identifikaci ryb. Protein-kódující oblast parvalbuminového genu obsahuje tři introny a právě pomocí PCR analýzy dostatečně dlouhého druhého intronu lze provést druhovou identifikaci ryb<sup>9</sup>. Volba druhého intronu parvalbuminového genu pro PCR je založena na jeho velké diverzitě napříč druhy. Naopak druhý exon, který leží vedle druhého intronu, je téměř identický u všech druhů ryb. Struktura parvalbuminového genu komerčně významného druhu makrely obecné (*Scomber scombrus*) je znázorněna na obr. 2.

Rozlišení parvalbuminu je důležité i ze zdravotních důvodů. Ryby a výrobky z nich jsou v současnosti považovány za jednu z nejčastějších příčin hypersenzitivity způsobené IgE protilátkami. Parvalbumin je považován za hlavní rybí alergen<sup>31</sup>. Může způsobovat individuální příznaky od kopřivky a dermatitidy až po angioedém (otok



Obr. 2. Schéma protein-kódující oblasti parvalbuminového genu makrely obecné (*Scomber scombrus*) s vyznačením exonů a intronů. U každého úseku je uvedena velikost v párech bazí (bp). Schéma bylo vytvořeno na základě sekvence FN544077.1 (cit.<sup>30</sup>)

vznikající na různých místech organismu – zejména sliznicích dýchacího a trávicího ústrojí), dále pak průjmy, astma až po anafylaktický šok a smrt<sup>31</sup>. Závažnost alergických reakcí je závislá na druhu ryby, protože gen kódující parvalbumin je u každého rybiho druhu jiný. U některých jedinců může i stopové množství tohoto alergenu ohrozit život.

Běžně používanými metodami detekce alergenů v potravinách jsou imunochemické metody založené na analýze proteinů a PCR (cit.<sup>32</sup>). DNA analýza pomocí PCR je pro stanovení alergenu v potravinách vhodnější, protože během zpracování potravin může docházet ke změnám struktury proteinů a k ovlivnění účinnosti proteinových metod potravinovou maticí. PCR s využitím analýzy protein-kódující oblasti parvalbuminového genu se jeví jako vhodný nástroj druhové identifikace ryb a díky tomu i rychlé detekce hlavního rybiho alergenu. Výhodou jeho využití pro identifikaci oproti Cox I je i fakt, že není potřeba provádět sekvenaci pro určení druhu.

Parvalbumin byl využit jako vhodný marker druhové identifikace ryb ve studiích zabývajících se identifikací mořana tmavého (*Spondyliosoma cantharus*)<sup>9,10,33</sup> nebo sledě obecného (*Clupea harengus*) a sledě pacifického (*Clupea pallasii*)<sup>34</sup>.

#### 4. Nové molekulárně-biologické metody identifikace ryb

##### 4.1. Využití metody izotermické amplifikace DNA (LAMP) pro identifikaci ryb

V posledních letech se stala vyhledávanou metodou amplifikace nukleových kyselin metoda izotermické amplifikace zprostředkované smyčkou (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP). Tato metoda byla vyvinuta v roce 2000 (cit.<sup>35</sup>). V uvedené studii, v níž byla poprvé uveřejněna, byla metoda testována na virové DNA izolované z bakteriofága M13. Tato metoda slibuje jednoduché použití a rychlou a přesnou amplifikaci DNA.

Při metodě LAMP je využíván soubor primerů – vnější primery F3 a B3 a vnitřní primery FIP a BIP. Tyto páry primerů rozpoznávají cílové oblasti genomové DNA a umožňují tak vysokou specifitu reakce. Do reakce je přidávána Bst-DNA-polymerasa izolovaná z bakterie *Ba-*

