

TESTOVÁNÍ VLIVU POTRAVINÁŘSKÝCH LÁTEK NA IZOLACI DNA Z MAKRELY OBECNÉ A RYBÍCH PRODUKTŮ

ELIŠKA ČERMÁKOVÁ^{a,b}, KATEŘINA KODEŠOVÁ^b, PETRA HORKÁ^c, KATEŘINA DEMNEROVÁ^b
a KAMILA ZDEŇKOVÁ^b

^a Výzkumný ústav potravinářský Praha, v. v. i, Radiová 1285/7, 102 00 Praha 10 – Hostivař, ^b Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6 – Dejvice, ^c Ústav pro životní prostředí, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Benátská 2, 128 01 Praha 2, Česká republika
Kamila.Zdenkova@vscht.cz

Došlo 30.11.23, přijato 15.2.24.

Autentizace rybích výrobků s využitím analýzy DNA vyžaduje získání kvalitní DNA bez přítomnosti inhibitorů. V současné době jsou dostupné různé metody pro izolaci nukleových kyselin; pro svou rychlost a nenáročnost extrakčního postupu se staly velmi oblíbenými zejména silikátové centrifugační kolonky. Jejich nevýhodou však může být princip využívající záporný náboj DNA, který může být ovlivněn složením potravin, nebo jejich ucpání v důsledku špatné předúpravy vzorků. Cílem této práce bylo porovnat tři metody izolace DNA využívající různé principy (silikátové centrifugační kolonky, modifikované magnetické kuličky, cetyltrimethylamonium-bromid (CTAB) a chloroformová extrakce) a zhodnotit jejich vhodnost pro izolaci DNA z rybí svaloviny. Posuzovanými kritérii byla výtěžnost, čistota a amplifikovatelnost izolované DNA. Analyzována byla tkáň makrely obecné bez a s přidáním přídatných látek běžně používaných při výrobě rybích produktů, konkrétně difosforečnanů (E 450) a barviv (E 110 a E 124), a následně byla vybrána metoda aplikovaná i na komerčně nabízené výrobky z ryb. Jako nejvhodnější se ukázala upravená metoda využívající detergent CTAB.

Klíčová slova: amplifikace, autentizace potravin, DNA analýza, inhibice, izolace DNA, PCR, rybí produkty

Obsah

1. Úvod
2. Experimentální část
 - 2.1. Vzorky
 - 2.2. Izolace nukleových kyselin
 - 2.2.1. Izolace kitem DNeasy[®] mericon Food Kit
 - 2.2.2. Izolátor croBEE[®] NA16 Nucleic Acid Extraction System Plus
 - 2.2.3. Izolace s využitím detergentu CTAB
 - 2.3. Ověření kvality a kvantity izolované DNA
 - 2.4. Ověření amplifikovatelnosti DNA s využitím PCR v reálném čase s fluorescenční detekcí
3. Výsledky a diskuse
 - 3.1. Izolace DNA z rybí svaloviny a sledování vlivu vybraných potravinářských látek na množství a kvalitu izolované DNA
 - 3.2. Izolace DNA z rybích výrobků
 - 3.3. Ověření kvality DNA s využitím qPCR v reálném čase s fluorescenční detekcí
4. Závěr

1. Úvod

Mořské ryby se stále častěji objevují na jídelníčku obyvatel střední Evropy. V České republice jsou vedle čerstvých ryb nejčastěji prodávány ryby uzené nebo zpracované do výrobků, jako jsou rybí konzervy či pomazánky. Autentizace takových potravin je složitá, protože nelze určit použitý druh na základě morfologických znaků. Pro nepoctivé výrobce to znamená, že mohou snadno nahradit deklarovaný rybí druh méně kvalitním a/nebo levnějším. To vede k falšování potravin záměnou rybích druhů nebo uvedením nadhodnoceného obsahu rybí svaloviny na etiketě, než je ve skutečnosti při výrobě použito^{1,2}. Riziko falšování se v posledních letech značně zvyšuje nejen vlivem rostoucí celosvětové spotřeby ryb a zvyšujícími se náklady na výrobu daných produktů, ale také poklesem populací volně žijících ryb ve světových oceánech a mořích²⁻⁴. Z výše uvedených důvodů je klíčové disponovat vysoce specifickými a rychlými metodami umožňujícími ověření autenticity ryb a rybích výrobků. Jednou z efektivních metod pro stanovení množství a identifikaci druhů ryb ve výrobku je polymerasová řetězová reakce (PCR, angl. Polymerase Chain Reaction). Další vhodnou metodou je například metoda izotermické amplifikace zpro-

středkováné smyčkou (LAMP, angl. Loop-mediated isothermal amplification), která se pro rozlišení druhů ryb využívá teprve pár let⁵. V obou případech je však nezbytné získat izolát nukleové kyseliny (NK) z analyzovaného vzorku, který slouží jako matrice pro analýzu.

Pro správnou detekci druhů ve vzorku je důležité zajistit kvalitní a čistý izolát NK, jelikož na něm závisí účinnost používaných metod. Extrakce NK ze vzorků zahrnuje lyzi buněčných membrán, inaktivaci buněčných nukleas a separaci NK od zbytků buněk. Kvalita DNA je určována délkou fragmentů NK a stupněm jejího poškození, které může být způsobeno různými faktory, například chemickými (látkami využívanými při výrobě potravin), fyzikálními (vyšší teploty, nízké pH, mechanické poškození) a/nebo enzymovými (nukleasy). K degradaci DNA v průběhu zpracování potravinářské suroviny typicky přispívá dlouhotrvající tepelná úprava při konzervaci výrobku či chemická modifikace a hydrolýza DNA v kyselém prostředí, např. u výrobků konzervovaných v octovém nálevu nebo v rajčatovém protlaku. U takto upravených produktů může dojít k ovlivnění výsledků analýz NK. Příčinou nepřesné detekce může být i nízká čistota izolátu NK vlivem nedostatečného odstranění doprovodných látek, které mohou působit jako inhibitory reakce. Pečlivý výběr vhodné izolační metody a procesu purifikace NK je tak při analýze rybích produktů zcela zásadní.

