

DEBRECENI EGYETEM
Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar
ÁLLATTENYÉSZTÉSI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Doktori Iskola vezető:

DR. KOVÁCS ANDRÁS
egyetemi tanár, az MTA doktora

TÉMAVEZETŐ:

Dr. Czeglédi Levente Ph.D.

**FAJAZONOSÍTÁS ÉLELMISZEREKBŐL PCR SSCP METODIKA
FEJLESZTÉSÉVEL**

Készítette:

CSIKÓS ÁDÁM
doktorjelölt

Debrecen

2015.

FAJAZONOSÍTÁS ÉLELMISZEREKBŐL PCR SSCP METODIKA FEJLESZTÉSÉVEL

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében az állattenyésztési tudományok tudományágban

Írta: CSIKÓS ÁDÁM okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola
(Kérődzők – Állatitermék-előállítás Doktori Programja) keretében

Témavezetők: Dr. Czeglédi Levente Ph.D.

A doktori szigorlati bizottság:

Elnök: Dr. Kovács András D.Sc.
Tagok: Dr. Zsolnai Attila Ph.D.
Dr. Várszegi Zsófia Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2015. november 26.

Az értekezés bírálói:

név	fokozat	aláírás
Dr. Pecsénye Katalin	PhD	
Dr. Zsolnai Attila	PhD	

A bírálóbizottság:

név	fokozat	aláírás
elnök:		
tagok:		
titkár:		

Az értekezés védésének időpontja: 2016

TARTALOMJEGYZÉK

VEGYSZEREK JEGYZÉKE	6
1. BEVEZETÉS.....	7
2. CÉLKITŰZÉS	9
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	10
3.1 <i>Simplex PCR</i>	11
3.2 <i>Duplex PCR</i>	12
3.3 <i>Multiplex PCR</i>	13
3.4 <i>PCR reakciók univerzális primerekkel</i>	13
3.5 <i>PCR-rel kapcsolt technikák</i>	14
3.5.1 PCR-restríciós fragmenthossz polimorfizmus (PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)	15
3.5.2 PCR-egyszálú DNS konformáció polimorfizmus (PCR-single strand conformation polymorphism, PCR-SSCP).....	16
3.5.3 PCR-hőmérséklet grádiens gélelektroforézis (PCR-temperature gradient gelelectrophoresis, PCR-TGGE)	18
3.5.4 PCR-időben változó hőmérsékletű gélelektroforézis (PCR-temporal temperature gelelectrophoresis, PCR-TTGE).....	19
3.5.5 PCR-denaturáló grádiens gélelektroforézis (PCR-denaturing gradient gelelectrophoresis, PCR-DGGE)	19
3.5.6 PCR-random amplifikált polimorf DNS (PCR-random amplified polymorphic DNA, PCR-RAPD)	20
3.5.7 PCR-amplifikált fragmenthossz polimorfizmus (PCR-amplified fragment length polymorphism, PCR-AFLP)	21
3.6 <i>DNS szekvenálás</i>	22
3.7 <i>Kvantitatív real-time PCR (QPCR)</i>	23
3.7.1 QPCR reakció kiértékelése	26
3.8 <i>Gélelektroforézis</i>	27
3.8.1 Poliakrilamid gélelektroforézis	28
3.8.2 Agaróz gélelektroforézis	29
3.8.3 Mobilitást befolyásoló tényezők	29
3.9 <i>Kapilláris elektroforézis</i>	31
3.10 <i>Primertervezés a fajazonosítási vizsgálatok során</i>	32
3.11 <i>Nem PCR alapú módszerek az élelmiszerekből történő fajazonosításban</i>	34
4. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	36

4.1.	<i>Általánosan alkalmazott módszerek</i>	36
4.1.1.	Bioinformatikai eszközök alkalmazása PCR primerek tervezése során ..	36
4.1.2.	DNS izolálás módszerei.....	38
4.1.3.	DNS izolátumok minőségi és mennyiségi ellenőrzése.....	39
4.1.4.	PCR reakciók általános lépései.....	39
4.1.5.	Agaróz gélelektroforézis.....	40
4.1.6.	PCR-SSCP módszer általános lépései	41
4.1.7.	Kapilláris elektroforézis.....	42
4.2	<i>A tej és tejtermékek vizsgálatának specifikus módszertana</i>	43
4.2.1	Minták.....	43
4.2.2	DNS izolálás specifikumai.....	43
4.2.3	Alkalmazott primerek	44
4.2.4	Alkalmazott PCR reakciók specifikumai.....	44
4.2.5	Duplex-PCR reakció juh-szarvasmarha DNS keverékek esetében – kvantitatív kimutatási lehetőségek vizsgálata.....	46
4.2.6	Comet-assay – Üstökös gélelektroforézis.....	48
4.3	<i>Hús és hústermékek vizsgálatának specifikus módszertana</i>	50
4.3.1	Minták.....	50
4.3.2	DNS izolálás	50
4.3.3	Alkalmazott primerek	50
4.3.4	Alkalmazott PCR reakciók specifikumai.....	51
4.3.5	Sertés eredetű hús, máj és zsír kimutatása marhahúsban CE-SSCP módszerrel.....	51
4.4	<i>Halfajok vizsgálatának specifikus módszertana</i>	52
4.4.1	Minták.....	52
4.4.2	DNS izolálás	53
4.4.3	Alkalmazott primerek	53
4.4.4	Alkalmazott PCR reakciók specifikumai.....	53
4.4.5	PCR reakciók univerzális primerek felhasználásával – Csoportosított kimutatás.....	54
4.4.6	Ponty DNS jelenlétének kimutatása bomlásnak indult halhúsból, illetve légylárvából	55
4.4.7	Halfajok azonosítása kapilláris elektroforézis – egyszálú DNS konformáció polimorfizmus módszerrel (CE-SSCP)	56
5	EREDMÉNYEK	57
5.1	<i>Tej és tejtermékének vizsgálata PCR-SSCP módszerrel</i>	57
5.1.1	Hőmérséklet gradiens PCR reakciók agaróz gélelektroforetikus eredményei.....	57

5.1.2	PCR-SSCP vizsgálatok poliakrilamid gélelektroforetikus eredményei....	61
5.2	<i>Duplex-PCR reakció juh-szarvasmarha DNS keverékek esetében – kvantitatív kimutatási lehetőségek vizsgálata</i>	68
5.3	<i>Üstökös gélelektroforézis</i>	70
5.4	<i>Hús és hústermékek vizsgálata PCR SSCP metodika alkalmazásával</i>	75
5.5	<i>Sertés eredetű hús, máj és zsír kimutatása marhahúsban CE-SSCP módszerrel</i> 80	
5.6	<i>Halfajok azonosítása és elkülönítése PCR SSCP metodika alkalmazásával ...</i>	83
5.7	<i>Ponty DNS jelenlétének kimutatása bomlásnak indult mintából, illetve légylárvából</i>	88
6.	KÖVETKEZTETÉSEK	90
7.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	94
8.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK GYAKORLATI HASZNOSÍTHATÓSÁGA	96
9.	ÖSSZEFOGLALÁS	97
10.	SUMMARY	100
	IRODALOMJEGYZÉK	103
	PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK	123
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	126

VEGYSZEREK JEGYZÉKE

agaróz (Lonza)	nátrium-borohidrát (Sigma)
akrilamid/bisz-akrilamid (Sigma)	nátrium-hidroxid (VWR)
ammónium-perszulfát (Sigma)	nátrium-karbonát (Sigma)
brómfenol kék (Sigma)	nátrium-klorid (Sigma)
dNTP (Fermentas)	PBS puffer (BioSciences)
Dream Taq polimeráz (Fermentas)	Pluronic F108 polimer (Sigma)
Dream Taq puffer (Fermentas)	Proteináz K (Sigma)
ecetsav (Sigma)	SDS (VWR)
EDTA (Scharlau)	TAE puffer (Lonza)
etanol (VWR)	TBE puffer (Sigma)
etidium-bromid (Invitrogen)	TE puffer
extrakciós puffer	tetrametil-etiléndiamin (BioRad)
ezüst-nitrát (Sigma)	Tris-HCl (VWR)
FAM-jelölt forward (Life Technologies)	Tween20 (Spektrum 3D)
fenol (Sigma)	vérmosó oldat
flyékony nitrogén	VIC-jelölt reverse (Life Technologies)
formaldehid (Sigma)	
formamid (Sigma)	
GelRed (Biotium)	
Genomic Mini Kit (Geneaid Biotech)	
GeneticAnalyzer puffer (Life Technologies)	
HiDi formamid (Life Technologies)	
izopropanol (Merck)	
kálium-klorid (Scharlau)	
kloroform-izoamil-alkohol (Sigma)	
lízis puffer	
LIZ™ (Life Biotechnologies)	
LMPA (Lonza)	
MgCl ² (Fermentas)	

1. BEVEZETÉS

Az elmúlt években bekövetkezett élelmiszerhamisítási botrányok nem csak a problémával már eddig is foglalkozó kutatói társadalom, de a fogyasztók figyelmét is ráirányították egy igen jelentős, az élelmiszerbiztonságot veszélyeztető problémára. Nevezetesen arra a gyakorlatra, hogy egyes termelők a nagyobb haszon reményében alacsonyabb költségű összetevőket használnak fel termékeik előállításához, azonban az adott terméket ilyen esetben félrevezető címkézéssel látják el, ami magasabb költségű összetevőket jelez a vásárló számára, így magasabb összeget fizet ki egy olyan termékért, ami valójában a jelzett összetevőt vagy sokkal kisebb arányban, vagy akár szélsőséges esetben egyáltalán nem tartalmazza. Jó példa erre, amikor a tapasztalatlan fogyasztónak könnyűszerrel tudnak eladni sertéshúst, holott valójában borjúhúst szeretett volna vásárolni. Itt vetődnek fel olyan vonatkozásai is az élelmiszerhamisításoknak, amelyek már nem tisztán gazdasági kérdéssé teszik a problémát, hanem egészségügyi vagy bizonyos esetekben vallási aggályokat is felvetnek. Egészségügyi szempontból gondolnunk kell arra, hogy egyes személyek esetében a termék címkézésén fel nem tüntetett összetevők akár súlyos allergiás reakciót is kiválthatnak, vagy a vallási szempontot figyelembe véve tudhatjuk, hogy bizonyos vallási csoportokhoz tartozó emberek nem fogyaszthatnak meghatározott élelmiszereket.

A fentebb felvázolt probléma a kutatókat analitikai módszerek számos változatának fejlesztésére sarkallta. Ezeknek a módszereknek a fejlesztése folyamatosan zajlik annak reményében, hogy minél érzékenyebb, ugyanakkor minél szélesebb körben alkalmazható és költséghatékony metodikák álljanak rendelkezésre az élelmiszerhamisítások kiszűrésére. Az állati eredetű élelmiszerek vizsgálatára alkalmazott analitikai és molekuláris biológiai módszereket a kimutatandó anyag típusa alapján három nagyobb csoportra lehet felosztani: zsírsavösszetétel alapján történő kimutatás, fehérje- és DNS-alapú technikák. A felsorolt három nagy csoport közül a fehérje- és DNS-alapú metodikák terjedtek el szélesebb körben. A fehérje alapú módszerek közül is külön érdemes kiemelni az immunológiai, kromatográfias és elektroforetikus eljárásokat, amelyek rendkívül pontos kimutatást tesznek lehetővé, azonban a vizsgálati költségek viszonylag magasnak mondhatóak.

A legújabb keletű kutatási területet képviselik a DNS-alapú módszerek (Plath és mtsai., 1997). A legtöbb a DNS vizsgálatán alapuló módszer a polimeráz láncreakcióra (PCR, polymerase chain reaction) épül (Mullis és Faloona, 1987). A PCR reakció nagy előnye, hogy kombinálható bizonyos molekuláris genetikai metodikákkal – jelen esetben ez az egyszálú DNS konformáció polimorfizmus – így még specifikusabbá lehet tenni egy adott faj adott génjének a vizsgálatát, ezen keresztül pedig az élelmiszerekből történő fajazonosítás eredményessége növelhető. Jelen esetben az élelmiszerekből történő fajazonosítás lehetőségeinek vizsgálatát kereskedelmi forgalomból származó sajtok, hústermékek és haltestek felhasználásával tervezzük végrehajtani, emellett párhuzamosan a kvantitatív kimutatás lehetőségeit is tesztelni szeretnénk, illetve az érlelésnek alávetett termékek esetében a DNS degradáltsági fokáról szeretnénk képet kapni.

2. CÉLKITŰZÉS

Munkám során célul tűztem ki PCR-egyszálú DNS konformáció polimorfizmus módszer fejlesztését élelmiszerekből történő fajazonosítás során. A tervezett munka kapcsán az alábbi rész-célkitűzéseket tettem:

- tejkeverékek esetében a módszer érzékenységének vizsgálata, valamint sajtermékekből történő fajazonosítás a módszer alkalmazhatóságának tesztelésére PCR-SSCP módszerrel,
- húskeverékek esetében a módszer érzékenységének vizsgálata, valamint hústermékekből történő fajazonosítás a módszer alkalmazhatóságának tesztelésére PCR-SSCP módszerrel,
- magyarországi édesvizekből származó halfajok elkülönítési lehetőségei PCR-SSCP és kapilláris elektroforézis módszerrel,
- juh és szarvasmarha fajok esetében a kvantitatív elemzés lehetőségeinek vizsgálata, valamint a kvantitatív kimutatás alkalmazhatóságának vizsgálata kereskedelmi forgalomból származó termékeken.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Mivel az elmúlt, megközelítőleg két évtizedben kiemelkedő fontosságúvá vált az élelmiszerbiztonság fenntartása és annak monitorozása, különös tekintettel az élelmiszerhamisítások kiszűrésére, a szakemberek számos metodikát dolgoztak ki az élelmiszerekből történő fajazonosítás kivitelezésére. Számos esetben történt már olyan eset, ami különösen felkeltette a fogyasztói réteg figyelmét. Itt elsősorban a nagymértékű élelmiszerhamisításokra kell gondolni, melyek során egy teljes régió, ország, egyes esetekben több ország is érintetté válik. Az egyik leginkább ismert élelmiszerhamisítási botrány a Nagy-Britanniából 2013 februárjában kiinduló lóhús botrány volt, aminek kezdetén 100 kg mennyiségű lóhúst találtak marhahúst feldolgozó üzemben, és a további vizsgálatok azt is megállapították, hogy az Európai Unió számos országába jutott a hamisított termékekből. Az élelmiszerhamisítás többféle módon is történhet, legtöbb esetben szándékosan átcímkezik az egyes termékeket, de vannak olyan esetek, amikor nem engedélyezett színezékekkel érik el, hogy az adott hús hasonlítson az eladni kívánt termékre. Erre példa az a gyakorlat, ami során karotinoidos táppal etetett pisztrángot lazacként forgalmazznak. Élelmiszerhamisításnak számít az eredetvédett termékek helyettesítése alacsonyabb előállítási költségű és más eredettel rendelkező termékekkel is. A fentebb említett példákon túl a figyelem fokozódását a szigorodó kormányzati szabályozások is elősegítették (Bottero és mtsai., 2003). A kimutatandó anyag természete alapján három nagyobb metodikai csoport különíthető el: zsírsavösszetétel szerinti elválasztási technikák, fehérje- és DNS-alapú kimutatási módszerek. A zsírsavösszetétel kimutatására alkalmazott módszerek hátránya, hogy nem minden esetben vezetnek teljességgel megbízható eredményre, ilyen eset a sovány tejből vagy tejporból készülő termékeknél fordulhat elő. Ezért sokkal inkább megbízható technikák a fehérje- és DNS-alapú eljárások. A fehérjék kimutatásán alapuló metodikák közé sorolhatjuk az immunológiai (Anguita és mtsai., 1996; Richter és mtsai., 1997), elektroforetikus (Amigo és mtsai., 1992) és kromatográfiás eljárásokat (Haza és mtsai., 1995). Az immunológiai módszerek közül az enzim-kapcsolt immunoszorbens assay (ELISA) terjedt el leginkább egyszerű alkalmazhatósága és automatizálhatósága miatt (Giovanacci és mtsai., 2004). Elektroforetikus technikák közül elterjedten alkalmazzák az egy dimenziós-poliakrilamid gélelektroforézist (1D-PAGE), az izoelektromos fókuszálást (IEF) (Amigo és mtsai., 1992; Commission Regulation, 1996). A kromatográfiás módszerek sorából a legnagyobb teret a nagy

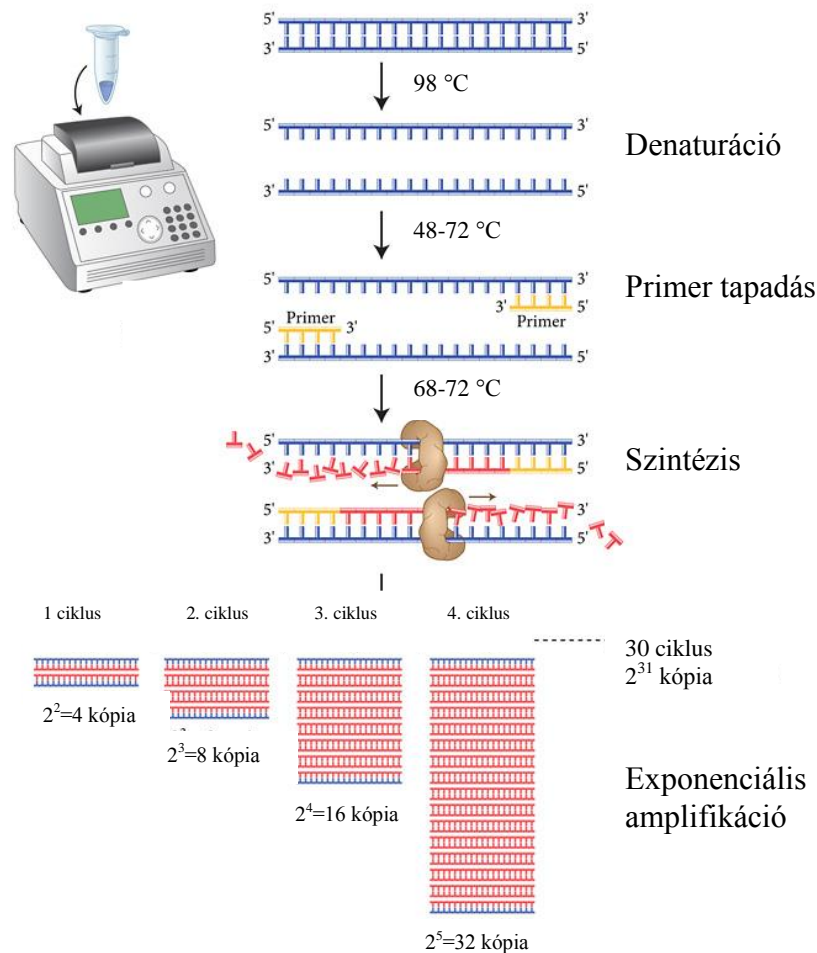
nyomású folyadékkromatográfia (HPLC) kapta a fajazonosítási vizsgálatokban (Mayer és mtsai., 1997).

A fehérje-alapú kimutatási módszerek sokkal szélesebb körben alkalmazhatóak, mint a zsírsavösszetétel kimutatására alkalmazott eljárások, valamint igen kis arányú jelenlét mellett is képesek az adott élelmiszerben jelenlévő, de oda nem illő állati eredetű összetevő kimutatására. Ugyanakkor ezek a módszerek jelentős műszer- és költségigénnyel bírnak.

A polimeráz láncreakció (*polymerase chain reaction, PCR*) tette lehetővé azt, hogy rendkívül kis mennyiségű DNS mintából a megfelelő körülmények biztosítása mellett exponenciálisan megnöveljük az általunk vizsgálni kívánt DNS szakasz mennyiségét. Egyben ez a módszer alapozta számos további módszer kialakulásának a lehetőségét is.

3.1 Simplex PCR

A módszer legalapvetőbb és egyben legegyszerűbb alkalmazási formája a simplex PCR reakció, amelynek során egyetlen primerpár (lánckezdő oligonukleotidok) felhasználásával szaporítanak fel egy adott szakaszt a DNS-en (*1. ábra*). A simplex PCR reakciókban alkalmazott primereket meg lehet tervezni úgy, hogy fajspecifikusak legyenek, vagyis a fajra jellemző méretű szakaszt szaporítanak fel. Santos és mtsai. (2012) egy vizsgálatban a mezei nyúl (*Lepus europaeus*) mitokondriális genomjában található citokróm b (*cytb*) gén meghatározott szakaszára terveztek fajspecifikus primereket. Ennek a primerpárnak a segítségével egy 127 bázispár (bp) hosszúságú szakaszt szaporítottak fel, ez a szekvenciarészlet 100%-osan specifikus a mezei nyúlra, ugyanis más nyúlfajok esetében a szekvencia eltéréseket mutat az adott régióban. Egy 2010-es tanulmányban ugyanakkor baromfifajoktól és sertésektől származó húsokat vizsgáltak (Soares és mtsai., 2010). A sertés esetében 149 bp hosszúságú szakaszt, a baromfik esetében egy 183 bp hosszú szakaszt vizsgáltak, majd megállapították, hogy a vizsgált szakaszok segítségével sikeresen el lehet különíteni egymástól a különböző fajokat.