*cillus stearothermophilus*, která dokáže oddělovat kódující vlákno DNA a nahrazovat ho novým, syntetizovaným řetězcem. Polymerasa slouží k iniciaci amplifikace skládající se ze tří kroků. Prvním krokem je produkce počátečního materiálu, druhý krok je cyklická amplifikace a třetím krokem je elongační fáze, při níž dochází k prodlužování nového řetězce DNA ve směru od 5' konce ke 3' konci pomocí Bst-DNA-polymerasy. Oba páry primerů jsou využity v prvním kroku reakce, ale pouze vnitřní primery jsou potřebné pro druhou a třetí fázi. Množství cílové sekvence je tedy ztrojnásobeno během každé poloviny cyklu. Rychlost exponenciální amplifikace může být zvýšena adicí smyčkových primerů, které mohou snížit dobu trvání analýzy na méně než 30 minut. Tyto primery však nejsou pro LAMP nezbytné. Během amplifikace vzniká pyrofosforečnan hořecnatý, čímž dochází k tvorbě zákalu, který lze detegovat pomocí turbidimetrie. Pro detekci mohou být využita také specifická barviva<sup>35,37–39</sup>. Princip metody LAMP je znázorněn na obr. 3.

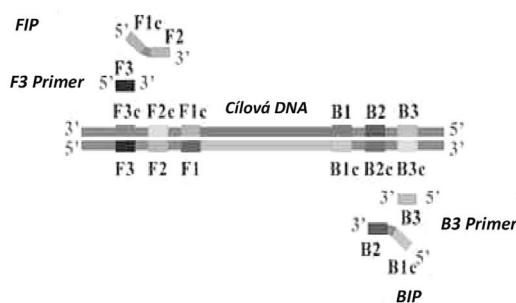
Metoda LAMP nalezla široké uplatnění v klinické diagnostice. V současnosti jsou zaváděny i aplikace v autentizaci ryb, masa a rostlin. Hlavní výhodou využití metody LAMP je oproti ostatním metodám zejména rychlé stanovení bez nutnosti drahého laboratorního vybavení, což umožňuje použití i v terénu. Další výhodou je oproti polymerasám využívaným k PCR vyšší tolerance Bst-DNA-polymerasy k inhibitorům izolace DNA, a z toho vyplývající možnost spojení metody LAMP s metodami rychlé izolace DNA. Použití LAMP tedy může představovat značné zjednodušení rutinní DNA analýzy, přestože návrh primerů je ve srovnání s PCR složitější.

##### 4.2. Využití metody Multi-Analyte Profiling (xMAP) pro identifikaci ryb

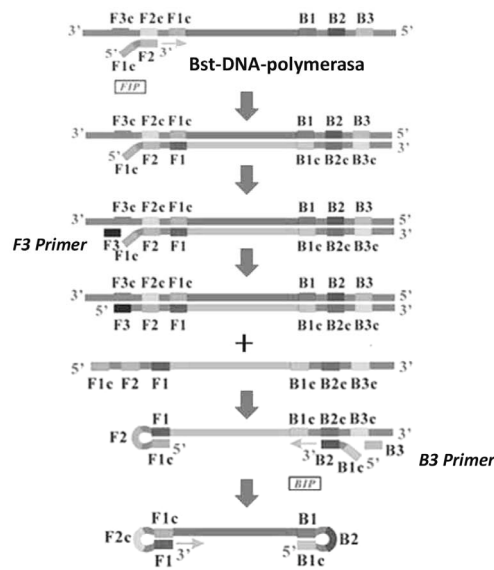
Přestože PCR se stala již zavedenou metodou pro identifikaci ryb, objevují se nové metody s vysokým potenciálem pro využití v této oblasti. V současné době se stala slibným nástrojem druhové identifikace ryb metoda xMAP (angl. Multi-Analyte Profiling). xMAP technologie byla vyvinuta firmou Luminex Corporation (Austin, TX, USA). Je kombinací principů používaných v PCR nebo imunometodě ELISA a v průtokové cytometrii.