Přítomnost inhibitorů reakce v testovaném materiálu redukuje účinnost amplifikačních metod, například PCR. Mezi inhibitory PCR řadíme běžné složky potravin, jako jsou kationty (Ca^{2+} , Fe^{3+}), těžké kovy, uhlovodíky, tanin (kyselina tříslová), fenoly a soli (NaCl , dusitany). Dále pak proteasy degradující DNA-polymerasy a činidla denaturující DNA-polymerasy, jako je dodecylsírán sodný (SDS), fenol, močovina, Triton X-100 a cetyltrimethylamonium-bromid (CTAB), která bývají používána i při izolaci DNA. Inhibovat reakci mohou rovněž polysacharidy vázající se na aktivní doménu DNA-polymerasy a faktory interferující s ionty hořčíku, mezi které řadíme nukleosidtrifosfáty, primery, chelatační látky (kyselina ethylendiamintetraoctová – EDTA, kyselina egtazová – EGTA), DNA, ionty kovů a proteiny. Účinnost amplifikace tak může být snížena i vysokou koncentrací primerů či DNA v reakční směsi, která vede rovněž ke snížení specifity konkrétní reakce^{6–9}.

Potenciálními inhibitory mohou být i další potravinářské přídatné látky běžně používané za účelem prodloužení doby trvanlivosti či vylepšení chuti potravin. K povoleným látkám využívaným pro úpravu nezpracovaných ryb patří zejména antioxidanty, stabilizátory, konzervanty, tavicí soli, fosforečnany a regulátory kyselosti. Pro zpracované výrobky z ryb jsou používány látky ze skupin barviv, konzervantů, siričitanů, dusičnanů, fosforečnanů a stabilizátorů. Například Žluť SY (Sunset Yellow FCF, Gelborange S; E 110) a Ponceau 4R (košenilová červená A; E 124) jsou syntetická barviva, která dodávají náhražkám lososa požadovaný stabilní odstín a činí je vizuálně přitažlivějšími. Často je tak E 110 a E 124 používáno v rybích pomazánkách nebo u rybích filetů á la losos a jim podobných

výrobci^{10,11}. Do skupin konzervantů (E 338, E 450–452), tavicích solí (E 339, E 450, E 452), stabilizátorů (E 340–343), modifikovaných škrobů a zahušťovačů (E 451) nebo zvlhčujících látek (E 452) mohou být zařazeny kyselina fosforečná (E 338), fosforečnany (E 339–343), di- (E 450), tri- (E 451) a polyfosforečnany (E 452). Na českém trhu jsou dostupné pouze rybí výrobky s přídavkem E 450–452 (cit.¹¹), které jsou používány jako konzervační solící látky. Hlavním důvodem přidávání fosforečnanů je zlepšení vzhledu produktů. Pozitivní účinky fosforečnanů na barvu a obchodní kvalitu solených ryb jsou způsobeny snížením oxidace lipidů a bílkovin ve svalovině, která jinak vede k tmavší barvě výrobků.

Zmíněné přídatné látky je nutné během izolace DNA odstranit. Pro výběr konkrétní izolační metody je tak určující povaha vzorku, doba izolace, cena materiálu a možnost automatizace. K izolaci DNA se dnes nejčastěji využívá extrakce na pevné fázi, konkrétně na silikátových kolonkách nebo magnetických částicích, a to z důvodu časových úspor a jednoduchosti provedení v porovnání s organickou extrakcí.

Cílem této studie je navržení vhodné metodiky pro izolaci DNA z ryb a rybích výrobků. Za tímto účelem byla ověřena efektivita vybraných postupů izolace DNA na vzorcích rybí svaloviny, které byly ošetřeny přídavkem potravinářských přídatných látek, a vybraných komerčních výrobcích. Pro přípravu modelových vzorků (rybí svalovina s přídavkem vybraných látek) byla využita svalovina makrely obecné (*Scomber scombrus*, Linnaeus 1766), která je díky svým nutričním a chuťovým vlastnostem^{12–14}, ale i snadnému rybolovu jednou z nejvíce konzumovaných ryb ve světě^{4,15}. Dílčím krokem hodnocení kvality izolované DNA bylo ověření její amplifikovatelnosti s využitím PCR. Jako marker byl využit jaderný gen pro významný rybí alergen – parvalbumin. Díky tomu může metodika přispět i k významné ochraně zdraví spotřebitele.

2. Experimentální část

Analýza DNA pocházející z potravin zahrnovala odběr a přípravu vzorku pro izolaci DNA. DNA byla izolována třemi různými způsoby a poté byla vyhodnocena kvalita a kvantita izolátů DNA. Ověřena byla i možnost amplifikace DNA pomocí vybrané molekulárně-biologické metody (obr. 1).

2.1. Vzorky

V této studii byly analyzovány vzorky svaloviny makrely obecné (*Scomber scombrus*) s přídavkem a bez přídavku vybraných přídatných látek tak, aby modelovaly složení komerčních výrobků. Pro skupinu vzorků s přídavkem přídatných látek bylo k 200 mg homogenizované svaloviny makrely obecné před samotnou izolací přidáno 8 μl 5% roztoku směsi potravinářských barviv (kombinace E 110 a E 124, ADITIVA CZ s.r.o., ČR) nebo 10 μl 10% roztoku difosforečnanů (E 450, Raps GmbH & Co. KG,



Obr. 1. Pracovní postup při výběru vhodné metody izolace DNA

Německo), což odpovídá údajům o daných přídatných látkách uvedeným výrobcem na etiketě (množství 2000 mg kg⁻¹, resp. 5000 mg kg⁻¹). Vzorky byly homogenizovány mlýnkem IKA A10 (IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Německo) a následně rozváženy po 200 mg do mikrozkuumavek. Takto připravené byly uchovávány při –20 °C do doby dalšího zpracování.

Pro ověření účinnosti vybrané izolační metody i specifity navržených primerů pro identifikaci DNA makrely pomocí PCR (viz tab. I) byly testovány následující vzorky ryb: kapr obecný (*Cyprinus carpio*), karas obecný (*Carassius carassius*), lín obecný (*Tinca tinca*), losos obecný (*Salmo salar*), pangas spodnooký (*Pangasianodon hypophthalmus*), pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*), pražma královská (*Sparus aurata*), sled obecný (*Clupea harengus*), štika obecná (*Esox lucius*), tilapie nilská (*Oreochromis niloticus*), tolstolobik bílý (*Hypophthalmichthys molitrix*), tuňák obecný (*Thunnus thynnus*); z třídy ptáků: kur domácí (*Gallus gallus*), krocan divoký (*Meleagris gallopavo*), kachna domácí (*Anas platyrhynchos*); ze třídy savců: prase domácí (*Sus scrofa*), tur domácí (*Bos taurus*), kůň domácí (*Equus caballus*) a z rostlin: kukuřice setá (*Zea mays*).