1. ábra: A polimeráz láncreakció folyamatának sematikus bemutatása
 Ábra forrása: www.usbr.gov

3.2 Duplex PCR

A simplex-PCR reakciót duplex PCR reakcióvá fejlesztették tovább, vagyis egy reakcióban alkalmazták mindkét primerpárt, sikerült a sertés jelenlétét 0,1 térfogatszázalék mértékű jelenlét esetében is kimutatniuk (Soares és mtsai., 2010). A duplex PCR reakció kiválóan alkalmas arra, hogy kevert mintákból két fajt elkülönítsünk egymástól. Ebben az esetben két fajspecifikus primerpárt alkalmaznak annak érdekében, hogy az elkülöníteni kívánt két fajt azonosítsák. Di Pinto és mtsai. (2005) 30 féle kereskedelmi forgalomban kapható kolbászt vizsgáltak annak megállapítására, hogy egy korábban leírt duplex PCR reakció (Matsunaga és mtsai., 1999) milyen érzékenységgel használható sertés és ló fajok elkülönítésére a már említett minták esetében. Ebben az esetben is eltérő hosszúságú PCR termékeket állítottak elő,

amelyek segítségével megállapították, hogy a korábban leírt primerek alkalmasak a két faj elkülönítésére, továbbá kimutatták, hogy a 30 minta esetében 6-nál volt jelen sertéshús a termékben, míg egy esetben a lóhús teljesen hiányzott.

3.3 Multiplex PCR

A fajspecifikus PCR reakciók közül hatékony módszernek tekinthető a multiplex PCR reakció. Ennek során egyszerre több fajspecifikus primerpárt alkalmaznak egyetlen reakcióban, amiben szintén egyszerre több faj DNS-e is megtalálható. A reakció lehetővé teszi, hogy egyidőben több faj jelenlétét is kimutathassuk. Számos vizsgálatban bizonyították már a módszer alkalmazhatóságát. Jó példa három tejelő faj elkülönítése fajspecifikus primerek segítségével multiplex PCR reakció alkalmazásával. Mindhárom faj – szarvasmarha, kecske, juh – mitokondriális genomjában megtalálható 12S rRNS gén adott régióira terveztek primereket. A mitokondriális genom több kópiában van jelen minden magasabb rendű élőlény sejtjeiben, ezért az eleve nagyobb mennyiségű célszekvenciát tartalmaz szemben a nukleáris genomban lévő szekvenciákkal, így érthető módon a vizsgálni kívánt génszakasz is hamarabb készül nagy mennyiségű másolat (Robin és Wong, 1988). Az említett vizsgálatban alkalmazott primerek a három faj esetében fajspecifikusak voltak, a szarvasmarha esetében 84 bp, míg a juh és a kecske esetében 121 és 122 bp hosszú volt a termék, ezek segítségével elkülöníthetőek voltak a fajok, valamint tesztelték az egyes primerpárok specifikitását számos más állatfaj esetében és eredményül azt kapták, hogy a tervezett primerek, csak és kizárólag a vizsgálni kívánt fajok DNS-hez voltak képesek kötődni (Martín és mtsai., 2007).

3.4 PCR reakciók univerzális primerekkel

A fajspecifikus primerpárok alkalmazásán túl lehetőség nyílik PCR reakcióban egy adott DNS fragmentum univerzális primerekkel történő felszaporítására. Az univerzális primerek több vizsgált faj esetében ugyanazt a régiót fogják közre és játszanak szerepet annak amplifikációjában. Így lehetőség nyílik arra, hogy egy vizsgálatban fajok egész csoportjait tanulmányozzák, kihasználva a módszer univerzális jellegét (Primrose és mtsai., 2010). Jól mutatja a módszer széles körben való alkalmazhatóságát, hogy egyszerre akár 40 faj is vizsgálható. Horreo és mtsai. (2012) tanulmányukban 40 állatfaj

16S rRNS génjének meghatározott régióját szaporították fel univerzális primerpár alkalmazásával. A fajok között helyet kapott 19 halfaj, 4 emlősfaj, 4 madárfaj, 1 ingola és 1 csigafaj. A felszaporított régiók bázissorendjét DNS szekvenálással állapították meg. A kapott szekvenciákat BLAST program segítségével illesztették egymásra, majd ezt követően filogenetikai program alkalmazásával (MEGA 4.0) egy filogenetikai fát generáltak, amely megmutatta a fajok egymáshoz való törzsfajlódási viszonyait. Ezen felül kevert minták esetében is lehetőség van univerzális primerek sikeres alkalmazására több faj együttes kimutatása érdekében (Ardura és mtsai., 2012). Legfőbb előnye az univerzális primerek használatának, hogy viszonylag olcsó és kis műszerigényű metodikát jelent (Ardura és mtsai., 2010).

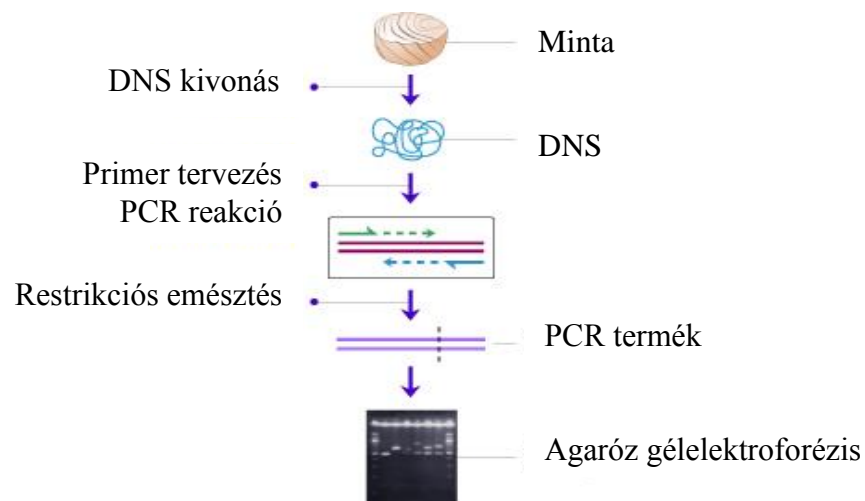
3.5 PCR-rel kapcsolt technikák

Eddig a PCR reakciók olyan felhasználási módjairól volt szó, melyek során egy adott reakcióban a vizsgálni kívánt DNS szakaszt vagy szakaszokat szaporították fel, majd azokat szekvenálással, illetve gélelektroforézis segítségével azonosították. Ezeken az alkalmazási módokon túl a PCR reakciót számos más molekuláris biológiai metodikához kapcsolták, így hozva létre összetett kimutatási technikákat, amelyek pontosabbá és hatékonyabbá tették az élelmiszerekből történő fajazonosítást. Ilyen módszerek a PCR-restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (*PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP*) (Saiki és mtsai., 1985); a PCR-egyszálú DNS konformáció polimorfizmus (*PCR-single strand conformation polymorphism, PCR-SSCP*) (Hayashi, 1991); a PCR-hőmérséklet grádiens gélelektroforézis (*PCR-temperature gradient gelelectrophoresis, PCR-TGGE*), a PCR-időben változó hőmérsékletű gélelektroforézis (*PCR-temporal temperature gelelectrophoresis, PCR-TTGE*) (Yoshino és mtsai., 1991); a PCR-denaturáló grádiens gélelektroforézis (*PCR-denaturing gradient gelelectrophoresis, PCR-DGGE*) (Fischer és mtsai., 1979); a PCR-random amplifikált polimorf DNS (*PCR-random amplified polymorphic DNA, PCR-RAPD*) (Williams és mtsai., 1990); a PCR-amplifikált fragmenthossz polimorfizmus (*PCR-amplified fragment length polymorphism, PCR-AFLP*) (Vos és mtsai., 1995). Végezetül meg kell még említenünk az abszolút genotipizáló módszernek tekinthető DNS szekvenálást, amelynek szintén számos változata van, a klasszikus módszerektől (Maxam-Gilbert-, és Sanger-féle szekvenálás) a jelenleg alkalmazott de novo technikákon (shotgun sequencing, bridge-PCR) keresztül a legújabb nagy

áteresztőképességű új generációs szekvenálási metodikákig (high throughput DNA sequencing).

3.5.1 PCR-restriktációs fragmenthossz polimorfizmus (PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)

A PCR-restriktációs fragmenthossz polimorfizmus során PCR reakcióban megfelelő primerek alkalmazásával felszaporítják a vizsgálni kívánt régiót. A kapott PCR terméket restriktációs endonukleázok segítségével hasítják kisebb fragmentumokra, majd ezeket gélelektroforézis során választják el egymástól, így egy fajra jellemző restriktációs fragmenthossz mintázatot kapnak, ami alapján azonosíthatóvá válnak az egyes fajok (Kocher és mtsai., 1989) (2. ábra).



2. ábra: A PCR-RFLP módszer lépéseinek sematikus bemutatása

A PCR-RFLP analízist elterjedten használják az élelmiszerekből történő fajazonosítás során, ezt jól mutatja az adott módszerrel kapcsolatban fellelhető nagy mennyiségű publikáció. Számos kutatócsoport alkalmazta a módszert fajok, némely esetben fajták, vagy fajon belüli genotípusok elkülönítésére is. Prado és mtsai. (2007) észak-spanyolországi szarvasmarhákat hasonlítottak össze a mitokondriális citokrom b gén 359 bp hosszúságú fragmentumát vizsgálva. Restriktációs analízis során 40 szarvasmarha specifikus allélt sikerült azonosítaniuk 11 lókuszon.

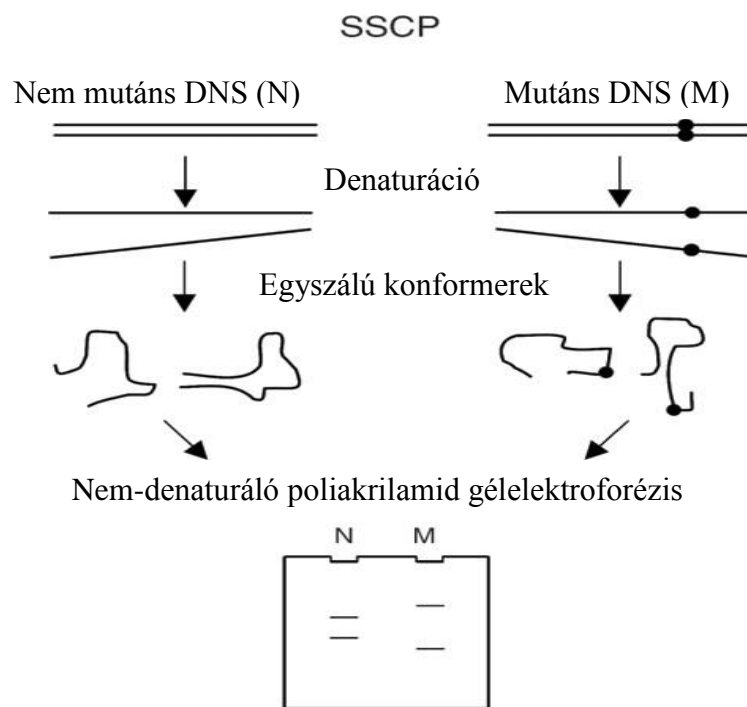
Egy másik tanulmányban (Mane és mstai., 2009) vágóhídról származó húsokat vizsgáltak, amelyeket három csoportra osztottak. Az első csoportban lévő húsokat frissen vizsgálták, míg a második csoportot feldolgozott, a harmadikat pedig autoklávozott húsok alkották. PCR reakcióban a mitokondriális genomban található D-loop régió 442 bp-os szakaszát szaporították fel, ez fajspecifikus régió volt a csirkére nézve. A kapott régiót HaeIII és Sau3AI restrikciós enzimekkel hasították, amelyek a csirkére jellemző fragmentumokat eredményeztek szemben más a vizsgálatba bevont fajjal (bivaly, juh, kecske, sertés, kacsa, pulyka). Így tesztelhető volt a módszer érzékenysége is, hiszen kimutatták, hogy az alkalmazott primerek és restrikciós enzimek fajspecifikus kimutatást jelentenek.

Hasonló módon sikeresen különítették el egymástól bivaly, szarvasmarha, kecske és juh fajokat húsminták esetében, négy restrikciós enzim felhasználásával (Girish és mtsai., 2005). Szintén sikeresen különítették el egymástól szárnyas fajokat (csirke, kacsa, galamb) kontrollként sertést használva Haunshi és mtsai. (2009). A módszer szintén széleskörben való alkalmazhatóságát jól mutatja az a tény, hogy bizonyos vizsgálatokban egyszerre akár 12 állatfaj is elkülöníthető egymástól, fluoreszcensen jelölt primerek felhasználásával szaporították fel kutya, csirke, ló, sertés, pulyka, kecske, juh, tokhal, lazac, szarvas, szarvasmarha és bivaly 12S rRNS gén szakaszát, a kapott szakaszokat pedig két restrikciós enzimmel hasították, így kaptak minden egyes fajra különböző sávmintázatot (Wang és mtsai., 2010). Egy, az előzőhöz hasonló vizsgálatban 11 fajt különítették el 10 különböző restrikciós enzim használatával. A fajok között voltak pulyka, kacsa, fácán, fogoly, erdei szalonka, énekes rigó, fűrj, strucc és sertés fajok. Eredményként azt kapták, hogy a 10 vizsgált enzim közül végül egy (AciI) alkalmas volt arra, hogy mind a 11 vizsgált faj esetében fajra jellemző restrikciós mintázatot hozzon létre, ezáltal lehetővé teszi a fajok elkülönítését egymástól (Stamoulis és mtsai., 2010).

3.5.2 PCR-egyszálú DNS konformáció polimorfizmus (PCR-single strand conformation polymorphism, PCR-SSCP)

Egy másik lehetséges kombináció a PCR-egyszálú DNS konformáció polimorfizmus, amely módszer alkalmas még nem karakterizált pontmutációk jelenlétének

kimutatására, de arra a módszer nem ad választ, hogy az adott mutáció az vizsgált DNS régióon belül hol helyezkedik el, milyen bázisokat érint (Hayashi, 1999). Ennek ellenére a módszer előnyének számít, hogy költséghatékony és gyorsan kivitelezhető. A módszer során a PCR reakciót univerzális primerek felhasználásával hajtják végre, ami azt jelenti, hogy más-más fajok esetében ugyanahhoz a konzervatív szakaszhoz hibridizálnak, aminek eredményeképpen a fajokat az egyes DNS régiókon belül fellelhető szekvencia-eltérések alapján lehet azonosítani. A keletkező termékeket magas hőmérsékleten (95 °C) denaturálják formamid jelenlétében. A kapott egyszálú DNS mintákat nem denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis során választják el egymástól konformációs különbségeik alapján. Ekkor fajra jellemző mintázatok alakulhatnak ki, amelyek segítségével a mintában lévő faj DNS-e azonosíthatóvá válik (Plath és mtsai., 1997). A módszer elvi háttérét képezi, hogy az egyszálú formában, denaturáló körülményeket biztosító közegben jelenlévő DNS molekulák eltérő térbeli konformációt vesznek fel annak függvényében, hogy az egyes fajok milyen pontmutációkat tartalmaznak az adott vizsgált szakaszon (Hayashi, 1992). A módszer kivitelezése során PCR (polimeráz láncreakció) reakcióban univerzális lánckezdő oligonukleidok segítségével amplifikálják az egyes fajok mitokondriális genomjában megtalálható meghatározott régiókat. Az így felszaporított DNS-t formamid jelenlétében 95 °C-on denaturálják. Ezen a hőmérsékleten a kétszálú DNS egyszálú formába kerül és a formamid jelenlétében alacsonyabb hőmérsékleten is megőrzi térszerkezetét, aminek hatására eltűnik a kétszálú DNS megszokott térbeli konformációja és az egyszálú DNS molekulák sajátos, egyedi térbeli konformációkat vesznek fel. Az így létrehozott DNS mintákat nem denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis segítségével választják el (3. ábra). Az egyes fajok esetében a vizsgált génben található mutációk miatt feltételezhetően különböző konformációjú egyszálú DNS szakaszok jönnek létre, amelyek a poliakrilamid gélen fajokra jellemző sávmintázatokat eredményeznek. A géleken kialakuló mintázatokat ezüstoffestés segítségével teszik láthatóvá. Elméleti háttere, hogy a gélben a DNS által elfoglalt és nem elfoglalt helyek között redoxpotenciál különbség áll fenn. Ennek eredményeképpen az ezüst ionok a DNS által elfoglalt helyeken gyorsabban redukálódnak fém ezüstté (Merill és mtsai., 1984). A festési eljárás kimutathatósági határa 3 pg DNS/mm² (Fésüs és mtsai., 2000).



3. ábra: A PCR-SSCP módszer elméleti háttérének sematikus ábrája

Ábra forrása:

http://www.nature.com/nprot/journal/v1/n6/fig_tab/nprot.2006.485_F1.html

A Sparidae családba tartozó tengeri halakon végeztek PCR-SSCP módszer felhasználásával vizsgálatokat. Univerzális primerpárt használtak (Wolf és mtsai., 2000), ami mindegyik faj esetében egy 464 bp-os terméket eredményezett, amit denaturáltak és a keletkezett egyszálú DNS molekulákat konformációjuk alapján választották el poliakrilamid gélen. Ennek eredményeképpen sikeresen választották el a vizsgálatba vont 6 halfaj DNS-ét (Schievenhövel és mtsai., 2013).

3.5.3 PCR-hőmérséklet grádiens gélelektroforézis (PCR-temperature gradient gelelectrophoresis, PCR-TGGE)

A PCR-TGGE módszer alapját az egyes DNS molekulák közötti elektroforetikus mobilitás különbségek detektálása képezi. A keletkező PCR termékeket lineárisan növekvő hőmérséklet grádiensben választják el egymástól. Az adott DNS szakaszban jelenlévő nukleotid szubsztitúciók és más kisebb mértékű változások befolyásolhatják a TGGE során a molekulák mobilitását. Azonban egy nukleotid változása a duplahelikális szerkezetben nem befolyásolja a molekula elektroforetikus mobilitását, de alapvetően

függ annak hosszától és görbületétől (Haran és mtsai., 1994). Amikor a molekula eléri azt a hőmérsékleti tartományt a gélben, ami megegyezik az olvadási hőmérsékletével (T_m) a mobilitása drasztikusan csökkenni kezd, valamint duplahelikális szerkezetből átalakul denaturált, egyszálú szerkezetűvé. A mobilitás drámai csökkenése egybeesik az első olvadási domének megjelenésével, mivel ilyenkor a DNS molekula elágazó szerkezetet vesz fel, ami alapvetően gátolja a mozgását a gél mátrixában (Myers és mtsai., 1987). A módszer során a mutációk detektálására az egyes olvadási doménekben kerülhet sor, mivel ezek alacsonyabb hőmérsékleti tartományban kezdenek el denaturálódni. Azonban ha egy mutáció magas olvadási hőmérséklettel rendelkező olvadási doménba esik és ezáltal nem lehetne karakterizálni azt, van lehetőség ún. GC-clamp alkalmazásával megváltoztatni az olvadási tulajdonságait egy adott DNS szakasznak úgy, hogy a mutáció alacsonyabb hőmérsékletű olvadási doménba kerüljön (Myers és mtsai., 1985).

3.5.4 PCR-időben változó hőmérsékletű gélelektroforézis (PCR-temporal temperature gelelectrophoresis, PCR-TTGE)

A PCR-TTGE módszer abban különbözik a PCR-TGGE módszertől, hogy míg az előbbi esetében magában a gélben alakítanak ki hőmérséklet-grádiens, vagyis különböző hőmérsékletű zónákat, addig a TTGE során a poliakrilamid gél hőmérséklete egységes a kiindulási időpontban és a továbbiakban is az marad, de meghatározott időközönként a hőmérsékletet emelik, ezzel biztosítanak hőmérséklet-grádiens az idő függvényében (Zoller és mtsai., 2005; Jones és Knapp, 2009).

3.5.5 PCR-denaturáló grádiens gélelektroforézis (PCR-denaturing gradient gelelectrophoresis, PCR-DGGE)

A PCR-DGGE módszer során a vizsgálat tárgyát képező duplahelikális, részlegesen denaturált vagy egyszálú DNS molekulák egy poliakrilamid gélen kerülnek elválasztásra, amelynek összetétele denaturáló körülményeket biztosít a vizsgálatához, olyan módon, hogy a denaturáló ágens(ek) koncentráció grádiens mentén oszlanak el a gél mátrixában. Legjellemzőbb ilyen denaturáló ágens a formamid (CH_3NO) és az urea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$). A formamidot jellemzően 0-40 V/V% tartományban alkalmazzák, az ureát pedig 0-7 M koncentráció tartományban (Peters és Robinson, 2010). A DGGE módszer

kimutatási hatékonyságát jól mutatja, hogy ismert mutációk csoportját vizsgálva a CFTR génben embernél, 201 ismert mutációból mind a 201 mutációt képesek voltak azonosítani az alkalmazott technika segítségével (Macek és mtsai., 1997). A módszer továbbá alkalmas heteroplazmia kimutatására mitokondriális betegségek esetében (Tully és mtsai., 2000).

A DGGE módszerből számos továbbfejlesztett változat alakult ki a széleskörű kutatásoknak köszönhetően. Ilyen módszerek a nagy tartományú DGGE (broad range DGGE), amellyel lehetőség nyílik egyetlen gélen adott futtatási körülmények mellett egy gén összes exonját vizsgálni (Guldberg és Guttler, 1994). A multiplex DGGE során szimultán módon képesek több exon vizsgálatát végrehajtani (Costes és mtsai., 1993). A mikroTGGE (microtemperature gradient gelelectrophoresis) módszert egy 20×20×0,5mm méretű gélt felhasználva végzik, aminek eredményeképpen a futtatáshoz szükséges DNS mennyisége csökken, csakúgy mint az időtartam (12 perc, 100V, 10mA) (Biyani és Nishigaki, 2001; Tominaga, 2007). Dupla grádiens DGGE esetében a denaturáló anyagok (formamid, urea) koncentráció grádienséhez társul a gélt alkotó poliakrilamidnak a koncentráció grádiense is (6-12 V/V%) (Cremonesi és mtsai., 1997).