Jedná se o metodu založenou na měření fluorescence molekul vázaných na polystyrenových nebo magnetických

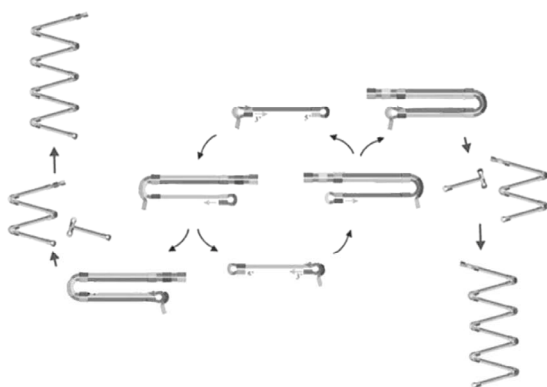
## 1. schéma čtyř základních primerů pro LAMP



## 2. izotermická amplifikace LAMP



## 3. cyklická fáze LAMP amplifikace

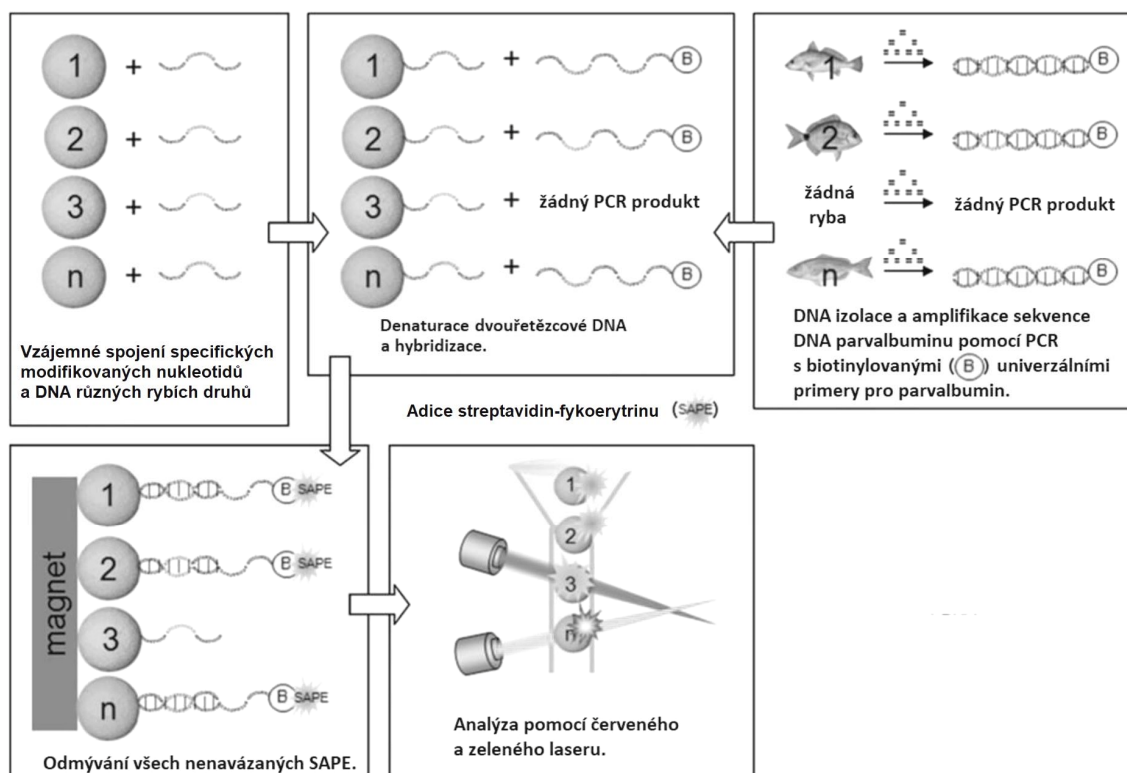


Obr. 3. Schéma primerů pro LAMP, mechanismus izotermické amplifikace a cyklické fáze LAMP. Část DNA je denaturována na jednotlivé řetězce, fragment Bst-DNA-polymerasy prodlužuje nový řetězec ve směru od 5' konce ke 3' konci nového řetězce. Bst-DNA-polymerasa syntetizuje nový řetězec za současného vytěsnění původního řetězce a díky vzájemně komplementárním částem vzniká na 5' konci smyčka. Tytéž kroky proběhnou i na 3' konci templátové DNA a vzniká tzv. struktura činky, která je výchozí strukturou pro cyklické kroky LAMP amplifikace. Bst-DNA-polymerasa prodlužuje oba řetězce a otevírá smyčku na 5' konci, vznikne tak struktura vlásenky a dojde k vytěsnění nově syntetizovaného řetězce. Ten opět vytvoří strukturu činky. Primer BIP nasedá na komplementární úsek na čince i na vlásence a opět dochází k syntéze nových řetězců a vytěsnění původních. Tento proces se cyklicky opakuje. Upraveno dle (cit.<sup>40</sup>)