Vhodnost vybrané izolační metody v praxi byla dále ověřena analýzou 16 komerčně prodávaných rybích výrobků (viz kapitola 3.2). Vzorky byly homogenizovány mlýnkem IKA A10 (IKA-Werke, Německo) a rozváženy do mikrozkuumavek po 200 mg. Takto připravené byly uchovávány při –20 °C do dalšího zpracování.

2.2. Izolace nukleových kyselin

DNA z homogenizovaného vzorku svaloviny makrely obecné bez přídavku potravinářských látek, s přídavkem barviv a s přídavkem difosforečnanů byla izolována každou z následujících metod (kap. 2.2.1–2.2.3). Vybranou metodou pak byla izolována také DNA ze vzorků tkání živočichů, kukuřice a komerčně nabízených rybích výrobků.

2.2.1. Izolace kitem DNeasy[®] mericon Food Kit

Izolace kitem DNeasy[®] mericon Food Kit (Qiagen, Německo) byla provedena z 200 mg homogenizovaného vzorku podle standardního protokolu s elucí do 100 µl elučního pufru.

2.2.2. Izolátor croBEE[®] NA16 Nucleic Acid Extraction System Plus

K naváženému homogenizovanému vzorku (200 mg) bylo přidáno 400 µl CTAB extrakčního pufru (20 g l⁻¹ CTAB; 1,4 mol l⁻¹ NaCl; 0,1 mol l⁻¹ Tris; 20 mmol l⁻¹ Na₂EDTA; pH 8,0). Směs byla důkladně promíchána a poté byla inkubována 20 minut při 95 °C za stálého míchání. Následovala centrifugace při 11 337 x g (13 000 rpm). 270 µl supernatantu bylo přeneseno do nové mikrozkuumavky a bylo přidáno 20 µl proteinasy K, 10 µl RNA carrier a 100 µl TBE (Tris-borát-EDTA) pufru pro dosažení potřebného objemu (400 µl) stanoveného výrobcem. Takto připravené vzorky byly vloženy do automatického izolátoru croBEE[®] NA16 Nucleic Acid Extraction System (GeneProof[®] a.s., ČR) s kazetami 201

Tabulka I
Přehled použitých primerů

Název	Sekvence (směr 5'–3')	Délka produktu	Amplifikovaná sekvence	Reference
M-F	CAGGACAAGAGTGGCTTCAT	215 bp*	Exon 2–Intron 2	Tato práce
M-R	GCTGTATAGGTGATAGGACAGA	193 bp**	β-parvalbuminu makrel	
R-F	GACAAGAGCGGCTTCATTGAGG	400 až	Exon 3-Exon 4	Rehbein H. ²⁸
R-R	TCAACTCCAATCTTGCCATCACCAT	600 bp	β-parvalbuminu ryb	

* makrela obecná (GenBank: FN544077.1), ** makrela japonská (GenBank: EF016113.1)

se všemi potřebnými roztoky pro izolaci. Eluce DNA byla provedena do sterilní mikrozkuhavky, eluční objem byl 100 μl .

2.2.3. Izolace s využitím detergentu CTAB

Extrakce byla provedena podle EN ISO 21571:2005 (cit.¹⁶) s následujícími úpravami: k připraveným vzorkům svalovin bylo naváženo 50 mg skleněných kuliček o průměru 0,6–0,8 mm a 650 μl CTAB extrakčního pufru, vzorek byl homogenizován pomocí přístroje FastPrep (MP Biomedicals, CA), resuspendace pelety nukleových kyselin byla provedena v 50 μl vody zbavené nukleas (NFW).

Izoláty DNA byly uchovávány v lednici při teplotě 2 až 8 $^{\circ}\text{C}$, v případě delšího skladování pak v mrazicím boxu při teplotě -20°C .

2.3. Ověření kvality a kvantity izolované DNA

Kontrola integrity a čistoty DNA izolované ze vzorku byla provedena pomocí horizontální agarosové elektroforézy s vizualizací zobrazovacím systémem Quantum (Vilber Lourmat, Francie) po barvení Midori Green Advance (NIPPON Genetics, Německo). Kvalita a kvantita DNA byly stanoveny spektrofotometricky pomocí NanoDropTM One (ThermoFisher Scientific, USA), fluorimetricky pomocí QuantusTM Fluorimetr (Promega, USA) a s využitím PCR v reálném čase s fluorescenční detekcí (kapitola 2.4). Rozdíly mezi hodnotami koncentrace a čistoty DNA byly hodnoceny pomocí t-testu za využití Excel 2016 (Microsoft Office).

Izolovaná DNA byla zředěna na zásobní koncentraci 25 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ v NFW, dále pak ředěna dle potřeby v NFW.

2.4. Ověření amplifikovatelnosti DNA s využitím PCR v reálném čase s fluorescenční detekcí

Amplifikace DNA s využitím metody PCR byla provedena v reakční směsi HOT FIREPol[®] EvaGreen[®] qPCR Supermix (Solis BioDyne, Estonsko). Složení reakční směsi bylo dle doporučení výrobce; koncentrace primerů

byla 0,2 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Pro PCR byly použity dvě sady primerů (viz tab. I): univerzální pro rybí DNA (primery “R”) a specificky navržené pro DNA makrely obecné (primery “M”). Teplotní cyklus pro qPCR zahrnoval počáteční aktivaci polymerasy a denuraci DNA při 95 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 12 min, následovanou 45 cykly při 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s a 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s. Analýza křivek tání byla provedena v rozsahu 60–95 $^{\circ}\text{C}$. Výsledky byly vyhodnoceny analýzou křivek tání i prostřednictvím horizontální agarosové elektroforézy v 2 % gelu. Analýzy byly prováděny na dvou pracovištích, v laboratoři VÚPP v.v.i. (termocykler StepOne Plus, Applied Biosystems) a Zkušební laboratoři ÚBM VŠCHT Praha (ABI 7500, Applied Biosystems).