3.5.6 PCR-random amplifikált polimorf DNS (PCR-random amplified polymorphic DNA, PCR-RAPD)

A RAPD széleskörben alkalmazott molekuláris genetikai technika (Williams és mtsai., 1990). A módszer segítségével a vizsgált faj genomjának ismeretlen régiói amplifikálhatóak egyetlen random primer alkalmazásával. A RAPD primerek átlagosan 10 bp hosszúságúak, 50-80% GC tartalommal rendelkeznek és nem tartalmazhatnak palindrom szakaszokat. A RAPD primerek szekvenciája ismert és ez az ismert szekvencia találja meg a számára komplementer helyeket. A módszer felhasználásával 2-10 random fragmentum szaporítható fel, amelyek 200 és 2000 bp közötti mérettartományba esnek. A módszer előnye, hogy egyszerűen kivitelezhető, gyors és kevés DNS mennyiség szükséges a vizsgálathoz. A véletlenszerűen amplifikált polimorf DNS meglehetősen jól reprodukálható (Zsolnai és Orbán, 1999).

A módszert bizonyos esetekben alkalmazzák fajok egymástól való elkülönítésére. Rastogi és mtsai (2007) tanulmányukban több gerinces faj mitokondriális genomjából

származó 16S rRNS génjét és a nukleáris genomból származó NADH dehidrogenáz 4 alegység (ND4) génjét vizsgálták. Ezek a gének már korábban is több populációs szintű vizsgálatban szerepet játszottak (Goebel és mtsai., 1999). A vizsgálat során 5 random primert teszteltek, végül ezek közül csak egy adott megbízható RAPD „ujjlenyomatot”, ami alapján a vizsgált fajok (bivaly, szarvasmarha, kecske, sertés, csirke) elkülöníthetőek voltak. A kapott RAPD mintázatok kiértékelése során azt is megállapították, hogy a mitokondriális eredetű 16S rRNS gén esetében kapott eredmény megbízhatóbb volt, mint a nukleáris genomból származó ND4 gén.

3.5.7 PCR-amplifikált fragmenthossz polimorfizmus (PCR-amplified fragment length polymorphism, PCR-AFLP)

A PCR alapú metodikák közül az egyik leghatékonyabbnak tekinthető módszer a Zabeau és Vos (1995) által leírt PCR-AFLP. A DNS-t enzimatikusan emésztik, majd a keletkezett fragmentumokhoz adaptereket kapcsolnak, ezeket használják fel templátként a reakció során, olyan primerek alkalmazása mellett, amelyek szelektív bázist/bázisokat és a hasítóhelyekre valamint az adapterekre komplementer szekvenciákat tartalmaznak. A vizsgálat eredményeképpen keletkező fragmentumokat 5-6%-os denaturáló poliakrilamid gélen választják el. A denaturálás történhet autoradiográfiás, ezüstfestéses vagy digoxigenines jelöléssel.

A fragmentumok várható száma megbecsülhető a $2R/4^n$ képlet segítségével (Hajósné, 1999). A képletben az R a jelölt hasítási helyek számát, míg az n a szelektív nukleotidok összes számát jelöli. A becsült értéket a genom mérete és a szelektív nukleotidok genomon belüli száma is befolyásolja. Az amplifikált fragmentumok optimális száma 100 alatti, mert ezen érték felett az elválasztás minősége romlik. A módszer segítségével egyidejűleg 20-100 fragmentum azonosítható. A technika előnye, hogy jól reprodukálható, továbbá az, hogy az alkalmazott restriktív enzimek és primerek nagymértékben kombinálhatóak.

Sasazaki és mtsai. (2004) fajtaspecifikus markerek azonosítását tűzték ki célul. Vizsgálatukba japán fekete és Holstein szarvasmarha fajták egyedét vonták be. A két fajta között megközelítőleg 7000 polimorf sávot találtak AFLP módszer segítségével, amelyek a fajták közötti elkülönítést szolgálhatják. Azokat az eltéréseket tekintették

markereknek, amelyek megfeleltek a következő kritériumoknak, vagyis kevesebb, mint 10%-ban van jelen japán fekete fajtában, több mint 70%-ban van jelen Holstein fajtában. Ezt figyelembe véve 6 markert találtak, amelyek megfeleltek a megfogalmazott kritériumoknak.

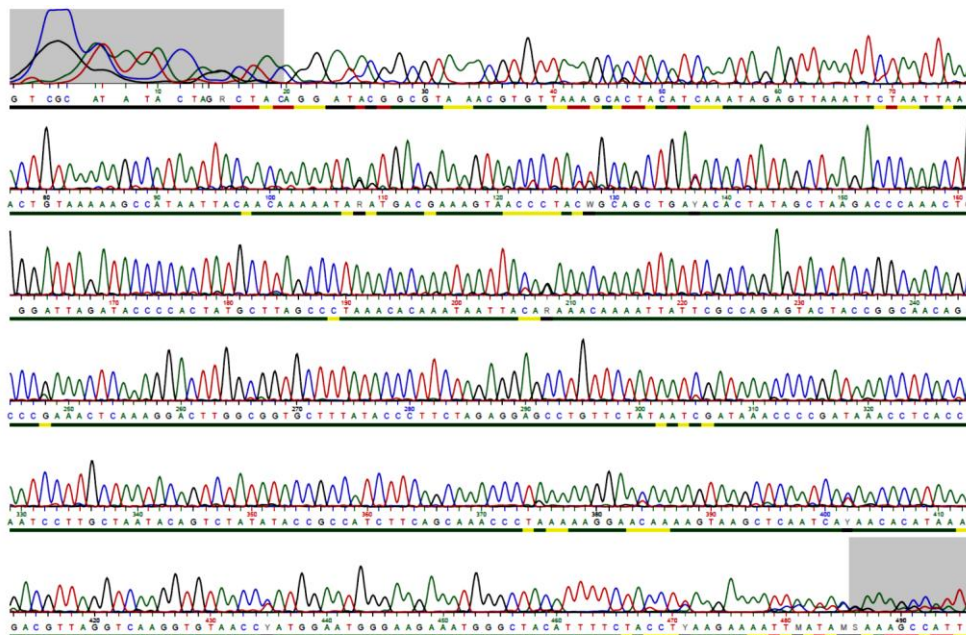
3.6 DNS szekvenálás

A Sanger féle szekvenálás során az adott DNS molekulákat szintén jelölik ^{32}P izotópot tartalmazó anyag segítségével, ebben az esetben a DNS szintézis során felhasználódó egyes dNTP molekulák tartalmazzák a jelölést. Fontos lépése a módszernek a lánctermináció, ami folyamán módosított dNTP-eket ún. dideoxinukleotidokat (ddNTP) használnak fel. Ezeket úgy módosítják, hogy 3' helyzetben ne tartalmazzanak hidroxil-csoportot. Amikor egy ilyen ddNTP beépül az éppen szintetizálódó DNS szálba, módosult kémiai tulajdonságai miatt nem kapcsolódhat hozzá következő dNTP, a szintézis leáll (termináció). Ezt a reakciót mind a négy nukleotid dideoxi változatával végre kell hajtani, majd négy reakcióelegyet kapunk, amelyekben az egyes DNS láncok specifikusan a T, C, G, A pozíciókban végződnek. A termináció lépésének véletlenszerűen kell lejátszódnia. Az elválasztás ebben az esetben is denaturáló poliakrilamid gélen történik, a detektálási mód szintén autoradiográfia (Sanger és mtsai, 1977).

Mikroszekvenálás során egy variábilis nukleotid környezetében lévő szakaszt szaporítanak fel, majd a PCR terméket szilárd hordozó felülethez kötik egyszálú formában. Ehhez képes betapadni az ún. detektáló primer, amelynek 3' vége a vizsgálni kívánt nukleotid mellett van. Itt a jelölt dNTP vagy ddNTP képes beépülni polimeráz enzim segítségével (Syvanen és mtsai., 1991). A reakciót követően az egyes komponenseket eltávolítják, majd a szilárd hordozón lévő beépült nukleotidon lévő fluoreszcens festék alapján azonosítják a kérdéses nukleotidot és ezáltal a genotípust is. Detektálási módszer lehet ebben az esetben a fluoreszcencia rezonancia energiáttranszferen alapuló módszer is (Chen és Kwok, 1997) (Zsolnai és mtsai., 2003).

A piroszekvenálás valós idejű technika, a módszer során végrehajtott láncszintézis alatt felszabaduló inorganikus pirofoszfát csoport mennyiségével arányos emittált fény – amit luciferáz enzim által katalizált reakció generál – intenzitásából határozzák meg a

DNS molekula szekvenciáját (Nordström és mtsai., 2000). A reakció során szisztematikusan adagolják az egyes nukleotidokat. Amelyik nem komplementer a meghatározni kívánt szekvenciával, a reakcióelegyben lévő apiráz enzim által lebomlik. A komplementer bázisok ugyanakkor a DNS polimeráz segítségével beépülnek, ami alatt szabad pirofoszfát keletkezik a beépülő bázis mennyiségével arányos mennyiségben. A szekvencia az emittált fény intenzitásából állapítható meg, ami viszont arányos a hozzáadott dNTP mennyiségével. Az 4. ábrán egy DNS szekvenálás eredményét láthatjuk szekvenogram formájában.



4. ábra: Sanger-féle DNS szekvenálás eredményeként kapott szekvenogram

3.7 Kvantitatív real-time PCR (QPCR)

A kvantitatív PCR reakciók egyik legegyszerűbb formája a reverz transzkripció PCR (RT-PCR). Ez a módszer kevésbé képes kvantitatív kimutatásra, hiszen segítségével csak arra kaphatunk választ, hogy az adott gén mRNS-éről átíródó cDNS (komplementer DNS) „sokkal kevesebb – nagyon sok”, vagy „jelen van – nincs jelen”. A pontatlan kimutatás visszavezethető az agaróz gélelektroforézis során alkalmazott DNS-festékek alacsony hatásfokára, DNS-be való beépülésére. Az egyszerű RT-PCR kimutatási pontatlanságai miatt került sor a kompetitív RT-PCR megalkotására. Ezen

módszer végrehajtása során a vizsgálandó RNS mintákat több csőbe osztják és ún. referencia RNS-eket kevernek hozzájuk, ez majdnem teljesen azonos a target RNS-sel, a vizsgálathoz alkalmazott primerekkel felszaporítható, viszont a detektálás során elkülöníthető a vizsgált RNS-től. A hozzáadott referencia RNS koncentrációjának ismeretében lehetőség van arra, hogy a kimutatni kívánt RNS mennyiségét is megközelítőleg becsülni tudjuk. A kompetitív RT-PCR jelentős hátránya, hogy nem egyszerűen kivitelezhető technika, nagy hibákat mutat, és hosszas optimalizálást igényel. Mindkét módszer esetében a mérési hibát azzal lehet magyarázni, hogy a PCR reakció termékének mennyiségét a 30-40. ciklus után mérik, tehát abban a tartományban, ahol a reakció plató fázisba kerül. A PCR termékek mennyisége nem tükrözi megbízhatóan az eredeti mintában jelenlévő kiindulási cDNS mennyiségét.

A PCR reakciókban csak a korai ciklusok alkalmasak arra, hogy megfigyeljük a termékek növekvő exponenciális ütemű termelődését a ciklusszámmal korrelációban. A reakció későbbi fázisában több tényező is akadályozza a termékek további képződését:

- a szubsztrátok (dNTP, primerek) felhasználódnak,
- a DNS polimeráz véges koncentrációja limitáló tényező, hőinaktiválás
- a DNS polimeráz működését gátló pirofoszfát jelenléte.

A korai exponenciális fázisban real-time kvantitatív PCR készülékek alkalmazásával lehetőség nyílik minden egyes ciklus végén detektálni és mennyiségileg meghatározni a keletkező PCR-termékeket. A készülékekben lévő kvantitatív kimutatást lehetővé tevő szoftverek rögzítik a ciklusszám-termékmennyiség függvényt, azt grafikusán ábrázolják a felhasználói felületen, majd ebből az ábrázolt függvényből lehet azonosítani az exponenciális fázist (Sambrook és Russel, 2001).

A DNS és cDNS detektálása történhet real-time rendszerben aspecifikus és specifikus módon is (Udvardi és mtsai., 2008).

Aspecifikus kimutatás során szekvenciától függetlenül bármilyen duplaszálú DNS molekulát kimutat a rendszer, ehhez legtöbbször SYBR Green interkalációra (beépülésre) képes DNS festéket használnak fel. A festék 497 nm-en gerjeszthető és 520 nm-en fluoreszcens jelet bocsát ki. A módszer szigorú optimalizálást igényel a vizsgálat

szempontjából érdektelen DNS szakaszok felszaporításának elkerülése miatt (Zipper és mtsai., 2004).

Specifikus kimutatás során szükség van fluorofort és quencher tartalmazó oligonukleotid próbára valamint két primerre. A kimutatás feltétele, hogy a primerek által közrezárt DNS régióhoz a próba is hibridizáljon. Az alapján, hogy a fluoreszcens jel milyen módon jön létre, megkülönböztetünk hidrolízis és hibridizációs próbákat. A hidrolízis próbák 5' végén található a fluorofor, 3' végükön pedig a quencher. A fluorofor csoport fluoreszcenciája a quencher jelenlétében elhanyagolható mértékű a detektálás szempontjából, azonban amikor a PCR reakció során a DNS polimeráz exonukleáz aktivitása miatt nukleotidokra bontja az alkalmazott próbát a fluorofor távol kerül a quencheről, fluoreszcenciája százszoros növekedést is mutathat, ami már megfelelő mértékű a keresett DNS szakasz azonosításához.

A hibridizációs próbák csoportjába sorolhatók a molekuláris villogók (molecular beacon) és a skorpió próbák (scorpion probes). A molekuláris villogó próbák szerkezetére jellemző, hogy középső szakaszuk a kimutatni kívánt DNS szakasszal komplementer szekvenciájú, a 3' illetve 5' végéhez pedig kapcsolódik a fluorofor és a quencher. Amennyiben nincs jelen a detektálni kívánt régió, a próba hajtú konformációt vesz fel, a fluorofor és a quencher egymás közelében helyezkedik el, a fluorofor által kibocsátott fluoreszcencia gátolva van, nem lehet azt detektálni. A célszekvencia jelenlétében azonban a próba hibridizál az adott szakaszhoz, ennek eredményeképpen megszűnik a hajtú konformáció, a fluorofor és a quencher távol kerülnek egymástól, a fluorofor fluoreszcenciája százszorosára növekszik és így lehetővé válik a kimutatás. A skorpió próbák szerkezete abban tér el a molekuláris villogó próbák felépítésétől, hogy gyakorlatilag egy molekuláris villogó van összekapcsolva egy PCR primerrel egy linker segítségével, mindez pedig úgy van kialakítva, hogy a PCR reakció során a Taq polimeráz ne legyen képes a molekuláris villogó szekvenciáját is felszaporítani. A PCR reakció során zajlik le a molekuláris villogó hajtú szerkezetének kiegyenesedése, vagyis növekszik meg a fluorofor által kibocsátott fluoreszcencia mértéke.

A hibridizációs próbáknál egyetlen nukleotid eltérés is alkalmatlanná teheti a próbák hibridizációját a célszekvenciához, ennek jelentős előnye, hogy rendkívül specifikus kimutatás érhető el az alkalmazásukkal.

3.7.1 QPCR reakció kiértékelése

A hagyományos DNS kimutatási módszerek megbízhatatlanok a DNS mennyiségének meghatározása szempontjából, arra vonatkozóan csak becslésekre képesek. Azonban a kvantitatív real-time PCR rendszerek esetében lehetőség van a nukleinsavak mennyiségének pontos meghatározására, aminek eredményeképpen vizsgálható két faj, fajta vagy akár egy egyedben belül eltérő szövetek közötti génextpresszió mértéke. A kvantitálásnak két formája létezik: a relatív kvantifikálás és az abszolút kvantifikálás (Dhanasekaran és mtsai., 2010).

Abszolút kvantifikálás során a mintában található DNS pontos mennyisége állapítható meg DNS standarddal való összehasonlítást követően. Relatív kvantifikálás során belső referencia gének alkalmazásával határozzák meg a célszekvencia expressziójában bekövetkező változásokat. Belső referencia géneknek ún. háztartási (housekeeping) géneket szoktak alkalmazni, amelyek génextpressziójának szintje állandónak tekinthető, így jó viszonyítási alapot jelentenek a kvantitálás során. A pontos kísérleti körülményektől és a vizsgálni kívánt géntől, génektől függ, hogy melyik háztartási gént fogják az adott vizsgálatban felhasználni belső referenciaként (Thellin és mtsai., 1999; Radonic és mtsai., 2004; Dheda és mtsai., 2004). A leggyakrabban alkalmazott normalizáló, belső referencia gének: tubulin, glicerin-aldehid-3-foszfát dehidrogenáz, albumin, ciklofilin (Pfaff és mtsai., 2005).

A kvantitatív real-time PCR reakciókat is igen elterjedten alkalmazzák az élelmiszerekből történő fajazonosítás során. Cammá és mtsai. (2012) öt fajspecifikus real-time PCR protokollt fejlesztettek, standardizáltak és validáltak pulyka, csirke, szarvasmarha, sertés és juh húsának kimutatására összetett élelmiszerekből. Specifikus primereket és próbákat terveztek minden egyes reakcióhoz. Vizsgálatuk célszekvenciái a mitokondriális genomban lokalizálódó 16S rRNS és a citokróm b gén szakaszai voltak. A fejlesztett real-time rendszer kimutatási érzékenységét jellemzi, hogy képes volt az egyes fajokból származó DNS minták esetében 0,02 és 0,80 pg templát kiindulási DNS mennyiségből is azonosítani az egyes fajokat. A kimutatás hatékonysága 95-100%-os volt. A módszer kivitelezéséhez alapul vették a Lazaro és mtsai. (2004) által leírt Internal Amplification Protocol-t.

Kesmen és mtsai. (2009) célul tűzték ki ló, szamár és sertés húsminták elkülönítését húskeverékekből Q-PCR módszer alkalmazásával. A vizsgálatban TaqMan próbát

alkalmazták, amit specifikusan terveztek minden fajra. A primerek specifikitását hét állatfajon tesztelték; sertés, ló, szamár, szarvasmarha, juh, csirke, pulyka. A teszt eredményeképpen megállapították, hogy a szamár és sertés minták nem adnak keresztreakciót a többi fajjal, azonban a ló 33 ciklus után keresztreakciót mutat. Nyers és hőkezelt húsminták esetében is 0,00001%-os (0,00001ng szennyező faj DNS 100ng mintában) kimutatási határt sikerült elérniük.

A kvantitatív real-time PCR rendszerek rendkívül robusztus technikák a fajazonosítási gyakorlatban és kutatásokban, mind a specifikitásukra, mind az érzékenységükre nézve. A módszer használata során leggyakrabban vizsgált gének a mitokondriális genomban lokalizálódnak. Miért ezek képezik a vizsgálatok tárgyát sok esetben? Mert a mitokondriális gének megfelelő mértékű fajon belüli és fajok közötti variabilitást mutatnak bázissorrendjükben, valamint nagyszámú másolatban vannak jelen minden egyes sejtben.

A leggyakrabban választott gének közé tartozik a citokróm b (Dooley és mtsai., 2004; Meyer és mtsai., 1995), a D-loop régió (Fei és mtsai., 1996; Monteil-Sosa és mtsai., 2000), a 12S rRNS gén (Rodriguez és mtsai., 2004, 2005) és a 16S rRNS gén (Borgo és mtsai., 1996; Sawyer és mtsai., 2003).

3.8 Gélelektroforézis

Számos elválasztási technika létezik a nukleinsavak és fehérjék szeparálására. Széleskörűen elterjedt formája ezeknek a technikáknak a gélelektroforézis, amelynek során ionos töltéssel rendelkező molekulák elválasztása történik egy jól meghatározott paraméterekkel rendelkező elektromos erőtérben a molekulatömeg vagy a felületi töltéssűrűség alapján. Az elektroforézis lehetővé teszi az egyes anyagok háromféle módon történő elválasztását egymástól: felületi töltéssűrűség, a molekula alakja és tömege alapján. Az alkalmazott módszerek többségének esetében a DNS molekulák elhanyagolható töltés különbséggel rendelkeznek és az alakjuk is hasonló (kivétel a PCR-SSCP, PCR-DGGE, PCR-TGGE és PCR-TTGE módszerek), ezért az elválasztás méret szerint történik egyenáram felhasználása mellett. A gélelektroforézis során az elválasztandó anyagok egy mátrixban mozognak. Ezt a mátrixot értelmezték korábban úgy, mint egy szűrő, amelynek szerkezete merev (Righetti és Gelfi, 1997), ez alapvetően egy leegyszerűsített leírása a mátrix felépítésének, azonban meg kell

jegyezni, hogy bizonyos jelenségek könnyen magyarázhatóak lehetnek ezzel a megközelítéssel (Locke és Trinh, 1999).

A legújabb elképzelés a mátrix szerkezetére vonatkozóan az ún. door-corridor modell, amely a mátrixot elasztikus tulajdonságúnak írja, amelyben a polimerek szálai az adott molekula erejétől függően ajtószerűen eltolódnak egymáshoz képest (Kozulic, 1995).

A gélelektroforézis során leggyakrabban agaróz és poliakrilamid mátrixokat alkalmaznak, míg kapilláris elektroforézis és elektroforézis chippek esetében inkább alacsony koncentrációjú folyékony halmazállapotú monomer vegyületeket (Adam és mtsai., 1994; Ogura és mtsai., 1998; Quesada, 1997).