mikrokuličkách značených až pěti sty odlišnými fluorescenčními barvami (tzv. spektrální kód). Na každém druhu mikrokuliček je vázána cílová molekula, kterou může být mimo jiné DNA sonda nebo protilátka. Tyto mikrokuličky postupně procházejí Luminex® analyzátozem a dochází k excitaci fluorescenčních barviv. U každé z nich je měřena fluorescence po excitaci dvěma lasery v kyvetě z křemičitého skla. První laser excituje při 635 nm červený fluorochrom v kuličce a určuje tak spektrální kód, tedy i druh analytu. Tohoto principu je využíváno pro kvalitativní analýzu. Druhý laser excituje při 532 nm fluorochrom fykoerytrin. Tím se měří intenzita fluorescence a stanovuje množství analytu. Je tedy využíván pro kvantitativní analýzu<sup>41</sup>. Optické signály jsou pak vedeny k jednotlivým detektorům s fotonásobičem. Pro analýzu jsou používány mikrofiltrační destičky s jamkami. Pomocí této metody lze analyzovat až 500 různých inter-

akcí pro danou molekulu<sup>42</sup>. Princip metody xMAP je znázorněn na obr. 4.

Technologie xMAP byla úspěšně použita ve studii zabývající se identifikací ryb na základě analýzy parvalbuminového genu<sup>43</sup>. Ve studii byla navržena univerzální sonda cílená na vysoce konzervovanou část druhého exonu parvalbuminového genu. Dále byly navrženy specifické sondy pro identifikaci osmi vybraných druhů ryb cílené na oblast druhého intronu parvalbuminového genu. Byla prokázána výhodnost metody xMAP z hlediska rychlé analýzy velkého množství vzorků a vysoké specifity. Během analýzy nebyly zaznamenány žádné křížové reakce mezi jednotlivými vzorky ryb. Výsledky analýzy poukazují na velký potenciál využití této metody v běžné praxi pro identifikaci ryb<sup>43</sup>. Hlavní nevýhodou rutinního využití metody xMAP je však její vysoká cena v porovnání s ostatními uvedenými metodami.



**Obr. 4. Schéma metody xMAP použité pro analýzu ryb.** Modifikované oligonukleotidy jsou kovalentně spojeny s barevně kódovanými magnetickými mikrosférami. DNA kódující parvalbumin je amplifikována pomocí PCR v reálném čase, zatímco jeden z primerů je značen biotinem. Biotinem značené DNA řetězce jsou hybridizovány na odpovídající oligonukleotidy. Fluorofor streptavidin-fykoerytrin (SAPE) je přidán do reakce a vázán na molekuly biotinu. Reakční zkušavky obsahující magnetické mikrosféry jsou umístěny na magnet, nevázané oligonukleotidy a SAPE jsou odstraněny promytím. Samotná analýza probíhá pomocí dvou laserů, po digitálním zpracování signálu je klasifikována a kvantifikována cílová molekula. Upraveno dle (cit.<sup>43</sup>)

## 5. Závěr

Falšování rybiho masa a rybích výrobků je aktuálním problémem současného světového trhu. Proto se hledají nové rychlé a spolehlivé metody identifikace jednotlivých druhů ryb nejen v čisté svalovině, ale i ve zpracovaných výrobcích. Výběr metody i vhodných identifikačních markerů je základem úspěšné analýzy. Při výběru je nutno zohlednit, zda půjde o kvalitativní či kvantitativní analýzu, zda se bude jednat o druhovou identifikaci a další parametry. Přestože v současné době používané techniky nabízejí spolehlivé analýzy druhové identifikace ryb, a díky tomu i odhalování falšování rybiho masa a rybích výrobků, je nutné stávající metody zlepšovat a hledat metody nové, které umožní předcházet zdravotním rizikům plynoucím z konzumace ryb osobami trpícími alergiemi. Kromě již zavedené metody PCR a PCR spojené se sekvenací amplifikovaného úseku (barcoding) se jeví jako slibné nástroje identifikace ryb metody LAMP a xMAP.