Efektivita amplifikace v PCR byla použita jako parametr pro stanovení míry inhibice v přítomnosti nežádoucích látek ze vzorku. K hodnocení byl využit dokument pro ověřování analytických metod pro testování geneticky modifikovaných organismů při zavádění mezilaboratorně validovaných metod¹⁷. Sledovanými parametry byly: sklon regresní přímky, požadováno rozmezí mezi $-3,6$ a $-3,1$; efektivita 90–110 % a koeficient determinace $R^2 \geq 0,98$. Parametry kalibračních přímků byly zjištěny přímo v softwaru v2.3 pro přístroj ABI 7500 Real Time PCR System a Design & Analysis 2.6.0.

3. Výsledky a diskuse

Cílem této práce byl výběr nejhodnější metody pro izolaci DNA z ryb a rybích výrobků. Testovány byly tři metody, založené na odlišných principech, konkrétně využití (a) silikátových centrifugačních kolonek (DNeasy[®] mericon Food Kit), (b) modifikovaných magnetických kuliček (izolátor croBEE[®] NA16) a (c) izolace s využitím CTAB (tab. II).

DNA byla izolována ze svaloviny makrely obecné bez a s přidavkem přídatných látek běžně používaných při výrobě rybích produktů, konkrétně difosforečnanů (E 450) a barviv (E 110 a E 124), a následně byla vybraná izolační metoda ověřena na komerčních rybích výrobcích. Výběr

Tabulka II
Princip použitých metod izolace DNA^{16,29–32}

Metoda	Princip
Silikátové kolonky (DNeasy [®] mericon Food Kit)	– selektivní sorpce DNA na silikátové částice v prostředí chaotropních solí, – extrakce na pevné fázi, – separace od proteinů, polysacharidů a dalších buněčných zbytků: na kolonku se nevážou a jsou během izolace odstraněny
Magnetické částice (croBEE [®] NA16)	– vazba DNA k povrchově modifikovaným magnetickým částicím, – extrakce na pevné fázi, – separace od proteinů, polysacharidů a buněčných zbytků: využitím magnetické síly
Metoda využívající CTAB	– kationtový surfaktant zajišťující buněčnou lyzi, – komplex CTAB-DNA rozpustný při vysoké koncentraci solí, – organická extrakce (chloroform), – separace od proteinů, lipidů, polysacharidů: extrakcí do chloroformu a následnou centrifugaci

nejvhodnější metody izolace DNA z ryb byl proveden s ohledem na výtěžnost, čistotu, amplifikovatelnost DNA a efektivitu qPCR. Zohledněna byla také cena reakce a pracnost provedení.

3.1. Izolace DNA z rybí svaloviny a sledování vlivu vybraných potravinářských přídatných látek na množství a kvalitu izolované DNA

DNA ze vzorků rybí tkáně byla úspěšně izolována všemi výše uvedenými metodami. Následně byl testován vliv přidavku potravinářských látek na výslednou koncentraci a čistotu DNA. Ze spektrofotometricky stanovených koncentrací vyplývá, že přidavek barviv a fosforečnanů má jen malý vliv na výtěžek izolace (tab. III). Koncentrace naměřené u vzorků s přidavkem potravinářských látek a bez těchto látek se, podle výsledků t-testu, významně lišily (hladina významnosti $\alpha = 0,05$) pouze u izolátu DNA ze vzorku makrely s přidavkem potravinářského barviva v případě izolace pomocí CTAB a přístroje croBEE[®] a makrely s přidavkem fosfátů při použití přístroje croBEE[®]. Poměr absorbancí A při 260 nm ku A při 280 nm se v případě metody využívající CTAB i komerčního kitu DNeasy[®] mericon Food Kit pohyboval u všech testovaných vzorků v rozmezí 1,83–1,87, což odpovídá požadované čistotě izolátu DNA; při použití croBEE[®] byl daný poměr v rozmezí 1,96–2,04. Izolátor croBEE[®] je určený pro rychlou simultánní izolaci nukleových kyselin (DNA i RNA), dosažený poměr absorbancí tak odpovídá i přítomnosti RNA izolované ze vzorku. Napříč metodami ani vzorky nebyl pozorován jednotný trend nárůstu či poklesu koncentrace a /nebo změny čistoty DNA v důsledku přidavku potravinářských látek (tab. III).

Nejlepší výsledky byly dosaženy metodou využívající CTAB, která poskytla nejvyšší výtěžnost (v průměru 1,7krát vyšší koncentrace DNA než ostatní metody) i požadovanou čistotu DNA; izolovaná DNA byla též amplifi-

kovatelná (kapitola 3.3). Naopak automatická izolace přístrojem croBEE[®] poskytovala izoláty s nižší koncentrací DNA a významným zastoupením RNA.

Metody využívající CTAB byly popsány jako vhodný nástroj pro izolaci DNA z rybí svaloviny i v jiných publikacích. Například Masri a spol.¹⁸, kteří porovnávali různé metody izolace DNA ze svaloviny lososa, izolovali metodou využívající CTAB v průměru 60 μg DNA ze 100 mg analyzovaného vzorku, zatímco testované komerční kity poskytly výtěžnost 20–50 μg DNA ze 100 mg vzorku. V práci Debode a spol.¹⁹ týkající se detekce transgenických lososovitých ryb bylo metodou využívající CTAB izolováno až 2,5krát více DNA než komerčním kitem DNeasy[®] mericon Food, což je v souladu s našimi výsledky. Uvedený komerční kit použili ve své práci například také Piskata a spol.²⁰ a Servusová a spol.²¹, kteří úspěšně izolovali DNA ze syrové i tepelně opracované svaloviny tuňáka žlutoploutvého (*Thunnus albacares*). Dosažené výsledky izolace DNA pro syrovou svalovinu byly řádově srovnatelné s našimi (51 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$; $A_{260}/A_{280} = 1,8$). Pro tepelně zpracovanou svalovinu byly publikované výtěžky DNA s využitím kitu DNeasy[®] mericon Food znatelně nižší, a proto byla v naší předkládané studii pro navazující práci zvolena metoda využívající CTAB.