3.8.1 Poliakrilamid gélelektroforézis

A leggyakrabban alkalmazott polimerek gélelektroforézis során a poliakrilamid és az agaróz. A poliakrilamid akrilamid monomerekből felépülő térhálós szerkezetű polimer, amelyben az akrilamid egységek keresztkötését a legtöbb esetben az N-N'-metilén-bisz-akrilamid biztosítja. A poliakrilamid mátrixának pórusméretét az akrilamid és az alkalmazott keresztkötő vegyület koncentrációi határozzák meg. Az alkalmazott monomer koncentrációja fordított arányosságot mutat a mátrix pórusméretével. Ennek következménye, hogy amennyiben növekszik a monomer koncentrációja, úgy növekszik a mátrix szűrőhatása. 5% C_{bisz} értéknél a legkisebb a gél pórusátmérője, ettől akár csökkenő, akár növekvő irányba eltérve nő a pórusméret, vagyis csökken a gél szűrőhatása (Chrambach, 1980).

A poliakrilamid géleknek két nagy csoportját különíthetjük el: a nem denaturáló és a denaturáló géleket. A nem denaturáló gélét legfeljebb 1000 bp hosszúságú DNS szakaszokhoz lehet felhasználni. A DNS másodlagos szerkezete megmarad, az egyes fragmentumok vándorlási sebessége függeni fog az adott szakasz bázisösszetételétől.

A denaturáló poliakrilamid gélben az alkalmazott denaturáló ágensek (urea, formamid, hő) megszüntetik a másodlagos szerkezetet, vagyis a DNS mobilitása nem fog függeni a bázisösszetételtől. A denaturáló gélek alkalmasak lehetnek bázisszekvencia meghatározására.

A poliakrilamid gélek alkalmazása lehetővé teszi akár 1bp különbség kimutatását, valamint a géltre felvitt DNS mennyisége kellőképpen magas lehet, elérheti az $1\mu\text{g}/\text{mm}^2$

mennyiséget is (Righetti, 1989). A poliakrilamidnak azonban jelentős hátránya, hogy monomer formában erős, kumulatív hatású neurotoxin, habár eddig a laboratóriumi gyakorlatban nem jegyezték fel mérgezéses esetet. Hátránya továbbá, hogy toxikus hatása miatt fokozott elővigyázatosságot igényel, valamint polimerizációja nehezen ellenőrizhető és szűk az elválasztási tartománya (Mulloy, 1996; Wise és mtsai., 1995). Buzás és Varga (1995) írtak le olyan, radioaktív izotópok használatát nélkülöző poliakrilamid elválasztási módszert, amellyel mikroszatellitek esetében 2 bp felbontást értek el.

3.8.2 Agaróz gélelektroforézis

Az agarózt vörös algából vonják ki és kémiaailag módosítják, annak elérése érdekében, hogy nagyobb stabilitással rendelkezzen, alacsonyabb olvadáspontja legyen és mentes legyen a nukleinsavak lebontására képes enzimektől. Nagy előnye a poliakrilamidhoz képest, hogy nem mutat toxikus tulajdonságokat. Kezelése könnyű, a szükséges mennyiségű agaróz port megfelelő pufferben feloldva, melegítve és formába öntve állítható elő az elválasztáshoz szükséges agaróz gél (Zsolnai és mtsai., 1993).

A hagyományos gélelektroforézis elválasztási tartománya rendkívül széles, alkalmas lehet 40-50 kbp méretű fragmentumok elválasztására is, de pulzáló erőterű gélelektroforézist alkalmazva lehetőség nyílik Mbp nagyságrendű fragmentumok elválasztására is (Lindstedt és mtsai., 2000). Az agaróz gélelektroforézis felbontása alacsonyabb mértékű, mint a poliakrilamid gélelektroforézisé és a géltre felvihető DNS mennyisége is kevesebb. A fragmentek méretbeli elkülönítésén túl, az agaróz gélelektroforézis alkalmas DNS és RNS minták koncentrációinak becslésére.

3.8.3 Mobilitást befolyásoló tényezők

A mintának a gél mátrixában történő mozgását, vagyis mobilitását több tényező is befolyásolhatja. A mobilitásra hatással vannak a minta tulajdonságai, valamint a gélelektroforézis paraméterei, mint például az alkalmazott elektromos térerősség, a gél koncentrációja, illetve a pufferoldat koncentrációja és típusa. Amennyiben a pufferoldat koncentrációját növeljük csökkeni fog a DNS fragmentumokra jutó áram, ezért az elválasztás is lelassul, ugyanakkor a fejlődő hő rontani fogja a gél szerkezeti stabilitását,

ezáltal viszont növekszik a sávok diffúziója a gélben, ami a felbontást rontja (Chrambach, 1987).

További tényezők is befolyásolhatják az elektroforézis körülményeit, ilyenek a fragmentumok konformációja, a DNS-hez esetlegesen kapcsolódó fehérjék és festékanyagok. Ezek módosítják a DNS tömegét és konformációját, ezáltal hatással vannak a mobilitásra, ami viszont meghatározó a felbontás szempontjából (Sigmon és Larcom, 1996).

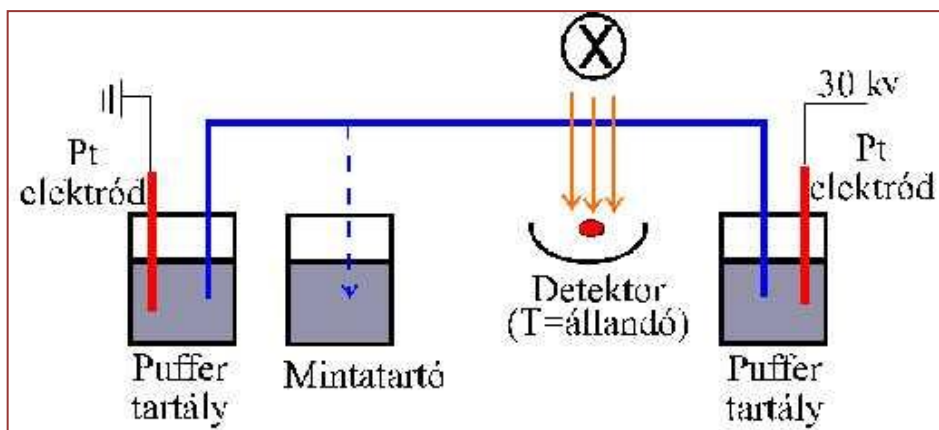
3.9 Kapilláris elektroforézis

A kapilláris elektroforézis (CE, Capillary electrophoresis) olyan elválasztási technika, amely során mikrométeres kapilláris csöveken keresztül, elektromos térben valósul meg az elválasztás. A kapilláris falán filmréteg, gél, illetve micellák is lehetnek, valamint változó pH-jú pufferrel töltött lehet. A kapillárison áthaladó DNS fragmentumok detektálása fluoreszcencia mérésével történhet. A fluoreszcencia lehet természetesen eredetű, vagy fluoreszcens jelölés hozzáadásával is létrehozható. A fluoreszcencia méréséhez lézer sugarat használnak, amelynek nagy érzékenysége ($10^{-18} - 10^{-21}$ mol) miatt magas a felbontóképessége. További előnye, hogy kevés mintát igényel és gyors eljárás. A módszer hátránya, hogy a fluoreszcens jelölés nem minden minta esetében kivitelezhető. A kapilláris elektroforézis elválasztási módjai különbözőek lehetnek: zonális, izotachoforézis, micelláris.

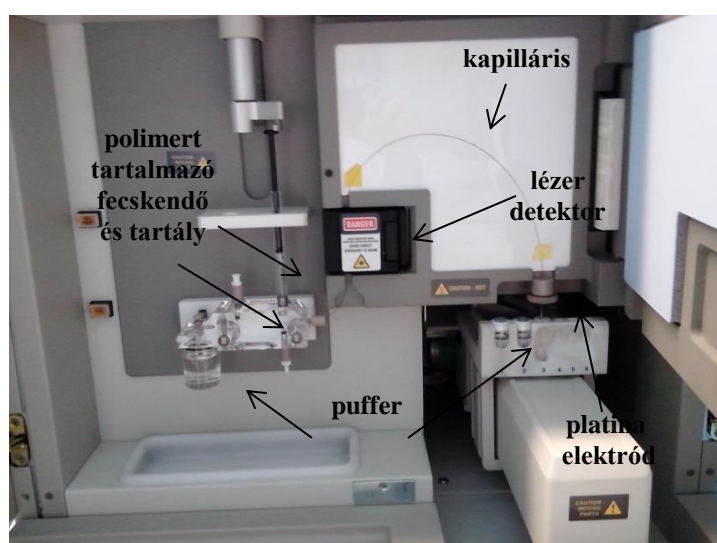
A zonális elektroforézis a leggyakrabban használt módszer, mely során a mintát a kapilláris egyik végébe visszük fel, és a kapillárisra kapcsolt erőter hatására a minta a kapillárisban eltérő sebességgel vándorol, így eltérő sávok jelennek meg, hasonlóan a gél alapú technikákhoz.

Az izotachoforézis során a mintákat egy vezető (magas elektroforetikus mobilitású ionokat tartalmaz) és egy záró (alacsony elektroforetikus mobilitású ionokat tartalmaz) zóna közé helyezik, ahol az elektroforézis során a mobilitásuktól függően a megfelelő zónába kerülnek, és ott vándorolnak.

A micelláris kromatográfia során detergenset alkalmaznak, melyek micellákat képeznek. A töltés nélküli minták micellába kerülnek, melyek a felszíni töltésük alapján vándorolnak (anionos detergensok esetén anód felé, kationos detergensoknál katód felé). (Hajósné, 1999)



5.ábra: A kapilláris elektroforézis elve



6. ábra: ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer készülék felépítése

Az 5. ábrán a kapilláris elektroforézis módszer elve látható, ahol a szaggatott nyíl jelzi, hogy a mintatartóból kerül felszívásra a kapillárisba a minta. A 6. ábrán az eszköz belső felépítése figyelhető meg.

3.10 Primertervezés a fajazonosítási vizsgálatok során

A fajazonosításban felhasznált PCR reakciók minden esetben lánckezdő primereket igényelnek az amplifikálendő DNS szakasz szintéziséhez. Bizonyos esetekben a vizsgálni kívánt szakaszhoz már korábban megtervezett és publikált primereket használnak fel. Azonban a legtöbb esetben a primerek megtervezése a vizsgálatot végző személyekre hárul. A primerek megtervezéséhez számos bioinformatikai online és

offline platform és szoftver áll rendelkezésre. Az egyik legszélesebbkörűen alkalmazható primer tervező szolgáltatás az Integrated DNA Technologies által üzemeltetett Oligoanalyzer[®], ami elérhető webes felületen keresztül (Internetes hivatkozás 1.), de szoftver formájában is hozzáférhető. A program lehetőséget nyújt arra, hogy az általunk vizsgálni kívánt gének szekvenciárészleteit felhasználva, számos paramétert figyelembevéve tervezhessük meg a szükséges primereket. Lehetőség van pontosan megadni a program számára a későbbiekben alkalmazott PCR reakció egyes paramétereit – primer, Na⁺ és Mg²⁺ valamint dNTP koncentráció –, amely alapján kiszámolja a tervezett primerszekvenciára jellemző tulajdonságokat: GC%, olvadási hőmérséklet (T_m), molekulatömeg. Ezen felül lehetőség van ellenőrizni a program segítségével, hogy a tervezett forward és reverse primerek képeznek-e egymással dimereket, valamint az egyes primerek milyen valószínűséggel vesznek fel hajtű konformációt.

Hasonlóan hatékony a Primer3 elnevezésű primertervező szolgáltatás, ami az Oligoanalyzer-rel szemben csak online formában érhető el (Internetes hivatkozás 2.). Az Oligoanalyzer-hez hasonlóan számos beállítás adható meg és a program szintén képes kikalkulálni a tervezett primerek paramétereit (Untergrasser és mtsai., 2012; Koressaar és Remm, 2007).

Mielőtt azonban elkezdenénk a primerek tervezését egy adott program felhasználásával, szükségünk van az általunk vizsgálni kívánt faj vagy fajok adott génjének pontos szekvenciájára. A keresett szekvenciákat több adatbázisban is fellelhetjük. Széleskörűen használt genomadatbázisok és genomböngészők érhetőek el online formában az Interneten, ezek közül a legjelentősebbek: az USCS Genome Browser, az Ensembl Genome Browser, de a legnagyobb és legtöbbször használt az amerikai National Center for Biotechnology Information (NCBI) nukleotid adatbázisa. Amikor ezekben az adatbázisokban megtaláljuk a vizsgálatához szükséges szekvenciákat, azokat össze lehet hasonlítani, egymáshoz lehet illeszteni azokat a megfelelő algoritmusok alkalmazásával. Ilyen szekvencia-illesztő algoritmus a European Bioinformatics Institute (EBI) honlapján található CLUSTALW2 vagy ennek egy újabb verziója, a CLUSTAL OMEGA. Az utóbbi verzió segítségével néhány órás futtatási idő mellett százezres nagyságrendű szekvencia is illeszthető (Sievers és mtsai., 2011). A programban lehetőség van DNS, RNS és fehérjeszekvenciák illesztésére is. A szekvenciák beviteli formátumai közül a legfontosabb kiemelni a FASTA formátumot,

amit elterjedten használnak mind nukleinsav-, mind fehérjeszekvenciák leírására. A formátumot kezdetben csak fehérjeszekvenciák leírására használták – ez volt a FASTP – de a későbbiekben elkészült ennek módosított változata, amely alkalmas volt a nukleinsav-szekvenciák lejegyzésére is (Lipman és Pearson, 1985; Pearson és Lipman, 1988). A 7. ábrán egy FASTA formátumban rögzített szekvenca látható.

```
>gi|20177368|emb|AJ457159.1| Bubalus bubalis mitochondrion partial 12S rRNA
gene
CTCAAACCTGGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGCCCTAAACACAAATAATTATATTAACAAAATTATTC
GCCAGAGTACTACCGGCAACAGCCTAAAACCTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTTATATCCCTCTAGAGGAGC
CTGTTCTATAATCGATAAACCCCGATAGACCTCACCAATTCTTGCTAATGCAGTCTATATACCGCCATCT
TCAGCGAACCCCTAAAAAGGTACAAAAGTAAGCGCAATCACAACGCATAAAAAACGTTAGGTCAAGGTGTAA
CCTATGAAATGGGAAGAAATGGGCTACATTTTCTACACCAAGAACACCCAACACGAAAGTTATTATGAAA
ATTAATAACCAAGGAGGATTAGCAGTAAACTAAGAATAGAGTGCTTAGTTGAACTAGGCCATGAAGCA
CGCACACACCGCCCGTCACCCTCA
```

7. ábra: A bivaly (*Bubalus bubalis*) 12S rRNS gén részleges szekvenciája FASTA formátumban

Minden szekvenciaillesztő program alapját képezi egy algoritmus, amely lehetővé teszi az egyes szekvenciák egymáshoz történő illesztését. A legelterjedtebb algoritmus a BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) amely gyorsan előnybe került a régebbi algoritmusokkal (Smith-Waterman) szemben, mivel sokkal gyorsabban volt képes végrehajtani a szekvenciák illesztését a saját heurisztikus algoritmus alapján (Altschul és mtsai., 1990).

3.11 Nem PCR alapú módszerek az élelmiszerekből történő fajazonosításban

A PCR alapú metodikákon túl fontos megemlíteni még a nem PCR alapú technikákat is, amelyek szintén jelentős szerepet játszanak az élelmiszerekből történő fajazonosításban. Hús és hústermékek esetében lehetőség van az ivar és a fajta megállapítására, a vad és domesztikált fajok elkülönítésére, a földrajzi eredet meghatározására. Az ivar megállapítása történhet gázkromatográfia-tömegspektrometria (GC-MS), nagy nyomású folyadékkromatográfiaúával kapcsolt tandem tömegspektrometria (HPLC-MS-MS), enzim kapcsolt immunsorbens assay (ELISA) módszerekkel. Hartwig és mtsai. (1997) szarvasmarha húsok esetében a szteroid hormonok kvantitatív GC-MS mérésével különítette el a nemeket. HPLC-MS-MS

módszert alkalmazva szintén szarvasmarha vérérumából származó anabolikus hormonok vizsgálatával vált lehetővé a nemek elkülönítése (Draisci és mtsai., 2000).

A fajták elkülönítésénél széleskörűen alkalmazzák az SNP chipekkel végzett vizsgálatokat. Zsolnai és mtsai. (2013) mangalica fajták elkülönítését végezték el 60K sertés SNP chip alkalmazásával 9 SNP marker segítségével 80 mangalica egyeddel.

A vadon élő és domesztikált fajták elválasztását gázkromatográfiával (GC) (Karapanagiotidis és mtsai., 2006) vagy izotópos elemvizsgálattal (Thomas és mtsai., 2008) végezhetik.

A földrajzi eredet meghatározását végezhetik tömegspektrometriás (MS) elemzéssel vagy szintén SNP-kre épülő metodikával. Nakashita és mtsai. (2008) szarvasmarhák esetében határozták meg a földrajzi eredetet stabil szén, oxigén és nitrogén izotópok tömegspektrometriás mérésével. Negrini és mtsai. (2008) összesen 24 szarvasmarhafajta földrajzi eredetét határozták meg 90 független SNP markerrel történő genotipizálás során, az adatok kiértékelése Bayes statisztikával történt.

Az élelmiszerek esetében elvégzendő nem PCR alapú fajazonosítás történhet ELISA, folyadékkromatográfia (LC), izoelektromos fókuszálás, kapilláris gélelektroforézis (CE). ELISA módszerrel szarvasmarha β -kazein monoklonális kimutatását hajtották végre és ezzel specifikusan mutatták ki szarvasmarha faj jelenlétét sajtokból (López-Calleja és mtsai., 2007). Elektrokémiai detektálással elvégzett folyadékkromatográfiával 15 faj elválasztása vált lehetővé. Ezek közé tartozott a szarvasmarha, sertés, kecske, gímszarvas, ló, házi tyúk, házi kacsa, strucc, lazac, tökehal, garnélarák, tarisznyarák, fésűkagyló, kecskebéka és alligátor. A fagyasztás-felolvasztás ciklusai a kimutatás érzékenységét befolyásolták, de az elkülönítésre nem voltak hatással (Chou és mtsai., 2007). Izoelektromos fókuszálással vizsgálták darált húsban lévő vízdékony fehérjefrakciót, a gélt digitalizált formában többváltozós regressziós analízissel elemezték. A kimutatott fajok szarvasmarha, sertés és pulyka voltak (Skarpeid és mtsai., 1998). Kapilláris elektroforézis alkalmazásával vízdékony és sóoldatban oldódó fehérjék elválasztását végezték el, majd a kapott elektroforeogramok lineáris diszkriminancia analízissel történő kiértékelése történt meg (Vallejo-Córdoba és mtsai., 1998).

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Általánosan alkalmazott módszerek

4.1.1. Bioinformatikai eszközök alkalmazása PCR primerek tervezése során

A tervezett fajazonosítási vizsgálatok mindegyikéhez szükséges volt olyan primerpárok tervezése, amelyek univerzális primerként alkalmazhatóak, vagyis a primerek által közrezárt célszekvencia az egyes fajok esetében egyező volt. A kimutatás alapját az ezekben a szakaszokban található szekvencia-eltérések alapján kialakuló különbözőségek jelentették. A PCR SSCP módszer során ezek az eltérések az egyszálú DNS molekulák konformációjában okoznak eltéréseket.

Az univerzális primerek tervezése során első lépésként az egyes fajok 12S rRNS szekvenciáit az NCBI GenBank adatbázisából töltöttük le, majd ezekkel a szekvencia-adatokkal végeztük el az European Bioinformatics Institute (EBI) honlapján található CLUSTAL OMEGA algoritmus segítségével a többszörös illesztést. A kapott eredmények alapján kiválasztottunk, több olyan szakaszt, amelyek mindegyik faj esetében azonosnak bizonyultak és ezekre a szakaszokra terveztünk primereket. A tervezett primerek tulajdonságait – becsült tapadási hőmérséklet, self-dimer és hetero-dimer képződésének valószínűsége – OligoAnalyzer 3.1 szoftver online verziójával végeztük el. A legtöbb esetben a primerek méretét 20 bp-ban határoztuk meg, míg az SSCP vizsgálathoz optimális termékméretet választottunk, ami 100-800 bp közé esett. A self-dimer és hetero-dimer képzés ellenőrzése során az OligoAnalyzer szoftver által kalkulált Gibbs-féle szabadenergia (ΔG) értékét vettük figyelembe, -9kcal/mol értéknél negatívabb érték esetében nem megfelelőnek ítéltük a tervezett primerpárt.