*Tato práce byla podpořena z finančních prostředků projektů MZe RO0318 a MZe NAZV QK1910231.*

### Seznam zkratk

Cox I	cytochrom-c-oxidasa I
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, enzymový imunosorbentní test
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations, Organizace pro výživu a zemědělství
FISH-BOL	The Fish Barcode of Life Initiative
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification, izotermická amplifikace zprostředkovaná smyčkou
SZPI	Státní zemědělská a potravinářská inspekce
xMAP	Multi-Analyte Profiling

## LITERATURA

- Winter Z.: *Zlatá doba měst českých*. Odeon, Praha 1991. <http://texty.citanka.cz/winter/zdtdoc.html>, staženo 20. 2. 2018.
- Čížková H., Ševčík R., Rajchl A., Pivoňka J., Vol-dřich M.: Chem. Listy 106, 903 (2012).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>, staženo 10. 11. 2017.
- Štiková O., Mrháková I.: Ústav zemědělské ekonomiky a informací, <http://www.vyzivaspol.cz/wp-content/uploads/2017/10/Stikova.pdf>, staženo 10. 12. 2017.
- Kavka M.: *Ryby, ostatní vodní živočichové a výrobky z nich, Jak poznáme kvalitu?*, Česká technologická platforma pro potraviny, Praha 2017.
- Hrdina J., Fuchsová P.: [http://www.khsstc.cz/dokumenty/vysledky-cilneho-statniho-zdravotniho-dozoru---falsovani-pokrmu-z-ryb-3318\\_3318\\_161\\_1.html](http://www.khsstc.cz/dokumenty/vysledky-cilneho-statniho-zdravotniho-dozoru---falsovani-pokrmu-z-ryb-3318_3318_161_1.html), staženo 10. 12. 2017.
- Vyhláška č. 69/2016 Sb. *o požadavcích na maso, masné výrobky, produkty rybolovu a akvakultury a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich*. Sbirka zákonů 2016, částka 26, str. 714.
- Hubáková Z., Králík P., Kasalová J., Renčová E.: J. Agric. Food Chem. 56, 3454 (2008).
- Hanák P., Laknerová I., Švátora M.: J. Food Nutr. Res. 51, 81 (2012).
- Laknerová I., Zdeňková K., Purkrťová S., Píkniová L., Vyroubalová Š., Hanák P.: J. Food Qual. 37, 429 (2014).
- Infante C., Crespo A., Zuasti E., Ponce M., Pérez L., Funez V., Catanese G., Manchado M.: Food Res. Int. 39, 1023 (2006).
- Velasco A., Sánchez A., Martínez I., Santaclara F., Pérez-Martín R., Sotelo C.: Food Chem. 141, 2006 (2013).
- Teletchea F.: Springer 19, 265 (2009).
- Hisar O., Erdogan O., Aksakal E., Hisar S.: Israeli Journal of Aquaculture 58, 62 (2006).
- Calo-Mata P. a 10 spoluautorů: Eur. Food Res. Technol. 217, 259 (2003).
- Sevilla F. a 10 spoluautorů: Mol. Ecol. Notes 7, 730 (2007).
- Ballin N. Z., Vogensen F. K., Karlsson A. H.: Meat Sci. 83, 165 (2009).
- Hebert P., Cywinska A., Ball S., deWaard J.: Proc. R. Soc. B 270, 313 (2003).
- Ward R., Zemlak T., Innes B., Last P., Hebert P.: Philos. Trans. R. Soc., B 360, 1847 (2005).
- Steinke D., Hanner R.: Mitochondrial DNA 22, 10 (2011).
- Ivanova N., Zemlak T., Hanner R., Hebert D.: Mol. Ecol. Notes 7, 544 (2007).
- Kozchius M. a 21 spoluautorů: PLoS One 5, 1 (2010).
- Venkatesh B., Tay B., Elgar G., Brenner S.: J. Mol. Biol. 259, 655 (1996).
- Lee J.: Mar. Biotechnol. 2, 161 (2000).
- Sohn Y. C., Kobayashi M., Aida K.: Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol. 129, 419 (2001).
- Wang Y., Ge W.: Gen. Comp. Endocrinol. 134, 308 (2003).