3.2. Izolace DNA z rybích výrobků

Dostatečné množství kvalitní DNA z homogenizované rybí svaloviny bylo v minulosti získáno pomocí různých protokolů^{22–25}. Z rybích výrobků je však izolace DNA v množství a kvalitě potřebné pro navazující DNA analýzy obtížnější. Kvalita i kvantita DNA v rybích výrobcích může být snížena výrobním procesem, zejména tepelným zpracováním, mixováním, ale také vlivem přídatných látek (např. konzervanty, barviva, emulgátory). Proto byl v této práci nejprve sledován vliv vybraných přídatných látek na samotnou izolaci DNA a vyhodnocena

Tabulka III

Porovnání vlivu přidavku potravinářských látek k rybí svalovině na množství a kvalitu izolované DNA. Koncentrace a absorbance DNA izolované ze svaloviny byly měřeny spektrofotometricky

Vzorek	Metoda	Koncentrace [$\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$] \pm SD ^a	A_{260}/A_{280}
Makrela	CTAB	149,4 \pm 0,9	1,88
	DNeasy [®] mericon Food Kit	74,0 \pm 5,6	1,85
	Automatický izolátor croBEE [®]	17,2 \pm 0,2	2,00
Makrela s přidavkem potravinářského barviva	CTAB	108,1 \pm 0,1	1,85
	DNeasy [®] mericon Food Kit	77,1 \pm 2,0	1,85
	Automatický izolátor croBEE [®]	15,8 \pm 0,3	2,04
Makrela s přidavkem fosforečnanů	CTAB	140,4 \pm 2,0	1,85
	DNeasy [®] mericon Food Kit	83,7 \pm 7,4	1,83
	Automatický izolátor croBEE [®]	24,4 \pm 0,1	1,96

^a SD – směrodatná odchylka

Tabulka IV

Ukázka výsledků izolace DNA z komerčních výrobků s použitím metody využívající CTAB

Název produktu	Koncentrace DNA [ng μl^{-1}]	A_{260}/A_{280}
Felix Soup	35,0 \pm 4,0	1,54 \pm 0,13
Losos s bylinkami	600 \pm 500	1,92 \pm 0,10
Losos uzený	1820 \pm 550	2,08 \pm 0,02
Losos ve vlastní šťávě	1121 \pm 72	1,98 \pm 0,01
Losos v tomatové omáčce	930 \pm 290	2,04 \pm 0,01
Lososová pomazánka a	140 \pm 120	2,03 \pm 0,15
Lososová pomazánka b	440 \pm 150	1,97 \pm 0,03
Makrela obecná uzená	80 \pm 40	1,70 \pm 0,10
Makrela ve slaném nálevu	126,7 \pm 9,5	1,71 \pm 0,08
Makrela v oleji	116 \pm 34	1,68 \pm 0,02
Grilované filety z makrely	390 \pm 370	1,74 \pm 0,24
Makrela v oleji a tomatové omáčce	730 \pm 62	1,99 \pm 0,01
Makrela ve vlastní šťávě	172 \pm 60	1,75 \pm 0,14
Pomazánka a la losos s kaviárem	4,1 \pm 2,6	1,81 \pm 0,17
Rizoto s mořskou treskou	39,5 \pm 7,0	2,77 \pm 0,22
Solená treska v oleji Varmuža	24,5 \pm 1,0	1,70 \pm 0,11

efektivita amplifikace pomocí PCR s ohledem na možný zůstatek inhibitorů v izolátu, a až poté byly analyzovány samotné komerční výrobky. Nebyl pozorován statisticky významný vliv testovaných přídatných látek, tyto přídatné látky v rybích výrobcích nebyly důvodem nižších výtěžků izolované DNA (tab. IV).

V tabulce IV jsou uvedeny výsledky úspěšné izolace z 15 komerčních výrobků; ze vzorku „Pomazánka a la losos s kaviárem“ bylo získáno pouze malé množství DNA, avšak čistota izolátu byla vysoká. Izolovanou DNA se tak podařilo amplifikovat s primery R u všech typů výrobků. Do reakce bylo přidáváno 50 ng DNA, díky čemuž mohlo dojít k dostatečnému naředění případných inhibitorů reakce v izolátu. Výjimkou byla jmenovaná pomazánka, u níž nebylo možné takto velké množství DNA do reakce přidat. V tomto případě tak bylo do reakční směsi přidáno pouze 5 μl neředěného izolátu DNA.

3.3. Ověření kvality DNA s využitím qPCR v reálném čase s fluorescenční detekcí

Amplifikace DNA proběhla úspěšně ve všech analyzovaných vzorcích ryb a rybích výrobků s využitím primerů R; primery M poskytly dle očekávání pozitivní výsledky pouze pro vzorky obsahující DNA makrely obecné. Při přidavku neředěné DNA do reakce poskytly nejnižší hodnoty prahových cyklů (Ct) izoláty získané kitem DNeasy[®] mericon Food, ačkoliv nejvyšší koncentraci a čistotu vykazovaly podle spektrofotometrických dat izoláty DNA získané metodou využívající CTAB. Stejný trend byl pozorován i při přidavku jednotného množství DNA do reakce, tedy po zředění izolátů a tak i možných inhibitorů

(tab. V). Z výše uvedeného lze usuzovat, že komerční kit by mohl být vhodnější v případě, kdy je potřeba odstranit více inhibitorů ze vzorku. Přítomnost možných inhibitorů v izolátu byla dále testována analýzou desetkrát zředěných vzorků, kdy bylo očekáváno, že při 100% účinnosti amplifikace bude ΔCt mezi dvěma ředěními rovno přibližně 3,3. V případě metody využívající CTAB bylo za použití primerů M pro amplifikaci ΔCt rovno 2,4 pro samotnou svalovinu, zatímco u komerčního kitu byl rozdíl roven 3,0. O něco lepších výsledků bylo dosaženo s primery R, kdy v případě metody využívající CTAB bylo ΔCt 2,9; pro komerční kit 3,1. Je tak patrné, že je při použití metody využívající CTAB potřeba dbát na pečlivé odstranění látek, které mohou mít vliv na průběh amplifikace.

U izolátů DNA získaných izolátorem croBEE[®] bylo možné pozorovat významně nižší hodnoty Ct (primery M) pro vzorky svaloviny s přidavkem fosforečnanů v porovnání s ostatními vzorky izolovanými touto metodou; u ostatních metod tento pokles zaznamenaný nebyl nebo byl zanedbatelný. Vzorky s přidavkem barviv poskytovaly o něco vyšší Ct u všech testovaných metod a při amplifikaci oběma sadami primerů.