A tej és sajtminákhoz hasonlóan a hús és hústermék minták esetében is a laboratóriumi vizsgálatokat megelőzően bioinformatikai módszereket felhasználva, kibővítve hajtottuk végre az egyes fajok mitokondriális genomjában kódolt 12S rRNS szekvenciák többszörös illesztését a már korábban is alkalmazott EBI CLUSTAL OMEGA algoritmus segítségével. Így ellenőriztük, hogy a már elkészült és alkalmazott univerzális primerpár más fajoknál is hibridizál-e, azaz más fajok is rendelkeznek-e ugyanazokkal a konzervatív régiókkal, amivel a szarvasmarha, bivaly, juh és kecske. A

nukleotid szekvenciák ebben az esetben is az NCBI GenBank adatbázisából származtak. A többszörös illesztésbe bevont fajok adatait a 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat. Többszörös illesztés során vizsgált fajok

Sorszám	Magyar név	Latin név	GenBank azonosító
1.	Szarvasmarha	<i>Bos taurus</i>	GQ926965.1
2.	Bivaly	<i>Bubalus bubalis</i>	GU119953.1
3.	Juh	<i>Ovis aries</i>	JQ622016.1
4.	Kecske	<i>Capra hircus</i>	GQ926969.1
5.	Sertés	<i>Sus scrofa domestica</i>	AM158316.1
6.	Vaddisznó	<i>Sus scrofa</i>	GQ338938.1
7.	Muflon	<i>Ovis aries orientalis</i>	GU350356.1
8.	Ló	<i>Equus caballus</i>	EU851885.1
9.	Házi nyúl	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	U59264.1
10.	Gímszarvas	<i>Cervus elaphus</i>	AF091707.1
11.	Dámszarvas	<i>Dama dama</i>	AY397662.1
12.	Őz	<i>Capreolus capreolus</i>	JN632610.1
13.	Házi galamb	<i>Columba livia domestica</i>	X87857.1
14.	Házi tyúk	<i>Gallus gallus</i>	JN695761.1
15.	Gyöngytyúk	<i>Numida meleagris</i>	AF222587.1
16.	Pulyka	<i>Meleagris gallopavo</i>	AJ490508.1
17.	Házi kacska	<i>Anas platyrhynchos domestica</i>	JN695765.1
18.	Pézsmaréce	<i>Cairina moschata</i>	AF173705.1
19.	Házi lúd	<i>Anser anser</i>	JN695751.1
20.	Ember	<i>Homo sapiens</i>	JX024567.1

A halfajok egymástól való elkülönítése során kétféle megközelítést alkalmaztunk. Az egyik esetben több primerpár lett tervezve fajcsoportokra, ahol a csoportokon belüli elkülönítés volt a cél, míg a másik esetben egy univerzális primerpár lett tervezve az összes a vizsgálatba vont halfaj citokróm-oxidáz I. alegység (COI) gén szekvenciájára. A csoportos elrendezés során 2 csoportba soroltuk a fajokat, amiket szeretnénk volna a továbbiakban vizsgálni és ennek alapján történt a primertervezés is. A 1. csoportba a fogassüllő és kőssüllő tartozott, amelyekhez tartozó primerpár által közrefogott szakasz szintén a citokróm b génben volt megtalálható. A 2. csoport tagjai a ponty, ezüst kárász és fehér busa voltak. Esetükben a tervezett primerek az előbbi két csoportéhoz hasonlóan a citokróm b-génben rendelkeztek tapadási régióval. Minden esetben a szekvenciák többszörös illesztését CLUSTAL OMEGA algoritmussal végeztük, majd a kapott illesztés ismeretében jelöltük ki a primereink számára a feltapadási szakaszokat. Az egyes primerek hairpin, self-dimer és hetero-dimer struktúrák kialakítására való hajlandóságát, valamint az egyes primerek anellálási hőmérsékletét OligoAnalyzer 3.1 szoftver segítségével állapítottuk meg.

4.1.2. DNS izolálás módszerei

Genomi DNS izolálása sajtokból, hústermékekből és halfajokból

A sajtból és hústermékből történő DNS izolálást a De és mtsai. (2011) által leírt fenol-kloroform-izoamil-alkoholos módszert alkalmazva hajtottuk végre.

1. A sajtmintákat folyékony nitrogén segítségével homogenizáltuk.
2. A homogenizált mintákból 70 mg-ot mértünk ki 2 ml-es eppendorf csőbe, ezután 900 µl extrakciós puffert (75 mM NaCl; 2 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl; 0,45 V/V% SDS) és 120 µg Proteináz K enzimet (Sigma) adtunk hozzá. A mintákat a hozzáadott vegyszerekkel szuszpendáltuk.
3. Egy éjszakán keresztül, 50 °C-ra beállított vízfürdőben inkubáltuk.
4. A inkubációt követően 900 µl fenolt (Sigma, /pH=8/) adtunk a mintákhoz, ezután néhányszor átforgattuk őket, mikrocentrifugában centrifugáltuk (Heraeus, BIOFUGE pico) 15 700 g-n 10 percig, végül a felső vizes fázisból 800 µl-t vittünk át egy másik 2 ml-es eppendorf csőbe.
5. 800 µl 25:24:1 arányú fenol-kloroform-izoamil-alkohol (Sigma) elegyet adtunk a mintáinkhoz, ezután 15 700g-n 10 percen át centrifugáltuk, végül a felső vizes fázisból 500 µl-t vittünk át egy másik 2 ml-es eppendorf csőbe.
6. 500 µl 24:1 arányban összeállított kloroform-izoamil-alkoholt (Sigma) adtunk a mintákhoz, majd 15 700 g fordulaton centrifugáltuk, ezt követően 300 µl mennyiséget vittünk át a felülúszóból 1,5 ml-es eppendorf csőbe.
7. A DNS kicsapást 0,8 térfogat arányú izopropanollal (Merck) hajtottuk végre, a mintákat 5 percre 4 °C-ra helyeztük, végül 12 500 g-n 10 percig centrifugáltuk, ezután a nukleinsav a cső alján pelletként jelent meg.
8. A pelletet 70 V/V%-os etanollal (VWR) mostuk, majd papírtörőre fordítva szárítottuk a mintákat.
9. 100 µl TE pufferben (10 mM Tris-HCl /pH 8/; 1 mM EDTA), egy órán keresztül eluáltuk a pelletet 65 °C-on.
10. Az inkubálást követően a mintákat felhasználásig -20 °C-ra helyeztük.

Genomi DNS izolálása bomlásnak indult ponty szövetből és légylárvából

A vizsgált mintákból genomi DNS-t izoláltunk Geneaid Genomic DNA Mini Kit (Geneaid Biotech, Taiwan) segítségével, majd az izolátumok koncentrációit NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) készülék felhasználásával ellenőriztük.

4.1.3. DNS izolátumok minőségi és mennyiségi ellenőrzése

A DNS izolálást követően mintáink koncentrációit és tisztaságukat spektrofotometriás módszerrel mértük és jellemeztük NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) felhasználásával 230, 260 és 280 nm hullámhosszon. Az adott műszerrel mérjük a 230, 260 és 280 nm-en történő fényelnyelés mértékét. A DNS molekulák jellemzően 260 nm-en, a fehérjék 280 nm-en, míg egyes szerves oldószerek (pl. fenolátok, tiocianátok) 230 nm-en nyelik el a fényt. 260/280 és 260/230 arányok a DNS izolátum tisztaságáról tájékoztatnak. 260/280 arány esetében 1,8-2,0 értékek esetében beszélünk tiszta izolátumról, míg 260/230 arány esetében 1,8-2,2 értékek között jelenthetjük ki ugyanezt.

A későbbi kísérleti beállítások – meghatározott arányú keverési sorozatok – megkövetelték, hogy az egyes minták egységes koncentrációban tartalmazzák a DNS-t. Mivel az izolálást követően az egyes minták koncentrációértékei jelentősen eltérnek, ezért szükséges volt a minták koncentrációinak egységesítése hígítás vagy koncentráls segítségével. Ezt a lépést elvégezve minden minta egységesen 50 ng/μl koncentrációban tartalmazott DNS-t.

4.1.4 PCR reakciók általános lépései

PCR reakciók során alkalmazott reakcióelegy összetétele 10 μl-re vonatkoztatva:

- 2 mM MgCl₂ (Fermentas)
- 10x Dream Taq puffer (Fermentas)
- 100 μM dNTP (Fermentas)
- 1 pM reverz primer (Sigma)
- 1 pM forward primer (Sigma)
- 0,05 U Dream Taq polimeráz (Fermentas)

A reakcióelegyet lamináris boxban mértük össze. 9 μl PCR mixhez 100 ng DNS-t adtunk. A reakciókat DNA Engine® Peltier Thermal Cycler (BioRad) készülékben hajtottuk végre.

4.1.5 Agaróz gélelektroforézis

Az előállított PCR termékek kimutatásához 2 m/V%-os agaróz gél alkalmaztunk.

Az alkalmazott 2 m/V%-os gél összetétele 150 ml-re vonatkoztatva:

- 3 g agaróz (SeaKem® LE Agarose, Lonza)
- 150 ml 1x TAE puffer (1000 ml-re vonatkoztatva 20 ml AccuGENE 50x TAE Buffer, Lonza; 980 ml dH₂O)
- 150 μl 1000x GelRed (Biotium, 10 000x vízben)

Az elektroforézis végrehajtásához a Wide Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad) készüléket használtuk fel, erre 4 V/cm feszültséget kapcsoltunk a BioRad PowerPac™ Basic készülék alkalmazásával. A kapott DNS mintázatokat UV fény segítségével tettük láthatóvá, és Uvipro Platinum (Uvitec) készülékkel dokumentáltuk, Uvipro Platinum szoftverrel értékeltük. A program denzitométer funkciója lehetővé tette, hogy a PCR termékek sávintenzitását meghatározzuk, és az így kapott intenzitásértékeket egymáshoz hasonlítsuk.

4.1.6 PCR-SSCP módszer általános lépései

A poliakrilamid gél összetétele

2,4 ml 10x TBE puffert (Sigma), 9,9 ml 40% akrilamid/bisz-akrilamid oldatot (Sigma) mértünk össze, majd desztillált vízzel 40 ml-re egészítettük ki, hozzáadtunk 400 µl 10 %-os ammónium perszulfát oldatot (Sigma), valamint 30 µl TEMED-et (tetrametil-etiléndiamin; BioRad). Az elektroforézis 400 V feszültségen 8 órán keresztül zajlott PowerPac Universal Power Supply (BioRad) tápegység és Protean II xi Cell (BioRad) elektroforézis kádban.

A PCR termékek előkészítése SSCP-hez

A korábban előállított PCR termékeket 95 °C-on denaturáltuk 5 percre, majd jégen hűtöttük. 1,5 µl PCR termékhez 15 µl Formamid Dye-t (8 V/V% brómfenol kék, xilén cianol festék (Sigma); 92 V/V% formamid) adtunk. A formamid képes megakadályozni a komplementer szálak összekapcsolódását.

Poliakrilamid gélelektroforézis eredményének előhívása

Ezüstfestés

A poliakrilamid gélen megjelenő DNS sávokat ezüstfestéssel tettük láthatóvá, amely négy lépésből tevődik össze.

1. Fixálás

500 ml végtérfogatú fixáló oldatot állítottunk össze, ami 50 ml abszolút alkoholt (VWR), 2,5 ml ecetsavat (Sigma) és 447,5 ml dH₂O-t tartalmazott. A gél ebben az oldatban 10 percen keresztül rázógépen tartottuk, majd desztillált vízzel mostuk a gél.

2. Festés

A festés végrehajtásához első lépésben 50 ml 1 m/v%-os ezüst-nitrát törzsoldatot készítettünk, amit 500 ml-re egészítettünk ki 450 ml dH₂O-val, így 0,1 V/V%-os ezüst-nitrát oldatot kaptunk. Ebben inkubáltuk a gélt 10 percen át rázógépen, végül kétszer desztillált vízzel mostuk.

3. Előhívás

Az előhívó oldat 60 ml 15 m/v%-os NaOH törzsoldatot, 6 ml 1 m/v%-os NaBH₄ törzsoldatot és 700 µl 37 m/v%-os formaldehidet tartalmaz, amit 600 ml-re egészítettünk ki desztillált vízzel. Ebből az oldatból 80 ml-t használtunk fel a felesleges ezüst-nitrát eltávolítására, majd a visszamaradó oldatot felhasználva a géleket addig tartottuk rázógépen, amíg sávok jelentek meg.

4. Leállítás

A leállításhoz 50 ml 7,5 m/v%-os Na₂CO₃ törzsoldatot készítettünk, amit 500 ml-re egészítettünk ki dH₂O-val. Végezetül a kapott gélmintázatokat szkener és számítógép segítségével detektáltuk, valamint Uvipro Platinum (Uvitec) készülék segítségével is detektáltuk a géleken látható mintázatokat.

4.1.7 Kapilláris elektroforézis

A PCR termékek előkészítése kapilláris elektroforézishez a következő módon történt. 0,5 µl kétszeresen hígított PCR termékhez 0,5 µl LIZ500™ standard-et adtunk, majd ezt 9 µl Hi-Di formamiddal (Life Technologies, USA) egészítettük ki. Az elektroforézist argon-ion lézerrel felszerelt ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) végeztük el, amelynek kibocsátási hullámhossza 488-514 nm. Az egyes mintákat elektrokinetikusan injektáltuk 4 másodpercen keresztül, 15 kV feszültség alkalmazása mellett egy 47 cm (effektív hosszúság: 30 cm) hosszúságú, 50 µm kapillárisban (Life Technologies), amit az injektálást megelőzően 15 V/V%-os Pluronic F108 polimerrel töltöttünk fel (Sigma-Aldrich), ami 0,7x Genetic Analyzer puffert (Life Technologies) tartalmazott. Az elektroforézis 35 °C-on, 15 kV feszültség mellett 40 percig tartott. A jelek detektálása 525-650 nm hullámhosszak között történt. A nyers adatok

összegyűjtését Data Collection szoftver 3.1.0 verziójával végeztük, míg az adatok kiértékelése GeneMapper® 3.7 szoftverrel (Applied Biosystems) zajlott. Az egyes futtatások közötti eltérések korrekciója érdekében az elektroferogrammok normalizációját végeztük el, amihez az elektroforézis során alkalmazott LIZ500™ standard-et használtuk fel.

4.2 A tej és tejtermékek vizsgálatának specifikus módszertana

4.2.1 Minták

A kísérlet során szarvasmarha, bivaly, juh és kecske elegytejeket valamint kereskedelmi forgalomból származó sajtokat vizsgáltunk PCR-egyszálú DNS konformáció polimorfizmus alkalmazásával. A kontrollmintaként felhasznált tejek minden faj esetében elegytejek voltak, mintánként 4 egyedtől származtak. Az elegytej minták Debrecen térségéből, állattartó telepekről származtak, továbbá meghatározott térfogatarányban kevert tejekből készítettünk sajtokat, melyek minden esetben két faj tejét tartalmazták. Az egyes mintákat további felhasználásig -20 °C-on tároltuk. A vizsgálatokhoz szükséges DNS-t különböző módon izoláltuk tej- és sajtminták esetében.

4.2.2 DNS izolálás specifikumai

A tejből történő DNS izoláláshoz a Zsolnai és Orbán (1999) által leírt módszert vettük alapul, amit több pontban módosítottunk.

A DNS izolálás lépései a következők voltak:

1. Fajonként 1000 µl tejmintát centrifugáltunk (Heraeus, BIOFUGE pico) 7 percig, 13 000 g-n.
2. A centrifugálás után a felülúszó tetején tejsír gyűlik össze, amit spatula-mikrokanál segítségével távolítottunk el.
3. A pelletről lepipettáztuk a vízfázist.
4. Ezt követően 200 µl lízis puffert (10 mM KCl; 1,5 M MgCl₂; 10 mM Tris /pH7,4/) adtunk a mintákhoz, azokat vortexeltük, majd 12 000 g-n, 2 percig centrifugáltuk. Leöntöttük a felülúszót.
5. A 4. lépésben leírtakat kétszer megismételtük.

6. A mintákat tartalmazó eppendorf csöveket papírtörőre helyezve szárítottuk.
7. A szárítás ideje alatt összemértük a 100 µl lízis puffert (10 mM Tris; 50 mM KCl; 0,5 V/V% Tween 20) és 80 µg Proteináz K (Sigma) enzimet tartalmazó elegyet.
8. Minden mintához 104 µl elegyet adtunk, a pelletet pedig ezzel az eleggyel felszuszpendáltuk.
9. A mintákat 60 percig 56 °C-os vízfürdőbe helyeztük, majd a Proteináz K inaktiválása céljából 10 percre 94 °C-os vízfürdőbe kerültek a minták.
10. Ezután az egyes izolátumok minőségi és mennyiségi ellenőrzése következett, végül a mintákat -20 °C-on tároltuk, amíg nem kerültek felhasználásra.

4.2.3 Alkalmazott primerek

A tej és tejtermékek vizsgálatához felhasznált primereket az 2. táblázatban foglaltuk össze.

2. táblázat. Univerzális primerek tulajdonságai

Primerek	Primerszekvencia	Termék-méret (bp)
Univerzális forward	5' – ACTCTAAGGACTTGGCGGTG – 3'	278
Univerzális reverse	5' – TTTACTGCTAAATCCTCCTT – 3'	

4.2.4 Alkalmazott PCR reakciók specifikumai

Hőmérséklet grádiens PCR reakció

A többszörös illesztés eredménye alapján öt primer lett tervezve, négy forward és egy reverse primer. A megfelelő anellálási hőmérséklet kiválasztásához hőmérséklet grádiens PCR reakciót alkalmaztunk. Ekkor négy fajból – szarvasmarha (*Bos taurus*), juh (*Ovis aries*), kecske (*Capra hircus*) és bivaly (*Bubalus domesticus*) – származó DNS mintákat kevertünk össze egy DNS elegybe. Ezt alkalmaztuk a reakció során templátként. Az alkalmazott reakcióelegy összetétele a 4.1.4. pontban van feltüntetve. A reakció során alkalmazott hőmérséklet grádiens 57,8-65 °C közötti tartományban állítottuk be. A hőmérséklet grádiens PCR reakció eredménye alapján a további PCR reakciókhoz 60 °C anellálási hőmérsékletet választottunk ki.

PCR reakció a négy primerpár alkalmazásával fajonként és a négy faj kevert DNS-ének felhasználásával

Miután a hőmérséklet grádiens PCR reakciót elvégeztük és kiválasztottuk anellálási hőmérsékletnek a 60 °C fokot, olyan reakciót állítottunk össze, ahol az egyes primerpárokat tartalmazó reakcióelegyekbe csak egy fajtól származó DNS templátot mértünk, valamint olyan elegyet is, amibe a négy faj kevert DNS-e került.

A reakció során felhasznált elegy összetétele a 4.1.4. pontban került ismertetésre. A felhasznált primereket a 4.2.2. fejezet 1. táblázatban foglaltuk össze. A reakció körülményeit a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat. A PCR reakciók körülményei

Ciklus lépései	Hőmérséklet (°C)	Időtartam (perc)	Ciklusszám
Taq polimeráz aktiválása	95	1,5	1
Denaturálás	95	0,5	35
Anellálás	60	0,5	
Extenzió	72	0,5	
Végső lánchosszabítás	72	5	1

A PCR reakció sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

PCR reakciók különböző keverési arányokkal rendelkező DNS templátok felhasználásával

A PCR reakciókhoz első lépésként DNS elegyeket állítottunk össze. A juh, a kecske és a bivaly DNS-éhez adtunk szarvasmarha DNS-t a következő arányokban: 5 V/V%, 10 V/V%, 20 V/V%, 30 V/V%, 40 V/V% és 50 V/V%, emelet minden mintasorozaton belül volt egy minta, ami 100 V/V%-ban csak az adott sorozatban vizsgált faj DNS-ét – vagyis juh, kecske vagy bivaly DNS-t – valamint egy minta, ami 100 V/V%-ban csak szarvasmarha DNS-t tartalmazott.

Az 5 V/V%-tól 50 V/V%-ig terjedő keverési arányokat alkalmazó PCR reakció végrehajtása után alacsonyabb keverési arányokkal rendelkező mintákat alkalmazó PCR reakciót állítottunk össze. Ezekben a mintasorozatokban a juh, a kecske és a bivaly DNS-éhez szarvasmarha DNS-t kevertünk 0,1 V/V%, 0,5 V/V%, 1 V/V%, 3 V/V% és 5 V/V% arányban. Ebben az esetben is mindegyik mintasorozat tartalmazott egy mintát, amely 100 V/V%-ban az adott mintasorozatban vizsgált faj DNS-ét – azaz juh, kecske vagy bivaly DNS-t – és egy minta, ami 100 V/V%-ban szarvasmarha DNS-t tartalmazott.

A PCR reakció sikerességét agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztük.

A PCR-SSCP módszert a 4.1.6. pontban ismertetett módon hajtottuk végre.

4.2.5 Duplex-PCR reakció juh-szarvasmarha DNS keverékek esetében – kvantitatív kimutatási lehetőségek vizsgálata

Juh és szarvasmarha elegytejeinek felhasználásával végeztük el duplex-PCR reakciók kivitelezését, amelynek célja volt, hogy agaróz gélelektroforézist követően a kapott sávok intenzitás értékeit megmérve becsülni tudjuk, hogy adott termékben milyen arányban mutatható ki a szarvasmarha faj jelenléte.

A kvantitatív kimutatáshoz szükséges volt meghatározni egy kalibrációs egyenletet, amelynek felállításához először egy standard keverési sort kellett létrehozni. A keverési sor mintái meghatározott arányokban tartalmazták a juh és szarvasmarha fajok DNS-eit, ügyelve arra is, hogy előzetesen a két faj DNS mintáinak koncentrációi egységesítve legyenek. A DNS izolálást, illetve a koncentrációk meghatározását követően tehát az egyes minták koncentrációt egységesen 100 ng/μl, 50 ng/μl és 10 ng/μl koncentrációkra állítottuk be, majd mindegyik koncentrációérték mellett elkészítettük a keverési sorokat.

Összesen 6 keverési arány került beállításra (0, 1, 5, 20, 30, 50 V/V% szarvasmarha DNS), mindegyik keverési arány esetében 5 párhuzamos mérés (PCR reakció + elektroforézis) történt, melyek átlagait ábrázoltuk a keverési arányok függvényében, egyenest illesztettünk az ábrázolt adatpontokra, majd meghatároztuk a kalibrációs egyenletet. Pozitív kontrollként 100v/v %-os szarvasmarha és 100v/v %-os juh DNS minta is része volt a sorozatoknak.

Duplex-PCR reakciók körülményei

A duplex-PCR reakciók kivitelezéséhez szükséges primerpárok optimális tapadási hőmérsékletét hőmérséklet grádiens PCR reakció során állapítottuk meg. A hőmérsékleti grádiens 55-65 °C között került beállításra. Ennek eredményeképpen mind a szarvasmarha-specifikus, mind a juh-specifikus primerpár esetében az optimális tapadási hőmérséklet 59 °C-nak adódott. A továbbiakban ezen a hőmérsékleten végeztük el a PCR reakciókat.