- Endo T., Takazawa K., Onaya T.: Endocrinology 117, 527 (1985).
- Rall J. A.: News Physiol. Sci. 11, 249 (1996).
- Cates S., Teodoro M., Philips G.: Biophys. J. 82, 1133 (2002).
- NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FN544077.1/>, staženo 5. 4. 2017.
- Svoboda A., Bugajska-Schretter R., Valenta S., Spitzauer S.: Allergy 57, 94 (2002).
- Houhoula D., Dimitriou P., Mengjezi G., Kyrana V., Lougovois V.: Czech J. Food Sci. 33, 143 (2015).
- Akhatova D., Laknerová I., Zdeňková K., Ólafsdóttir G., Magnúsdóttir S., Píkniová L., Kýrová V., Lerch Z., Hanák P.: J. Food Nutr. Res. 57, 27 (2018).
- Renčová E., Kostelníková D., Tremlová B.: Food Addit. Contam., Part A 10, 37 (2013).
- Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T.: Nucleic Acids Res. 28, e63 (2000).
- Aonuma H., Yoshimura A., Kobayashi T., Okado K., Badolo A., Nelson B., Kanuka H., Fukumoto S.: Exp. Parasitol. 125, 179 (2010).
- Ushikubo H.: Uirusu 54, 107 (2000).
- Li Y., Fan P., Zhou S., Zhang L.: Microb. Pathog. 107, 54 (2017).
- Angers A. a 10 spoluautorů: JRC technical reports – Enhancing fish species identification using novel markers and emerging technologies (2017). [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC105966/jrc\\_technical\\_report\\_-\\_spiuice.pdf](http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC105966/jrc_technical_report_-_spiuice.pdf), staženo 4. 4. 2018.
- Eiken Genome Site: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>, staženo 30. 4. 2018.
- Earley M. C., Vogt R. F., Shapiro H. M., Mandy F. F., Kellar K. L., Bellisario R., Pass K. A., Marti G. E., Stewart C. C., Hannon W. H.: Cytometry 50, 239 (2002).
- ThermoFisher: <https://www.thermoFisher.com/cz/en/home/references/protein-analysis-guide/multiplex-assays-luminex-assays/how-xmap-technology-works.html>, staženo 12. 12. 2017.
- Hildebrandt S.: Anal. Bioanal. Chem. 397, 1787 (2010).



**S. Lencová<sup>a</sup>, K. Zdeňková<sup>a</sup>, D. Akhatova<sup>a,b</sup>, and K. Demnerová<sup>a</sup>** (<sup>a</sup>*Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology Prague,* <sup>b</sup>*Food Research Institute Prague*): **Current Trends of Fish Species Identification by Molecular-Biological Methods**

Nowadays, food adulteration is a common problem. Fish meat is a typical commodity which is adulterated very often. Therefore, it is necessary to find effective methods for fish meat authentication. Molecular-biological methods based on the analysis of mitochondrial and genomic markers were proved to be suitable for this purpose. Especially, polymerase chain reaction is commonly used, but there are new methods like Loop-mediated Isothermal Amplifica-

tion or Multi-Analyte Profiling with a huge potential for fish species identification. In this paper, advantages and disadvantages of a use of different markers and three molecular-biological methods for the purpose of fish fraud detection are summarized.

**Keywords:** fish adulteration, polymerase chain reaction, Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP), Multi-Analyte Profiling (xMAP)

*Acknowledgements*

*This work was supported by grants from the Ministry of Agriculture of the Czech Republic MZe RO0318 and MZe NAZV QK1910231.*