Efektivita qPCR byla testována pomocí DNA izolované ze svaloviny makrely ředěné v NFW, ukázka amplifikačních křivek je uvedena na obr. 2, výsledky jsou shrnuté v tab. VI. Amplifikace proběhla ve všech vzorcích s přidanou DNA (100–0,098 ng v reakci). Všechny naměřené kalibrační přímky splňovaly požadovaná kritéria na směrnici (–3,6 až –3,1) a efektivitu (90–110 %). Vliv přídatných látek na efektivitu PCR tak nebyl prokázán (obr. 2). Požadavek na koeficient determinace R^2 ($\geq 0,98$) nebyl splněn pouze v případě DNA vzorku makrely

Tabulka V

Rozdíly hodnot prahových cyklů (Ct) v důsledku přidavku přídatných látek k svalovině makrelly obecné a/nebo vlivem izolační metody DNA

Metoda	Vzorek ^a	Množství ^b DNA v reakci [ng]	C _T ± SD	
			Primery M	Primery R
CTAB	M	100	25,74 ± 0,13	24,40 ± 0,11
	MB		26,35 ± 0,10	25,69 ± 0,49
	MF		25,75 ± 0,11	25,04 ± 0,05
DNeasy [®] mericon Food Kit	M	100	23,99 ± 0,05	23,08 ± 0,15
	MB		24,21 ± 0,12	23,30 ± 0,11
	MF		23,68 ± 0,14	23,00 ± 0,14
Automatický izolátor croBEE [®]	M	50	27,35 ± 0,13	netestováno
	MB		28,39 ± 0,21	
	MF		25,97 ± 0,17	

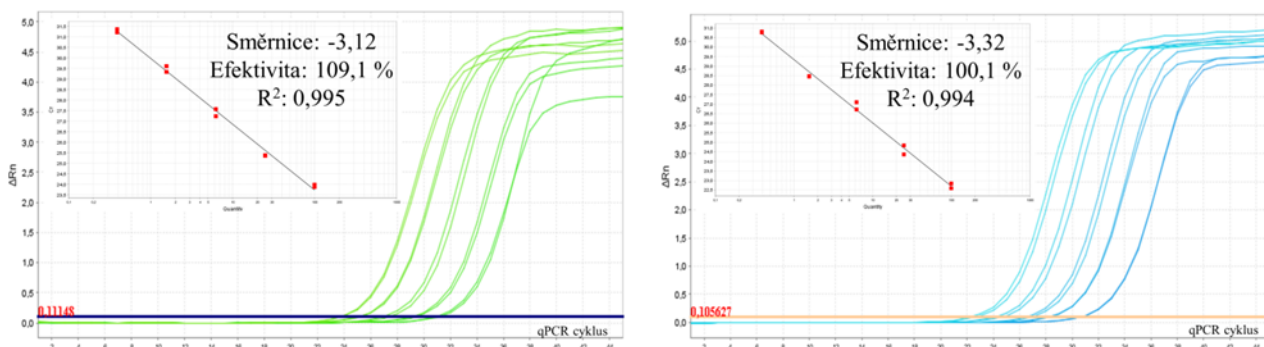
^a M – makrela obecná, MB – makrela obecná s přidavkem barviva, MF – makrela obecná s přidavkem fosforečnanů,

^b spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

s přidavkem fosforečnanů izolované přístrojem croBEE[®], kde bylo dosaženo hodnoty 0,96. Dynamický rozsah pro kvantifikaci DNA byl při použití primerů R stanoven na 0,4–100 ng DNA v reakci v případě všech izolátů získaných metodou využívající CTAB a izolátů makrelly s přidavky přídatných látek izolovaných kitem DNeasy[®] mericon Food. Pro izoláty ze samotné makrelly byl dynamický rozsah v případě kitu 0,1–100 ng. V případě izolátoru croBEE[®] bylo dosaženo nižších výtěžků DNA, a proto byl testovaný rozsah nižší (tab. VI). Pro makrelu samotnou a s přidavky fosforečnanů byl dynamický rozsah stanoven na 0,4–25 ng, a pro makrelu s přidavkem barviv na 1,6–25 ng DNA v reakci. Při použití primerů pro makrelu bylo možné kvantifikovat DNA v nejvyšším dynamickém rozsahu při použití DNA izolované komerčním kitem DNeasy[®] mericon Food (0,1–100 ng pro čistou svalovinu;

0,4–100 při přidavku přídatných látek). Srovnatelný rozsah poskytla pouze DNA makrelly s přidavkem fosforečnanů izolovaná metodou využívající CTAB.

Metodu využívající CTAB ve své práci použili také Abdullah a Rehbein²⁶. Pro rozlišení výrobků z tuňáka (čeleď Scombridae) využili shodný úsek parvalbuminového genu jako v předkládané práci (primery R). Získané amplicony o délce cca 600 bp úspěšně sekvenovali, což dokazuje vhodnost metody využívající CTAB pro následné analýzy DNA. Izolace DNA metodou využívající CTAB s následnou amplifikací části parvalbuminového genu byla úspěšně použita také pro identifikaci DNA mořana tmavého (*Spondyliosoma cantharus*)²⁷. Laknerová a spol.²⁷ uvádějí, že kvalita i kvantita izolované DNA metodou využívající CTAB byla srovnatelná s DNA získanou komerčními kity na bázi silikátových centrifugačních kolonek.



Obr. 2. Příklad amplifikačních křivek a kalibračních přímek qPCR. Vlevo: qPCR s M primery, DNA izolovaná s využitím CTAB ze svaloviny makrelly obecné s přidavkem fosforečnanů, vpravo: qPCR s R primery, DNA izolovaná kitem DNeasy[®] mericon Food ze svaloviny makrelly obecné s přidavkem barviv

Tabulka VI
Porovnání sledovaných parametrů kalibračních křivek qPCR

Metoda	Vzorek ^a	qPCR s primery M					qPCR s primery R				
		Směrnice kalibrační s osou Y přímkou	Průsečík s osou Y	R ²	Efektivita [%]	Dynamický rozsah kvantifikace	Směrnice kalibrační s osou Y přímkou	Průsečík s osou Y	R ²	Efektivita [%]	Dynamický rozsah kvantifikace
CTAB	M	-3,49	31,2	0,971	93,4	1,6–100 ng	-3,27	33,5	0,999	102,2	0,4–100 ng
	MB	-3,33	30,9	1,000	99,6	1,6–25 ng	-3,25	34,2	0,997	103,1	0,4–100 ng
	MF	-3,12	30,0	0,995	109,1	0,4–100 ng	-3,57	32,6	0,991	90,5	0,4–100 ng
DNeasy [®] mericon Food Kit	M	-3,11	27,7	0,997	109,5	0,1–100 ng	-3,49	29,7	0,993	93,4	0,1–100 ng
	MB	-3,15	27,7	0,993	107,6	0,4–100 ng	-3,32	29,3	0,994	100,1	0,4–100 ng
	MF	-3,16	27,9	0,995	107,4	0,4–100 ng	-3,38	29,6	0,993	97,6	0,4–100 ng
Automatický izolátor croBEE [®]	M	-3,13	30,3	0,996	108,5	1,6–25 ng	-3,44	34,6	0,978	95,3	0,4–25 ng
	MB	-3,34	31,0	0,969	99,4	6,3–25 ng	-3,29	34,2	0,998	101,5	1,6–25 ng
	MF	-3,31	30,2	0,997	100,4	1,6–25 ng	-3,43	34,0	0,964	95,6	0,4–25 ng