A duplex-PCR reakció során alkalmazott primerek Bottero és mtsai. (2003) munkája alapján lettek kiválasztva. A primerek adatait a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat. Duplex-PCR reakció során alkalmazott primerek tulajdonságai

Faj (gén)	Primerek (forward/reverse)	Termékméret (bp)
Juh (forward: 12SrRNS; reverse: 16S rRNS)	5' ATATCAACCACACGAGAGGAGAC 3'	172
	5' TAAACTGGAGAGTGGGAGAT 3'	
Szarvasmarha (12S rRNS)	5' GTACTACTAGCAACAGCTTA 3'	256
	5' GCTTGATTCTCTTGGTGTAGAG 3'	

A PCR reakció során felhasznált PCR mix összetétele 15 µl-re vonatkoztatva:

- 1x Dream Taq puffer (Fermentas)
- 20 µM dNTP (Fermentas)
- 4 mM MgCl₂ (Fermentas)
- 2 pM Reverse1 primer (Sigma)
- 2 pM Forward1 primer (Sigma)
- 2 pM Reverse2 primer (Sigma)
- 2 pM Forward2 primer (Sigma)
- 0,05 U Dream Taq polimeráz (Sigma)

13,5 µl PCR mixhez 1,5 µl DNS templátot mértünk, mindezt lamináris boxban végeztük el. A PCR reakciók a vizsgálat alatt több változatban is végre lettek hajtva. A

változtatások a primerpárok egymáshoz viszonyított arányait és a reakciók ciklusszámát érintették. A reakciók beállításait a 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat. A duplex-PCR reakciók körülményei

Ciklus lépései	Hőmérséklet (°C)	Időtartam (perc)	Ciklusszám
Taq polimeráz aktiválása	95	1,5	1
Denaturálás	95	0,5	35 / 33 / 30 / 25
Anellálás	59	0,5	
Extenzió	72	0,5	
Végső lánchosszabítás	72	5	1

A primerpárok arányát a kiindulási 1:1-ről 30 és 25 ciklusból álló reakciók esetében egyaránt változtattuk 1:0,5 és 1: 0,25-re a szarvasmarha-specifikus primerpár rovására. A 30 ciklusból álló reakciók során 1:0,75 primerpár-arány is kipróbálásra került, valamint a 25 ciklusból álló reakciónál 1:1 primerpár-arány is beállításra került. Ezekon felül primerpár-arány változtatása nélkül egy 33 ciklusból álló reakció is részét képezte az optimalizálási folyamatnak.

Statisztikai elemzés

A kapott sávintenzitás értékek kiértékelése Microsoft Office Excel 2010 és SPSS 14.0 programokkal történt.

4.2.6 Comet-assay – Üstökös gélelektroforézis

Az élelmiszerekben található DNS degradáltsági fokának megállapítására alkalmas módszer lehet a comet assay (SCGE, single cell gel electrophoresis) eljárás, amely során egy sejt DNS tartalmának vizsgálata történik PCR reakció végrehajtása nélkül agaróz gélelektroforézis és megfelelő mintaelőkészítés elvégzésével.

1. A tárgylemezeket 20 percre -20 °C-ra helyeztük.

2. A tárgylemezeket kivettük a fagyasztóból, a párát letöröltük, majd 1 m/v%-os agarózba mártottuk. Az agarózt 70 °C-os vízfürdőben tartottuk a megszilárdulás elkerülése érdekében. Így készül el az ún. fedőréteg.
3. A vizsgálni kívánt mintából 1g mennyiséget vettünk ki, azt szikével felaprítottuk. A felaprított kiindulási anyagot előzetesen lehűtött PBS pufferbe helyeztük és mágneses keverőn 5 percig, 500 rpm fordulaton kevertettük. A folyadékot 100 mikronos szűrőn leszűrtük. Az előállított homogenizátum tartalmazta a kiindulási anyagban lévő sejteket.
4. A tárgylemezen lévő fedő agaróz rétegre került egy ún. futtató agaróz réteg, ami tartalmazta a homogenizátum sejtjeit. A futtató réteg 0,5 m/v%-os alacsony olvadáspontú (low melting point) agaróz (LMPA) volt. Amíg a tárgylemezeket az LMPA agarózba mártottuk, az oldatot 50 °C-os vízfürdőben tartottuk a megszilárdulás elkerülése érdekében. Minden minta esetében 10 µl sejtszuszpenziót és 75 µl 0,5 m/v%-os LMPA-t mértünk össze, majd a végtérfogat 70%-a került felvitelre a fedőrétegre, majd ezt fedőlemezzel lefedtük és 20 percig 4 °C-on tartottuk.
5. A sejtek lízisét 0,5x TBE pufferben oldott SDS-sel (nátrium-dodecil-szulfát) végeztük el. 1000 ml 0,5x TBE pufferben 25 g SDS-t oldottunk fel. Az elkészített tárgylemezeket 1 órán keresztül tartottuk a lízispufferben.
6. A lízist követően végeztük el az elektroforézist, amelynek során horizontálisan 5 V/cm elektromos télerősség mellett 5 percig történt az elválasztás. A tárgylemezeket ezt követően 5 percig desztillált vízzel mostuk, majd levegőn szárítottuk 1 órán keresztül.
7. A tárgylemezek festése etídium-bromiddal történt 10 percen keresztül. A festő oldat 3 µl/ml koncentrációjú etídium-bromid oldat volt. Az oldatból tárgylemezenként 100 µl-t használtunk fel. A festést követően a tárgylemezeket desztillált vízzel mostuk.
8. A tárgylemezek detektálása Nikon Eclipse 500 fluoreszcens mikroszkóppal, Peltier hűtött Olympus DP72 kamerával történt. Az alkalmazott objektív 20x nagyítással rendelkezett, vagyis a teljes nagyítás 200x volt.

9. A kapott képek kiértékelése OpenComet szoftverrel történt, ahol a képekről elmondható, hogy 1 pixel/2 μ m felbontásúak voltak. A statisztikai elemzést SPSS 14.0 szoftverrel végeztük.

4.3 Hús és hústermékek vizsgálatának specifikus módszertana

4.3.1 Minták

A vizsgálatba 18 állatfaj húsmintáját és 38 kereskedelmi forgalomban kapható hústerméket vontunk be. Az egyes mintákat 2 ml-es kriocsövekben, -20 °C-on tároltuk további felhasználásig. Az egyes minták származása vizuálisan lett megerősítve.

4.3.2 DNS izolálás

Húsok és hústermékek esetében a 4.1.2. pontban ismertetett De és mtsai. (2011) által leírt módon történt a DNS izolálása. A marhahúsból történő sertés eredetű hús, máj és zsír kimutatása esetében mitokondriális DNS izolálása történt meg Das et al. (2012) módszere alapján.

4.3.3 Alkalmazott primerek

A hús és hústermékek PCR-SSCP módszerrel történő elválasztásához elvégzett PCR reakciók során a 4.2.2. pontban bemutatott univerzális primerpárt alkalmaztuk. A marhahúsból történő sertés eredetű hús, máj és zsír kimutatása esetében az alkalmazott primerpárok adatait a 6. táblázat tartalmazza.

6. táblázat. A módszer során felhasznált primerek adatai

Faj (gén)	Primerek (forward/reverse)	Termékméret (bp)
Sertés, szarvasmarha (12S rRNS)	5'-ACTCTAAGGACTTGGCGGTG-3'	283
	5'-TTTACTGCTAAATCCTCCTT-3'	
Sertés, szarvasmarha (RYR1)	5'-AGACCTTCTCTTTGACCTTGAT-3'	329
	5'-CCAGACCTGGTGACATAGTTGA-3'	

4.3.4 Alkalmazott PCR reakciók specifikumai

A reakciók során felhasznált elegy összetétele a 4.1.4. pontban került ismertetésre. Az optimális anellálási hőmérséklet 62 °C-nak adódott. A primerek tulajdonságait a 7. táblázat foglalja magába.

7. táblázat. A PCR reakciók körülményei

Ciklus lépései	Hőmérséklet (°C)	Időtartam (perc)	Ciklusszám
Taq polimeráz aktiválása	95	1,5	1
Denaturálás	95	0,5	35
Anellálás	62	0,5	
Extenzió	72	0,5	
Végső lánchosszabítás	72	5	1

A PCR reakció sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

A PCR-SSCP módszert a 4.1.6. pontban ismertetett módon hajtottuk végre.

4.3.5 Sertés eredetű hús, máj és zsír kimutatása marhahúsban CE-SSCP módszerrel

Különböző sertés szöveteket használtunk fel vizsgálatunkhoz. 1, 5, 10, 20 m/m% arányban kevertünk sertés zsírt, májat és izmot (karaj) szarvasmarha húzával (8. táblázat). 1-4. mintákat kontrollként használtuk fel. A minták teljes tömege 100±1 mg volt. A minták homogenizálását Ultra Turrax T10 késes homogenizátorral végeztük.

8. táblázat. Élelmiszer minták és keverékeik a vizsgálat során

Minta	Összetevők	Minta	Összetevők
1	100% sertés szalonna	9	80% marha tarja 20% sertés máj
2	100% sertés máj	10	90% marha tarja 10% sertés máj
3	100% sertés karaj	11	95% marha tarja 5% sertés máj
4	100% marha tarja	12	99% marha tarja 1% sertés máj
5	80% marha tarja 20% sertés szalonna	13	80% marha tarja 20% sertés karaj
6	90% marha tarja 10% sertés szalonna	14	90% marha tarja 10% sertés karaj
7	95% marha tarja 5% sertés szalonna	15	95% marha tarja 5% sertés karaj
8	99% marha tarja 1% sertés szalonna	16	99% marha tarja 1% sertés karaj

A 12S rRNS és a rianodin receptor 1 (RYR1) gén szekvenciájára terveztünk primerpárt Primer3 szoftver segítségével. A módszer során alkalmazott primerek adatait a 9. táblázat tartalmazza.

9. táblázat. A módszer során felhasznált primerek adatai

Faj (gén)	Primerek (forward/reverse)	Termékméret (bp)
Sertés, szarvasmarha (12S rRNS)	5'-ACTCTAAGGACTTGGCGGTG-3'	283
	5'-TTTACTGCTAAATCCTCCTT-3'	
Sertés, szarvasmarha (RYR1)	5'-AGACCTTTCTCTTTGACCTTGAT-3'	329
	5'-CCAGACCTGGTGACATAGTTGA-3'	

Mivel a cél mitokondriális genomból származó gének vizsgálata volt, ezért a RYR1 génre tervezett primerek használatával tesztelhető volt a genomi DNS szennyezés.

A RYR1 génre tervezett primerekkel elvégzett PCR reakció körülményei és A 12S rRNS génre tervezett primerekkel elvégzett PCR reakciók körülményei 10 µl-re vonatkoztatva:

- 1x Dream Taq puffer (Fermentas, USA)
- 20 µM dNTP (Fermentas, USA)
- 4 mM MgCl₂ (Promega, USA)
- 2 pM FAM-jelölt forward primer (Sigma, Germany)
- 2 pM VIC-jelölt reverse primer (Sigma, Germany)
- 0,05 U Dream Taq polimeráz (Fermentas, USA) 1 U

Az alkalmazott PCR reakció lépései megegyeznek a 4.2.3. pontban leírt reakció lépéseivel.

4.4 Halfajok vizsgálatának specifikus módszertana

4.4.1 Minták

A vizsgálat során engedélyezett horgászatból és kereskedelmi forgalomból származó halmintákat vizsgáltunk. A vizsgálatban szerepelt szivárványos pisztráng, európai

harcsa, afrikai harcsa, ponty, ezüst kárász, karikakeszeg, dévérkeszeg, vörös szárnyú keszeg, küsz, bodorka, balin, razbóra, compó, fogassüllő és csuka. Minden mintát 2 ml-es kriocsövekben, -20 °C-on tároltunk a további felhasználásig.

4.4.2 DNS izolálás

Halfajok esetében a 4.1.2. pontban ismertetett De és mtsai. (2011) által leírt módon történt a DNS izolálása. A bomlásnak indult pontyból és légylárvákból történő DNS izolálás Geneaid Genomic DNA Mini Kit (Geneaid Biotech, Taiwan) segítségével zajlott.

4.4.3 Alkalmazott primerek

Az alkalmazott univerzális primerpár segítségével minden vizsgált halfaj esetében egy 160 bp nagyságú szakaszt tudunk felszaporítani.

Az alkalmazott univerzális primerek adatait a 10. táblázat tartalmazza.

10. táblázat. Univerzális primerek tulajdonságai halak esetében végzett fajazonosítás során

Primerek	Primerszekvencia	Termék-méret (bp)
Univerzális forward	5' – GTATTTGGTGCCTGAGC – 3'	160
Univerzális reverse	5' – GGGGGTAATTGGTATTACTATAAA – 3'	

4.4.4 Alkalmazott PCR reakciók specifikumai

A reakciók során felhasznált elegy összetétele a 4.1.4. pontban került ismertetésre. Az optimális anellálási hőmérséklet 58 °C-nak adódott. A primerek tulajdonságait a 11. táblázat foglalja magába.

11. táblázat. A PCR reakciók paraméterei

Ciklus lépései	Hőmérséklet (°C)	Időtartam (perc)	Ciklusszám
Taq polimeráz aktiválása	95	1,5	1
Denaturálás	95	0,5	35
Anellálás	58	0,5	
Extenzió	72	0,5	
Végső lánchosszabítás	72	5	1

A PCR reakció sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

A PCR-SSCP módszert a 4.1.6. pontban ismertetett módon hajtottuk végre.

4.4.5 PCR reakciók univerzális primerek felhasználásával – Csoportosított kimutatás

Az univerzális primerek tervezésének leírása során már utaltunk rá, hogy a halfajokat csoportokba rendezve is vizsgálni kívántuk, ezért csoportonként eltérő univerzális primerpárok tervezése történt meg. A megfelelő tapadási hőmérsékleteket hőmérséklet gradiens PCR reakciók során állapítottuk meg. Az két primerpár esetében a hőmérsékleti tartomány 49-60 °C között került beállításra. Az általunk tervezett primerpárok esetében a tapadási hőmérsékletek a következők voltak. Az 1. primerpár esetében 58 °C-nak, a 2. primerpár esetében 59 °C-nak adódtak az optimális tapadási hőmérsékletek.

A csoportonkénti kimutatás során alkalmazott primerpárok adatait a 12. táblázat foglalja magába. Az alkalmazott PCR reakció lépéseit a 13. táblázat mutatja be.

12. táblázat. Csoportosított kimutatás során használt primerek tulajdonságai

Faj (gén)	Primerek (forward/reverse)	Termékméret (bp)
Fogassüllő, kőssüllő (cytb)	5' – ACTAAAATTGCAAACAACG – 3'	411
	5' – CCTCAGATTTCATTGTACAAG – 3'	
Ponty, csuka, fogassüllő, ezüst kárász (cytb)	5' – ATGGCAAGCCTACGAAAAC – 3'	428
	5' – GCGCCTCAAAGGATATTTG – 3'	

13. táblázat. PCR reakció univerzális primerpárok alkalmazásával csoportosított kimutatás során

Ciklus lépései	Hőmérséklet (°C)	Időtartam (perc)	Ciklusszám
Taq polimeráz aktiválása	95	1,5	1
Denaturálás	95	0,5	35
Anellálás	58 / 59	0,5	
Extenzió	72	0,5	
Végső lánchosszabítás	72	5	1

A PCR-SSCP módszert a 4.1.6. pontban ismertetett módon hajtottuk végre.

4.4.6 Ponty DNS jelenlétének kimutatása bomlásnak indult halhúsból, illetve léglárvából

A fajazonosítási kimutatások során próbát tettünk arra vonatkozólag, hogy a rendelkezésünkre álló, már optimalizált pontyra specifikus primerpár alkalmazásával kimutassuk annak DNS-ét bomlásnak indult ponty hússzövetből, valamint a rothadt húson növekvő léglárvákból. A lárvák külseje a DNS izolálást megelőzően 70 V/V%-os etanollal lett lemosva, az esetleges szennyeződések elkerülése érdekében. A kimutatáshoz a halfajok csoportos kimutatása során használt 4. primerpárt használtuk fel, ami ponty kimutatására alkalmas.

A sikeres DNS izolálást követően a már korábban a 4.4.4. pontban leírt pontyra specifikus optimalizált primerpár alkalmazásával hajtottunk végre PCR reakciót. A PCR

reakció során felhasznált PCR mix összetétele megegyezik a 4.3.4 pontban ismertetett reakcióelegy összetételével.

4.4.7 Halfajok azonosítása kapilláris elektroforézis – egyszálú DNS konformáció polimorfizmus módszerrel (CE-SSCP)

A CE-SSCP módszer során a klasszikus gél alapú SSCP módszer során már elválasztott halfajokat vizsgáltuk. A vizsgálathoz szükséges DNS-t a PCR-SSCP módszer során alkalmazott minták jelentették. A DNS izolálása Geneaid Genomic DNA Mini Kit (Geneaid Biotech, Taiwan) segítségével történt, majd az egyes izolátumok koncentrációit NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) felhasználásával ellenőriztük.

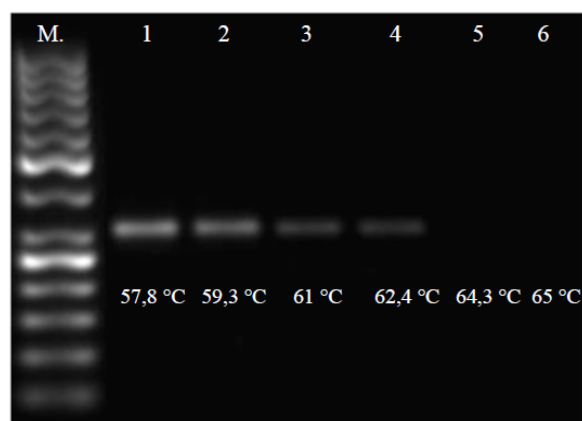
A kapilláris elektroforézist a 4.1.7. pontban leírtak alapján hajtottuk végre.

5 EREDMÉNYEK

5.1 Tej és tejtermékének vizsgálata PCR-SSCP módszerrel

5.1.1 Hőmérséklet grádiens PCR reakciók agaróz gélelektroforetikus eredményei

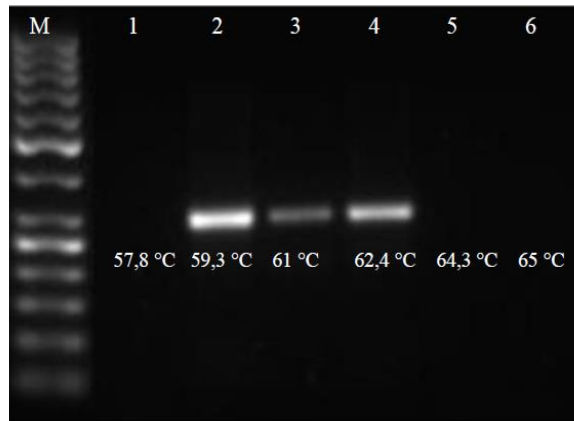
A hőmérséklet grádiens PCR reakciókat megelőzően bioinformatikai módszerek segítségével megterveztük a vizsgálathoz felhasználni kívánt univerzális primereket. Az illesztés eredménye alapján öt primer került kiválasztásra, négy forward és egy reverse primer. A megfelelő tapadási hőmérsékletet hőmérséklet grádiens PCR reakció alkalmazásával állapítottuk meg. A reakció során alkalmazott DNS templát tartalmazta mind a négy tejelő faj DNS-ét, a reakciót meghatározott hőmérsékleti tartományban 57,8 – 65 °C között hajtottuk végre. Az egyes reakciók eredményességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, a kapott sávmintázat alapján állapítottuk meg a tapadási hőmérsékletet, oly módon, hogy az mindegyik primerpár számára alkalmas legyen. A négy primerpár esetében az optimális tapadási hőmérséklet 60 °C-nak adódott. A hőmérsékleti grádiens értékei a következők voltak: 57,8 °C; 59,3 °C; 61 °C; 62,4 °C; 64,3 °C; 65 °C. Ezek közül 61 °C-os értéknél már jól láthatóan gyengébb intenzitású sávot kaptunk, mint 59,3 °C értéknél. Az univerzális primerpárokkal végzett hőmérséklet grádiens PCR reakció eredményeit a következő négy ábrán mutatjuk be. A 8. ábra az R-F1 primerpárral végzett hőmérsékleti optimalizálás eredményét mutatja be.



8. ábra: Az R-F1 univerzális primerpár DNS mintázata

M: 50bp-os DNS-marker; 1-6. minta: szarvasmarha/bivaly/juh/kecske genomi DNS mix hőmérséklet grádiens PCR eredménye 57,8-65 °C tartományban az R-F1 primerpárral

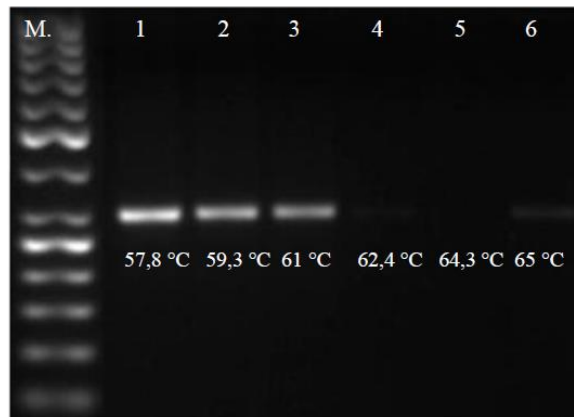
Az R-F2 jelzéssel ellátott primerpárral is elvégzett optimalizálás eredményét a 9. ábra mutatja be.