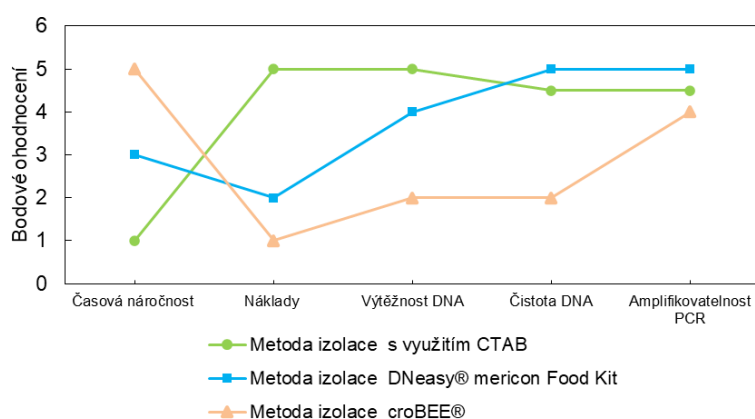
^a M – makrela obecná, MB – makrela obecná s přidavkem barviva, MF – makrela obecná s přidavkem fosforečanů

Ve studii Piskata a spol.²⁰ byla testována amplifikovatelnost DNA z rybí svaloviny získané komerčním kitem DNeasy[®] mericon Food Kit a také kitem využívajícím magnetické částice Chemagic DNA Tissue 10 Kit. Primery v této práci byly navrženy na část mitochondriálního genu cytochrom-*c*-oxidasa I. DNA získaná oběma kity byla amplifikovatelná. V práci Servusová a spol.²¹, kde byly porovnávány dva komerční kity (DNeasy[®] mericon Food Kit a DNeasy[®] Blood & Tissue Kit) bylo prokázáno, že DNeasy[®] mericon Food Kit je vhodnější pro PCR analýzu ryb. Z výsledků experimentů bylo zřejmé, že amplifikace proběhla lépe ve vzorcích izolovaných tímto kitem, přestože koncentrace změřená spektrofotometricky byla nižší než u druhého kitu; DNeasy[®] mericon Food Kit tak byl označen jako lepší pro izolace DNA z konzervovaných rybích výrobků. Obdobný trend byl pozorován i v naší práci, kdy zmíněný kit poskytoval dle spektrofotometrických dat horší výtěžky než metoda využívající CTAB, ale při amplifikaci pomocí PCR se prokázala lepší kvalita DNA.

Nejvhodnější testovaná metoda izolace byla v této práci vyhodnocena na základě sledování několika parametrů – časové náročnosti, nákladů na 1 reakci, výtěžnosti a čistoty DNA stanovených spektrofotometricky a efektivitu PCR. Všechny testovanými metodami byla izolována DNA v dostatečném množství a kvalitě pro analýzu pomocí PCR s využitím primerů navrženými na oblast jaderného genu pro parvalbumin. Efektivita PCR byla pro všechny metody v optimálním rozmezí, a proto neměla na výběr metody vliv. Vyhodnocením stanovených parametrů se jako nejlepší metoda izolace DNA ze svaloviny makrely obecné (*Scomber scombrus*) ukázala metoda využívající CTAB. Téměř stejné výsledky byly získány také komerčním kitem DNeasy[®] mericon Food Kit, avšak pro jeho vyšší cenu a riziko ucpání kolonek při izolaci DNA z vybraných komerčních výrobků nebyl nakonec preferován. Nejméně vhodná metoda byla automatická izolace přístrojem croBEE[®] NA16 Nucleic Acid Extraction System Plus (obr. 3).

4. Závěr

Identifikace rybích druhů v potravinářských výrobcích je klíčová z hlediska prevence falšování i detekce alergenů. Kvalita izolované DNA však může ovlivnit výsledky analýz. V této studii byly porovnány tři přístupy izolace DNA ze svaloviny makrely obecné bez a s přidavkem potravinářských látek. Vybraná metodika pak byla použita pro izolaci DNA z komerčních rybích výrobků i dalších druhů živočichů. Nejlepší výtěžky DNA poskytla metoda využívající k lyzi i přečištění DNA kationtový detergent CTAB. Tato izolační metoda je cenově dostupná a jednoduchá, ale pro získání čistého izolátu je třeba dbát na pečlivé odstranění organických rozpouštědel v jednotlivých fázích protokolu. Proto se zdá náročnější na provedení než komerční soupravy. Při srovnání výsledků izolace nebyl zaznamenán významný vliv



Obr. 3. Porovnání metod izolace DNA dle vybraných parametrů. Metody byly hodnoceny body v rozmezí 1–5 b., kde 5 b. značí nejlepší metodu. Výtěžnost a čistota DNA byly hodnoceny na základě výsledků spektrofotometrického měření. Jako čistá DNA byla považována taková, která měla poměr $A_{260}/A_{280} = 1,8$. Amplifikovatelnost DNA byla ohodnocena na základě dosaženého Ct a efektivity PCR

přidavku fosfátů nebo barviv na průběh izolace DNA; izoláty získané všemi testovanými metodami byly úspěšně amplifikovány pomocí qPCR. Komerční kit DNeasy® mericon Food by mohl být vhodnější v případě, kdy je potřeba odstranit více inhibitorů ze vzorku.

Práce byla finančně podpořena Ministerstvem zemědělství (grant číslo QK1910231) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (projekt METROFOOD-CZ, č. LM2023064).

Použité zkratky

CTAB	cetyltrimethylamonium-bromid (<i>N,N,N</i> -trimethylhexadekan-1-aminium-bromid)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGTA	kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová
NFW	voda zbavená nukleas
NK	nukleové kyseliny
PCR	polymerasová řetězová reakce
qPCR	PCR v reálném čase s fluorescenční detekcí
SDS	dodecylsírán sodný

LITERATURA

- Sotelo C. G., Pérez-Martín R. I., v knize: *Fish and Seafood Authentication*, Vol. 952, kap. 8, str. 126. ACS Publications, 2007. doi: 10.1021/bk-2007-0952.ch008
- Čížková H., Ševčík R., Rajchl A., Pivoňka J., Voldřich M.: *Chem. Listy* 106, 903 (2012).
- OECD/FAO (2021): *OECD-FAO Agricultural Outlook 2021–2030*, FAO, Rome/OECD Publishing, Paris 2021.
- FAO: *The state of world fisheries and aquaculture (SOFIA)*. FAO, Rome 2020.
- Cermakova E., Lencova S., Mukherjee S., Horka P., Vobruba S., Demnerova K., Zdenkova K.: *Foods* 12, 228 (2023).
- Sovová T., Křížová B., Hodek J., Ovesná J.: *J. Sci. Food Agric.* 96, 997 (2016).
- Schrader C., Schielke A., Ellerbroek L., Johne R.: *J. Appl. Microbiol.* 113, 1014 (2012).
- Sidstedt M., Rådström P., Hedman J.: *Anal. Bioanal. Chem.* 412, 2009 (2020).
- Sovová T., Křížová B., Drábková L., Ovesná J.: *Czech J. Food Sci.* 35, 160 (2017).
- EUR-Lex. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 ze dne 16. prosince 2008 o potravinářských přídatných látkách. Úřední věstník Evropské unie 7 (2008).
- FÉR Potravina: <https://www.ferpotravina.cz/ecka>, staženo 29. 10. 2023.
- Froese R., Pauly D.: <https://www.fishbase.se/summary/118>, staženo 29. 10. 2023.
- Catanese G., Machado M., Infante C.: *Gene* 452, 35 (2010).
- Sun S., Wang S., Lin R., Cheng S., Yuan B., Wang Z., Tan M.: *Foods* 9, 364 (2020).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. European Price Report – January 2023. <https://www.fao.org/3/cc3261en/cc3261en.pdf>, staženo 29. 10. 2023.
- EN ISO. 21571: 2005. *Foodstuffs: Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products-Nucleic acid extraction*, 43 (2013).
- Hougs L., Gatto F., Goerlich O., Grohmann L., Lieske K., Mazzara M., Narendja F., Ovesna J., Papazova N., Scholtens I.: *Testing and Analysis of GMO-containing Foods and Feed*. Publications Office of the European Union, Lucemburk 2017.
- Masri S., Rast H., Ripley T., James D., Green M., Jia X.,

- Devlin R. H.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 3161 (2002).
19. Debode F., Janssen E., Marien A., Devlin R. H., Lieske K., Mankertz J., Berben G.: *Food Anal. Methods* 11, 2396 (2018).
 20. Piskata Z., Pospisilova E., Borilova G.: *Int. J. Food Prop.* 20, S430 (2017).
 21. Servusová E., Babak V., Piskata Z., Krčmář P.: *Acta Vet. Brno* 88, 315 (2019).
 22. Mukherjee S., Hanak P., Jilkova D., Musilova Z., Horka P., Lerch Z., Zdenkova K., Cermakova E.: *J. Food Compos. Anal.* 115, 104992 (2023).
 23. Chowdhury M. M., Rahman A., Nahar L., Rahman M., Al Reza H., Ahmed M. S.: *IOSR J. Pharm. Biol. Sci.* 11, 11 (2016).
 24. Taggart J., Hynes R., Prodóuhl P., Ferguson A.: *J. Fish Biol.* 40, 963 (1992).
 25. Akhatova D., Laknerova I., Zdenkova K., Ólafsdottir G., Magnúsdó S., Píknova E., Kyrova V., Lerch Z., Hanak P.: *J. Food Nutr. Res.* 57, 27 (2018).
 26. Abdullah A., Rehbein H.: *J. Sci. Food Agric.* 96, 456 (2016).
 27. Laknerová I., Zdeňková K., Purkrťová S., Píknová E., Vyroubalová Š., Hanák P.: *J. Food Qual.* 37, 429 (2014).
 28. Rehbein H.: *Dtsch. Lebensmitt. Rundsch.* 101, 333 (2005).
 29. Karp A., Isaac P. G., Ingram D. S., v knize: *Molecular Tools for Screening Biodiversity: Plants and Animals*, str. 59. Springer, Londýn 1998.
 30. Tan S. C., Yiap B. C.: *Biomed Res. Int.* 2009, 574398 (2009).
 31. Emaus M. N., Varona M., Eitzmann D. R., Hsieh S.-A., Zeger V. R., Anderson J. L.: *TrAC, Trends Anal. Chem.* 130, 115985 (2020).
 32. Brown R. B., Audet J.: *J. R. Soc. Interface* 5, S131 (2008).

E. Čermáková^{a,b}, K. Kodešová^b, P. Horká^c, K. Demnerová^b, and K. Zdeňková^b (^a*Food Research Institute Prague*, ^b*Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology, Prague*, ^c*Institute for Environmental Studies, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic*): **Testing of the Effect of Food Additives on the DNA Isolation from Mackerel and Fish Products**

Authentication of fish products by DNA analysis requires the extraction of high quality DNA without the presence of inhibitors. Many nucleic acid isolation methods are currently available; silicate centrifugal columns have become very popular due to their speed and ease of extraction. However, their disadvantage may be the principle based on DNA charge, which may be affected by food composition, or clogging due to a poor sample pretreatment. The aim of this work was to compare three DNA isolation methods using different principles (silicate centrifugal columns, modified magnetic beads, Cetrimonium bromide and chloroform extraction) and to evaluate their suitability for DNA isolation from fish muscle. The criteria assessed were the recovery, purity and amplifiability of the isolated DNA. Mackerel tissue was analysed without and with the addition of additives commonly used in the manufacture of fish products, namely diphosphates (E 450) and colorants (E 110 and E 124), and the selected method was subsequently applied to commercial fish products. The modified method using the detergent CTAB proved to be the most suitable.

Keywords: amplification, DNA analysis, DNA isolation, fish products, food authentication, inhibition, PCR

Acknowledgements

This work was supported by the grant No. QK1910231 from the Ministry of Agriculture and by METROFOOD-CZ project MEYS Grant No. LM2023064.



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.