9. ábra: Az R-F2 univerzális primerpár DNS mintázata

M: 50bp-os DNS-marker; 1-6. minta: szarvasmarha/bivaly/juh/kecske genomi DNS mix hőmérséklet grádiens PCR eredménye 57,8-65 °C tartományban az R-F2 primerpárral

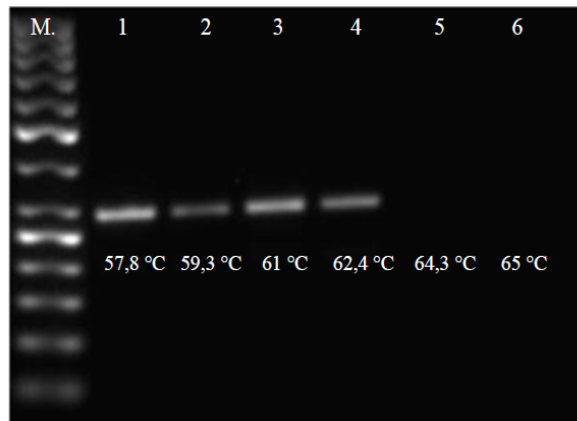
A 10. ábra a harmadik, R-F3 primerpárral végzett optimalizálás eredményét mutatja be.



10. ábra: Az R-F3 univerzális primerpár DNS mintázata

M: 50bp-os DNS-marker; 1-6. minta: szarvasmarha/bivaly/juh/kecske genomi DNS mix hőmérséklet grádiens PCR eredménye 57,8-65 °C tartományban az R-F3 primerpárral

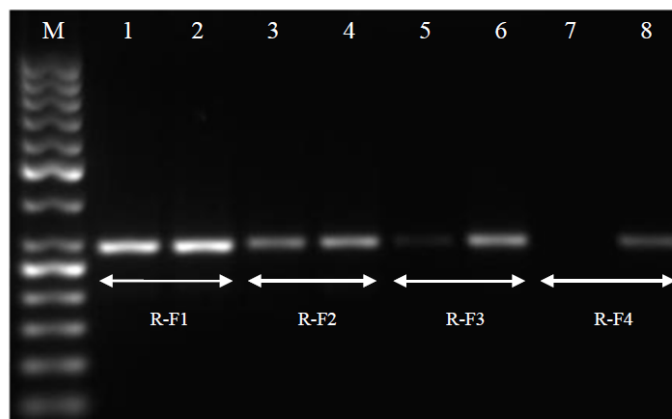
A negyedik reakció során az R-F4 jelzésű primerpár optimalizálása történt, aminek eredményét a 11. ábra szemlélteti.



11. ábra: Az R-F4 univerzális primerpár DNS mintázata

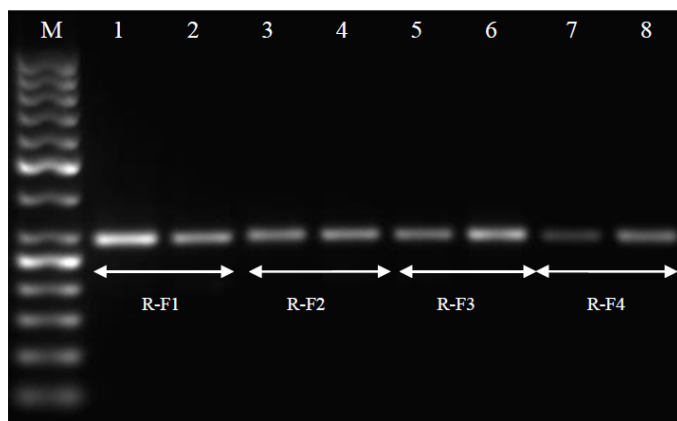
M: 50bp-os DNS-marker; 1-6. minta: szarvasmarha/bivaly/juh/kecske genomi DNS mix hőmérséklet grádiens PCR eredménye 57,8-65 °C tartományban az R-F4 primerpárral

A kiválasztott 60 °C-os anellálási hőmérsékleten a továbbiakban a primerpárokat külön-külön teszteltük az egyes fajok DNS-évek, valamint egy reakció szintén tartalmazta mind a négy faj DNS-ét. Az elvégzett reakciók bizonyították, hogy a tervezett primerpárok 60 °C-os anellálási hőmérsékleten alkalmasak voltak mind a négy faj DNS templátjának felhasználásával PCR termék előállítására. A vonatkozó eredményeket a 12. - 16. ábrák mutatják be. A 12. ábra a szarvasmarha, a 13. a bivaly, a 14. ábra a juh, a 15. ábra a kecske, míg a 16. ábra a négy faj DNS-ével végzett reakció eredményét mutatja be.



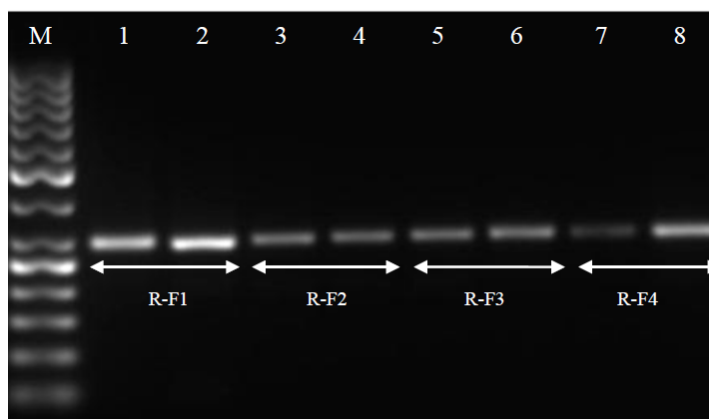
12. ábra: Az univerzális primerpárok tesztelése szarvasmarha DNS-sel 60 °C-on.

M: 50 bp-os DNS marker; szarvasmarha genomi DNS tesztelése az 1-2. mintában az R-F1 , a 3-4. mintában az R-F2, az 5-6. mintában R-F3, és a 7-8. mintában az R-F4 primerpárral



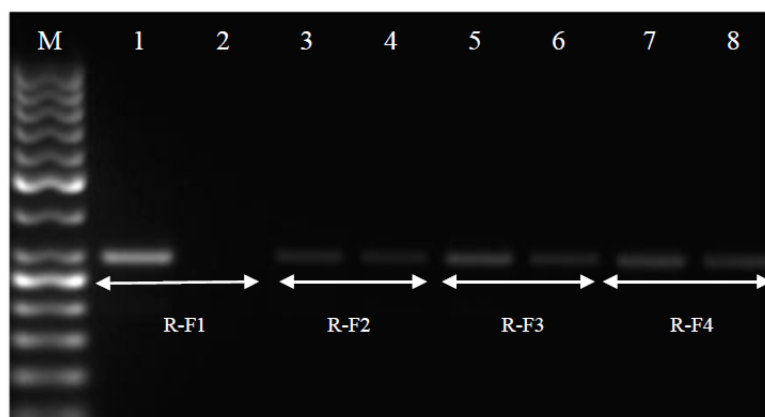
13. ábra: Az univerzális primerpárok tesztelése bivaly DNS-sel 60 °C-on.

M: 50 bp-os DNS marker; bivaly genomi DNS tesztelése az 1-2. mintában az R-F1 , a 3-4. mintában az R-F2, az 5-6. mintában R-F3, és a 7-8. mintában az R-F4 primerpárral



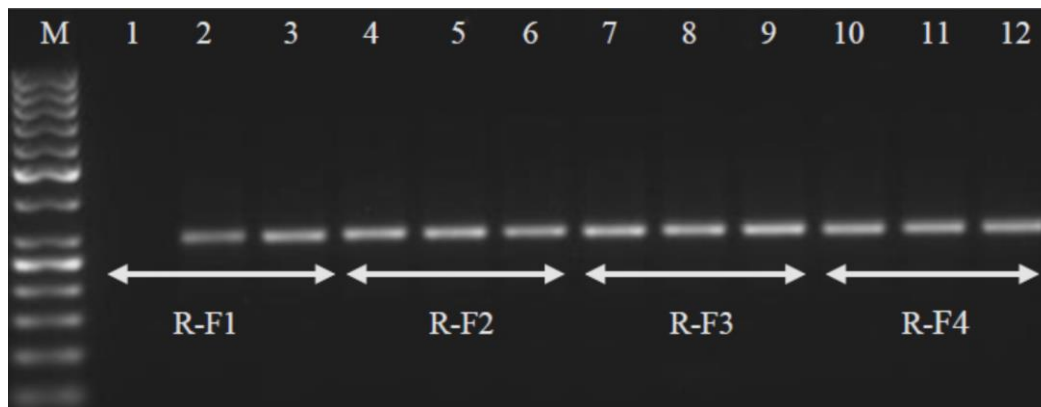
14. ábra: Az univerzális primerpárok tesztelése juh DNS-sel 60 °C-on.

M: 50 bp-os DNS marker; juh genomi DNS tesztelése az 1-2. mintában az R-F1 , a 3-4. mintában az R-F2, az 5-6. mintában R-F3, és a 7-8. mintában az R-F4 primerpárral



15. ábra: Az univerzális primerpárok tesztelése kecske DNS-sel 60 °C-on.

M: 50 bp-os DNS marker; kecske genomi DNS tesztelése az 1-2. mintában az R-F1 , a 3-4. mintában az R-F2, az 5-6. mintában R-F3, és a 7-8. mintában az R-F4 primerpárral

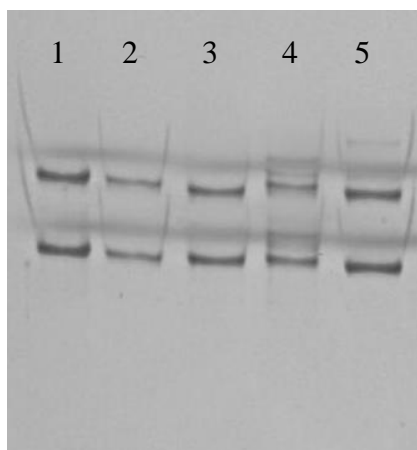


16. ábra: Az univerzális primerpárok tesztelése kecske, juh, bivaly és szarvasmarha kevert DNS-ével 60 °C-on

M: 50 bp-os DNS marker; kecske, juh, bivaly és szarvasmarha genomi DNS együttes tesztelése az 1-3. mintában az R-F1 , a 4-6. mintában az R-F2, az 7-9. mintában R-F3, és a 10-12. mintában az R-F4 primerpárral

5.1.2 PCR-SSCP vizsgálatok poliakrilamid gélelektroforetikus eredményei

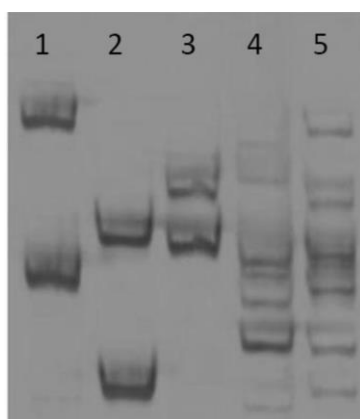
A primerpárok működésének optimalizálását követően az R-F1 kóddal ellátott primerpárt választottuk ki további vizsgálataink kivitelezéséhez, mivel ez volt az a primerpár, ami minden beállítás során működőképesnek bizonyult. Ezt követően PCR reakciókat állítottunk össze az optimalizált univerzális primerek alkalmazásával. A PCR reakció során 5 mintát vizsgáltunk, egy szarvasmarha, egy bivaly, egy juh, egy kecske és egy, a négy faj DNS-ét templátként alkalmazó minta került összeállításra. Mielőtt a mintákat SSCP analízishez előkészítettük volna, a PCR reakció eredményességét agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztük. A PCR reakció sikerességét igazoló agaróz gélelektroforézis eredmények ismeretében a mintáinkat előkészítettük SSCP vizsgálathoz. A tervezett és optimalizált R-F1 univerzális primerpár alkalmazásával sikerült PCR-SSCP során a négy fajt egyértelműen elválasztani poliakrilamid gélelektroforézissel. Az elválasztás eredményét a 18. ábrán mutatjuk be. A sikeres elválasztás +4°C-on vált lehetővé, ezt megelőzően szobahőmérsékleten végzett elválasztás nem eredményezett eltérő sávmintázatokat (17. ábra).



17. ábra: Univerzális primerpárral végrehajtott PCR-SSCP vizsgálat eredménye.

Alkalmazott elektroforetikus paraméterek: +20°C, 400V, 8h..

Az R-F1 univerzális primerpár PCR-SSCP mintázata az 1. mintában szarvasmarha, a 2. mintában bivaly, a 3. mintában juh, a 4. mintában kecske genomi DNS-sel, valamint az 5. mintában szarvasmarha/bivaly/juh/kecske genomi DNS-sel



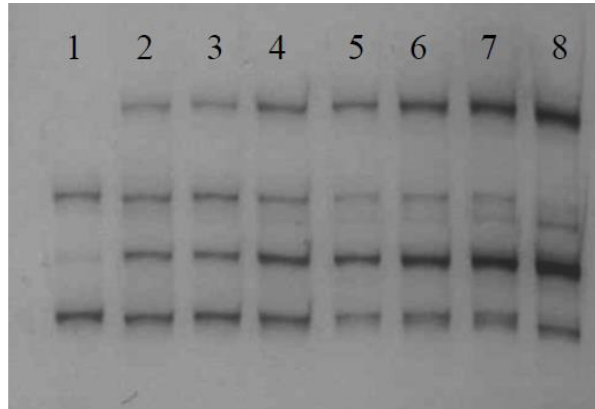
18. ábra: Univerzális primerpárral végrehajtott PCR-SSCP vizsgálat eredménye.

Alkalmazott elektroforetikus paraméterek: +4°C, 400V, 8h.

Az R-F1 univerzális primerpár PCR-SSCP mintázata az 1. mintában szarvasmarha, a 2. mintában bivaly, a 3. mintában juh, a 4. mintában kecske genomi DNS-sel, valamint az 5. mintában szarvasmarha/bivaly/juh/kecske genomi DNS-sel

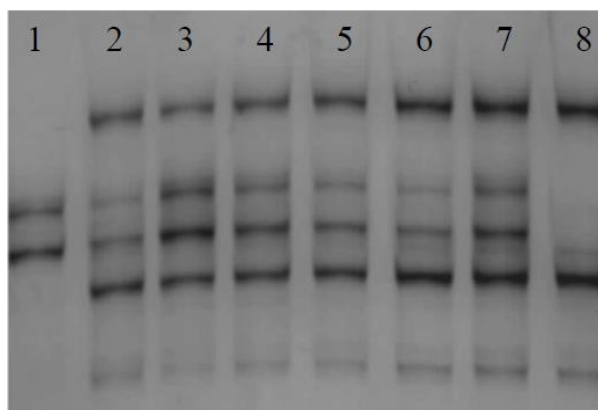
Az ábrán egyértelműen látható, hogy a négy faj esetében specifikus sávmintázat alakult ki, valamint a négy faj DNS-ét egy mintában vizsgálva is megtalálhatók a fajokra jellemző sávok. Mindez bizonyítja, hogy a módszerrel lehetőség nyílik a fajok elkülönítésére ismeretlen összetételű minták esetében is. Ennek az eredménynek az ismeretében olyan kísérleti beállításokat terveztünk, amelyek során megegyező koncentrációjú DNS templátokat kevertünk össze meghatározott térfogatszázalékos arányokban. A beállítások során minden sorozatban két pozitív kontroll minta szerepelt,

amelyek közül az egyik a szarvasmarha DNS-ét 100 V/V%-ban tartalmazta, a másik minta szintén 100 V/V%-ban tartalmazta rendre a juh, kecske és bivaly fajok DNS-ét. A keverési sorozat 50 V/V%, 40 V/V%, 30 V/V%, 20 V/V%, 10 V/V% és 5 V/V% szarvasmarha DNS-t tartalmazó mintákból és két pozitív kontrollból tevődött össze. A 19.-21. ábrákon a keverési sorozatokkal elvégzett PCR-SSCP vizsgálatok eredményeit mutatjuk be.



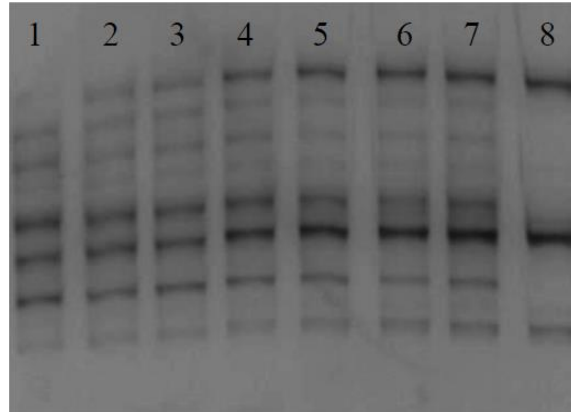
19. ábra: Szarvasmarha és bivaly DNS keverékeivel végzett poliakrilamid gélelektroforézis 5 V/V% - 50 V/V% tartományban. Alkalmazott elektroforetikus paraméterek: +4°C, 400V, 8h.

Az 1. mintában 100 V/V% bivaly DNS, a 2. mintában 5 V/V% szarvasmarha és 95 V/V% bivaly DNS, a 3. mintában 10 V/V% szarvasmarha és 90 V/V% bivaly DNS, a 4. mintában 20 V/V% szarvasmarha és 80 V/V% bivaly DNS, az 5. mintában 30 V/V% szarvasmarha és 70 V/V% bivaly DNS, a 6. mintában 40 V/V% szarvasmarha és 60 V/V% bivaly, a 7. mintában 50 V/V% szarvasmarha és 50 V/V% bivaly DNS, a 8. mintában 100 V/V% szarvasmarha DNS által adott sávok láthatóak.



20. ábra: Szarvasmarha és juh DNS keverékeivel végzett poliakrilamid gélelektroforézis 5 V/V% - 50 V/V% tartományban. Alkalmazott elektroforetikus paraméterek: +4°C, 400V, 8h.

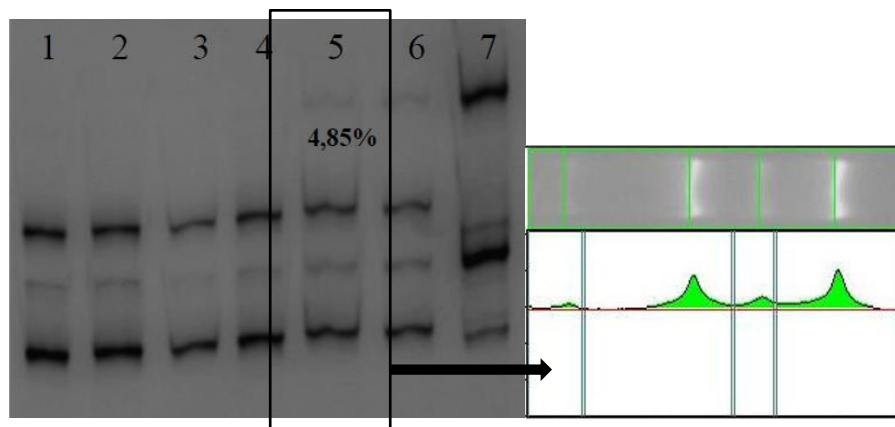
Az 1. mintában 100 V/V% juh DNS, a 2. mintában 5 V/V% szarvasmarha és 95 V/V% juh DNS, a 3. mintában 10 V/V% szarvasmarha és 90 V/V% juh DNS, a 4. mintában 20 V/V% szarvasmarha és 80 V/V% juh DNS, az 5. mintában 30 V/V% szarvasmarha és 70 V/V% juh DNS, a 6. mintában 40 V/V% szarvasmarha és 60 V/V% juh, a 7. mintában 50 V/V% szarvasmarha és 50 V/V% juh DNS, a 8. mintában 100 V/V% szarvasmarha DNS által adott sávok láthatóak.



21. ábra: Szarvasmarha és kecske DNS keverékeivel végzett poliakrilamid gélelektroforézis 5 V/V% - 50 V/V% tartományban. Alkalmazott elektroforetikus paraméterek: +4°C, 400V, 8h.

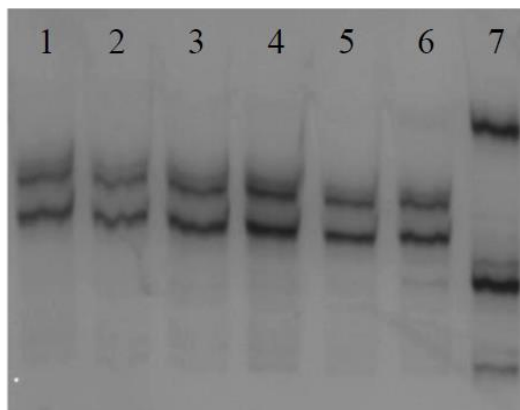
Az 1. mintában 100 V/V% kecske DNS, a 2. mintában 5 V/V% szarvasmarha és 95 V/V% kecske DNS, a 3. mintában 10 V/V% szarvasmarha és 90 V/V% kecske DNS, a 4. mintában 20 V/V% szarvasmarha és 80 V/V% kecske DNS, az 5. mintában 30 V/V% szarvasmarha és 70 V/V% kecske DNS, a 6. mintában 40 V/V% szarvasmarha és 60 V/V% kecske, a 7. mintában 50 V/V% szarvasmarha és 50 V/V% kecske DNS, a 8. mintában 100 V/V% szarvasmarha DNS által adott sávok láthatóak.

A fentebb bemutatott eredmények ismeretében megállapíthatjuk, hogy 5 V/V% keverési arány esetében mindhárom sorozat esetében egyértelműen kimutatható volt a szarvasmarha faj jelenléte. Emiatt a szarvasmarha jelenlétének százalékos arányát tovább csökkentettük. 5 V/V%, 3 V/V%, 1 V/V%, 0,5 V/V% és 0,1 V/V% arányban tartalmaztak a minták szarvasmarha DNS-t a másik faj DNS-éhez viszonyítva, így ismét három keverési sorozatot vizsgáltunk meg. Ennek eredményeképpen a három keverési sorozat közül a bivaly-szarvasmarha keverés esetében 3 V/V%, míg a juh és a kecske keverés esetében 5 V/V%-nak adódott a módszer kimutatási határértéke. A kapott gélképeken látható sávmintázatokat Uvipro Platinum (Uvitec) szoftver segítségével kvantitáltuk, megállapítottuk a sávok intenzitásértékeit. Itt kell megjegyezni, hogy a kapott értékek nem arról adnak információt, hogy a szarvasmarha DNS milyen arányban volt jelen adott mintában, a szoftver azt mutatja meg, hogy melyik mintában volt jelen a szarvasmarha DNS. A vizsgálat eredményeit a 22.-24. ábrán mutatjuk be.



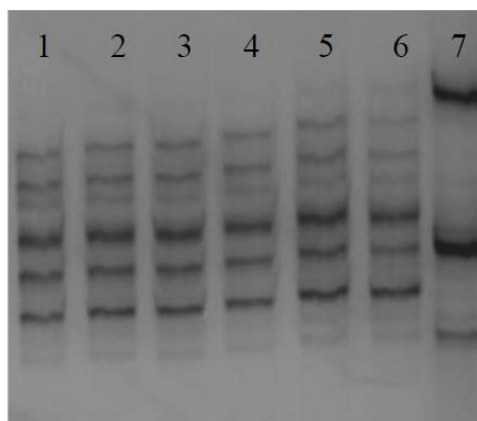
22. ábra: Szarvasmarha és bivaly kevert DNS-ével végzett poliakrilamid gélelektroforézis eredménye 0,1 V/V% - 5 V/V% tartományban. Alkalmazott elektroforetikus paraméterek: +4°C, 400V, 8h.

Az 1. mintában 100 V/V% bivaly DNS, a 2. mintában 0,1 V/V% szarvasmarha és 99,9 V/V% bivaly DNS, a 3. mintában 0,5 V/V% szarvasmarha és 99,5 V/V% bivaly DNS, a 4. mintában 1 V/V% szarvasmarha és 99 V/V% bivaly DNS, az 5. mintában 3 V/V% szarvasmarha és 97 V/V% bivaly DNS, a 6. mintában 5 V/V% szarvasmarha és 95 V/V% bivaly DNS, a 7. mintában 100 V/V% szarvasmarha DNS által adott sávok láthatóak.



23. ábra: Szarvasmarha és juh kevert DNS-ével végzett poliakrilamid gélelektroforézis eredménye 0,1 V/V% - 5 V/V% tartományban. Alkalmazott elektroforetikus paraméterek: +4°C, 400V, 8h.

Az 1. mintában 100 V/V% juh DNS, a 2. mintában 0,1 V/V% szarvasmarha és 99,9 V/V% juh DNS, a 3. mintában 0,5 V/V% szarvasmarha és 99,5 V/V% juh DNS, a 4. mintában 1 V/V% szarvasmarha és 99 V/V% juh DNS, az 5. mintában 3 V/V% szarvasmarha és 97 V/V% juh DNS, a 6. mintában 5 V/V% szarvasmarha és 95 V/V% juh DNS, a 7. mintában 100 V/V% szarvasmarha DNS által adott sávok láthatóak.



24. ábra: Szarvasmarha és kecske kevert DNS-ével végzett poliakrilamid gélelektroforézis eredménye 0,1 V/V% - 5 V/V% tartományban. Alkalmazott elektroforetikus paraméterek: +4°C, 400V, 8h.

Az 1. mintában 100 V/V% kecske DNS, a 2. mintában 0,1 V/V% szarvasmarha és 99,9 V/V% kecske DNS, a 3. mintában 0,5 V/V% szarvasmarha és 99,5 V/V% kecske DNS, a 4. mintában 1 V/V% szarvasmarha és 99 V/V% kecske DNS, az 5. mintában 3 V/V% szarvasmarha és 97 V/V% kecske DNS, a 6. mintában 5 V/V% szarvasmarha és 95 V/V% kecske DNS, a 7. mintában 100 V/V% szarvasmarha DNS által adott sávok láthatóak.

A fenti vizsgálatokkal célunk volt annak megállapítása, hogy a tervezett primerpár felhasználásával PCR-SSCP vizsgálat során milyen érzékeny érhető, azaz a módszer milyen arányban képes kimutatni a szarvasmarha faj jelenlétét a juh, kecske és bivaly fajokkal szemben. Két keverési aránnyal rendelkező sorozatot vizsgáltunk, az 5 V/V% - 50 V/V% közötti keverési sorozat esetében mindegyik arány tekintetében, mind a három fajjal szemben kimutatható volt a szarvasmarha jelenlét. Mivel ebben a sorozatban a legalacsonyabb, 5 V/V% arányú keverések esetében is megjelent a szarvasmarhára jellemző fajspezifikus mintázat, ezért 5 V/V% alatti keverési arányú sorozatokat is beállítottunk. Ezek vizsgálatával megállapítottuk, hogy a bivaly-szarvasmarha keverési sorozat esetében 3 V/V% volt a kimutatási határ, míg a másik két faj esetében ez 5 V/V%-nak adódott, 5 V/V% alatti arányok esetében nem lehetett szarvasmarha specifikus sávmintázat kimutatása. Ezeket az eredményeket szoftveres módon is megerősítettük, ahol a szoftver a jelenlévő szarvasmarha specifikus sáv intenzitásértékét 4,85 %-ban határozta meg a teljes oszlop intenzitásértékéhez viszonyítva. Ezt az intenzitásértéket a 22. ábra 5. oszlopában is feltüntettük.

A módszer érzékenységét és kimutatási határának megállapítását követően a PCR-SSCP technika alkalmazhatóságát kereskedelmi forgalomban kapható sajtermékeken teszteltük. A sajtokból történő DNS izolálás után univerzális primerpárt alkalmazó PCR reakcióban szaporítottuk fel a 12S rRNS gén meghatározott szakaszát, majd végeztük el az SSCP analízist. A vizsgálat során 39 magyarországi, 15 svájci és 66 boszniai, összesen 120 kereskedelmi forgalomból származó sajtot vetettünk alá PCR-SSCP módszerrel történő elemzésnek. A 120 minta esetében a címkézést figyelembe véve 66 terméket juhsajtként árusítottak, 18 esetben tehéntejből készült termékről volt szó, 22 termék a címkézés alapján kecsketejet tartalmazott, 13 esetben juh és tehéntej együttes használatát vallották be, míg egyetlen esetben kecske és tehéntej együttes jelenléte volt feltüntetve a termék címkézésén. Az egyes termékekre vonatkozó adatokat és a PCR-SSCP módszerrel azonosított fajokat a 16. táblázatban foglaltuk össze.

16. táblázat. Kereskedelmi sajtok eredményei PCR-SSCP elválasztást követően

Jelölt faj	Sajtminták száma	PCR-SSCP módszer kimutatott fajok
Juh	66	39 juh 15 juh + szarvasmarha 12 szarvasmarha
Szarvasmarha	18	18 szarvasmarha
Kecske	22	7 kecske + szarvasmarha 15 kecske
Juh + szarvasmarha	13	11 juh + szarvasmarha 1 juh 1 szarvasmarha
Kecske + szarvasmarha	1	1 kecske + szarvasmarha

A vizsgálatba vont 120 kereskedelmi sajt közül 36 esetben volt egyértelműen azonosítható a termék címkézésén nem jelölt faj jelenléte, ami pontosan 30%-os arányt jelent. 66 juhsajt közül 27 esetben bizonyítottuk be nem vallott faj jelenlétét, ami 40,9%-os arány. 22 kecskesajt közül 7 volt olyan termék, amiben be nem vallott

összetevőt is detektálni lehetett ez 31,82%-os arányt jelent. 13 juh-szarvasmarha termék közül 2 esetben volt kimutatható eltérés, ami 15,38%-os eltérést jelent. Ez alapján láthatjuk, hogy a legnagyobb arányú eltérés a juhsajtként forgalmazott termékek esetében volt kimutatható. A 66 juhsajt közül 12 esetben kizárólag szarvasmarha jelenlétét detektáltuk, azonban ez nem jelenti azt, hogy ezekben nem lehetett jelen juh DNS, csak azt, hogy az adott kimutatási érzékenység mellett a juh jelenléte nem volt kimutatható. A termékek gyártásához használt tejek szomatikus sejtszáma befolyásolhatja azt, hogy az adott faj mennyire sikeresen mutatható ki.

5.2 Duplex-PCR reakció juh-szarvasmarha DNS keverékek esetében – kvantitatív kimutatási lehetőségek vizsgálata

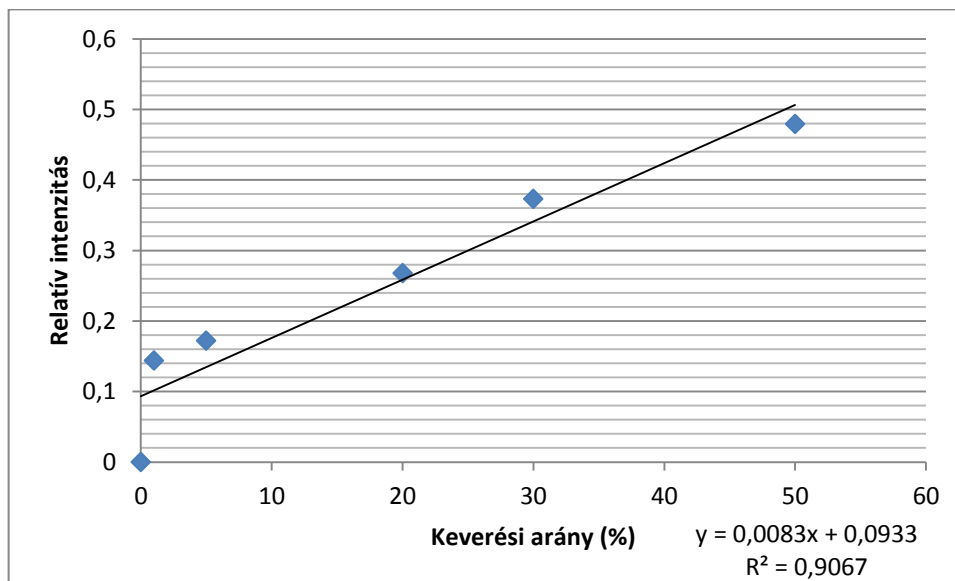
Meghatározott arányban kevert és azonos koncentrációjú juh és szarvasmarha DNS-eket használtunk egy olyan kalibrációs egyenlet felállításához, amelynek használata lehetőséget adna kereskedelmi forgalomban kapható sajtok esetében arra, hogy becsülni tudjuk az ezekben a termékekben lévő szarvasmarha DNS mennyiségét.

A keverési sorozatok 0,1V/V%-40V/V% tartományban tartalmazták a szarvasmarha DNS-ét juh DNS-ével szemben. A kalibrációs egyenlet meghatározásához a keverési sorozatokkal elvégzett PCR reakciókat 5 ismétlésben hajtottuk végre, minden esetben meghatároztuk az egyes sávok egymáshoz viszonyított sávintenzitását, majd a következő képlet alapján meghatároztuk minden egyed keverési arányhoz tartozó relatív intenzitás értékeit.

$$\frac{I_{szarvasmarha}}{I_{szarvasmarha} + I_{juh}} = \text{Relatív intenzitás}$$

A relatív intenzitás értékeinek megadására szolgáló képlet

Meghatároztuk az relatív intenzitás értékek átlagait. A kalibrációs egyenlet megalkotásához az átlagos relatív intenzitás értékek és a hozzájuk tartozó keverési arányokat vettük figyelembe, így az ábrázolás során lineáris trendvonal alkalmazása mellett kaptuk meg a kalibrációs egyenletet. A kalibrációs egyenletet a LabWorks 4.0 (UVP, USA) szoftver által mért sávintenzitás értékek alapján számítottuk ki. A LabWorks 4.0 esetében az eredményeket a program arányszámokként adja meg.



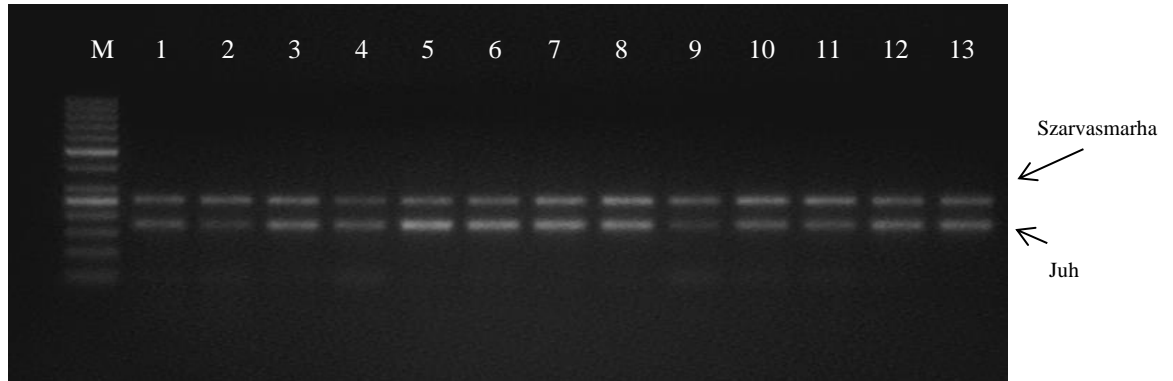
25. ábra. A relatív intenzitás értékek és a keverési arányok lineáris skálán való ábrázolása LabWorks 4.0 program által számolt értékek alapján. Az x tengely mentén a keverési arányok értékei, míg az y tengely mentén a relatív intenzitás értékei helyezkednek el.

A 25. ábrán a LabWorks 4.0 szoftver segítségével számolt értékek alapján történt a kalibrációs egyenlet meghatározása. A kapott kalibrációs egyenlet $y=0,0083x+0,0933$ alakban írható fel, a hozzátartozó determinációs együttható (r^2) értéke 0,9067, ami erős statisztikai kapcsolatot feltételez a két változó között.

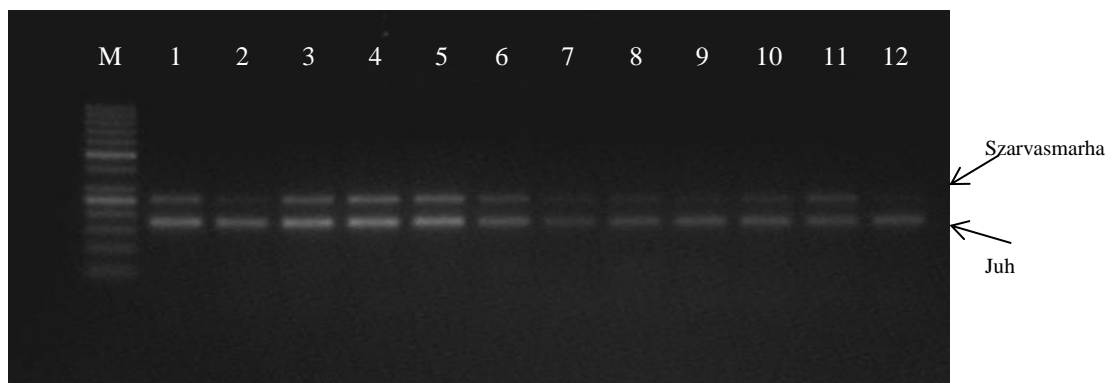
A kalibrációs egyenlet létrehozását követően 25, kereskedelmi forgalomból származó korábbi vizsgálatok által bizonyítottan juh és szarvasmarha DNS-t is tartalmazó sajtot vizsgáltuk meg duplex-PCR reakcióban. Az agaróz gélelektroforézist követően megtörtént az egyes sávok intenzitásának mérése, a relatív intenzitás értékeinek meghatározása, majd a kalibrációs egyenlet alapján az egyes sajtokban lévő szarvasmarha DNS jelenlétének %-os arányban történő becslése.

A determinációs együttható (r^2) értéke a LabWorks 4.0 szoftver esetében 0,9067 volt, ami erős statisztikai kapcsolatra utal a két változó tekintetében. A LabWorks 4.0 programmal végzett kiértékelés eredményeképpen a 25 sajt esetében a szarvasmarha DNS százalékos aránya 4,68% és 77,68% között változott.

Továbbá ezeket az eredményeket támasztja alá az agaróz gélelektroforézis eredménye, amelyen látható, hogy a megfigyelhető DNS sávok szubjektíven megállapítható erőssége követi a becsült intenzitás értékek mértékét (26-27. ábra).



26. ábra. Az ábrán a kvantitatív kimutatás vizsgálatba vont 25 juh és szarvasmarha DNS-t tartalmazó minta közül figyelhető meg az 1-13. minta agaróz gélelektroforetikus eredménye. M: 50 bp létra.

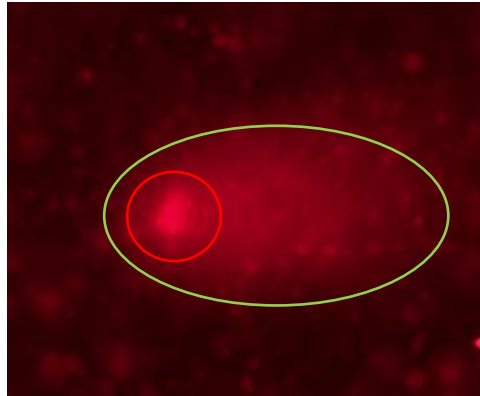


27. ábra. Az ábrán a kvantitatív kimutatás vizsgálatba vont 25 juh és szarvasmarha DNS-t tartalmazó minta közül figyelhető meg az 14-25. minta agaróz gélelektroforetikus eredménye. M: 50 bp létra.

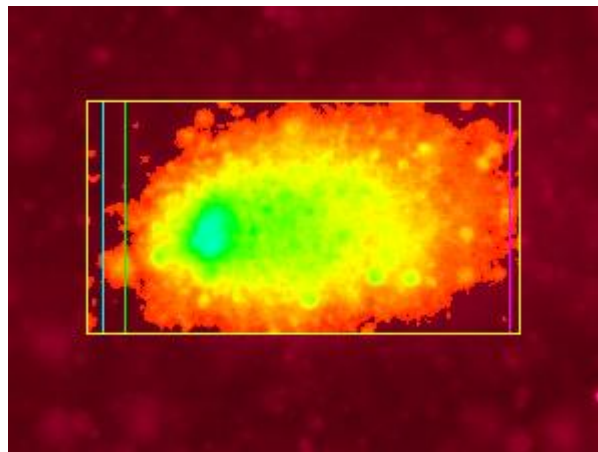
5.3 Üstökös gélelektroforézis

Az üstökös gélelektroforézis a sejtekben található DNS degradáltóságának mérésére szolgáló módszer. Jelen esetben a módszert hosszabb ideig érlelt sajtok vizsgálatára alkalmaztuk, amelynek során kontrollként friss tejet használtunk fel. Az eredményeinket a fluoreszcens mikroszkópia során kapott képek szolgáltatták. A tárgylemezek festése etídium-bromiddal történt. Ezeknek a képeknek az elemzése ImageJ 1.47 szoftver OpenComet kiegészítőjével (NIH, USA) történt. A kiértékelés során a szoftver minden

minta esetében detektálta az egyes sejteket és a körülöttük elhelyezkedő csóvákat, majd mérte a feji rész és a csóva rész egymáshoz viszonyított %-os arányát. A 28. ábrán egy kompakt csóva figyelhető meg.



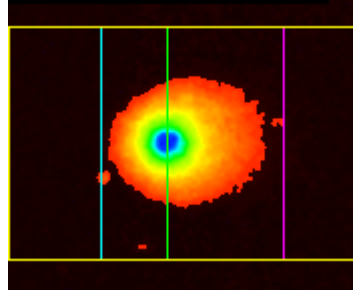
28. ábra. Egy jellegzetes comet alakzat üstökös gélelektroforézis után fluoreszcencia mikroszkópban. Pirossal jelölve a sejtmagi DNS, zölddel az elektroforézis során képződött csóva látható.



29. ábra. A 28. ábrán látható csóva alakzat képe Comet4 szoftverrel ábrázolva. A sejtmagi DNS kékes, zöldes árnyalatú színnel jelölődik, míg a degradáltabb részek sárgás, vöröses árnyalatban jelennek meg.

Vizsgálataink kezdetén azt vártuk, hogy a frissen fejt tejből végzett üstökös gélelektroforézis eredményeként kevésbé diffúz csóvákat kapunk a fluoreszcencia mikroszkópiás képalkotás során, míg a 6, 8, 10 és 18 hónapig érlelt sajtok esetében vagy nagyon diffúz csóvák megjelenését vagy a csóvák hiányát vártuk a hosszú érlelési időtartam miatt.

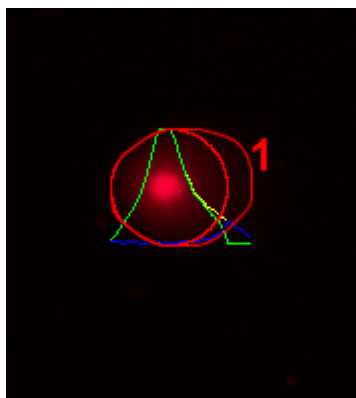
A 29-30. ábrán friss tejből elvégzett üstökös gélelektroforézis eredménye figyelhető meg. Jól látható, hogy a sejtmagi DNS még kompakt formában jelenik meg, a csóva képződés kismértékű.



30. ábra. Egy kompakt csóva CometIV szoftverrel detektált képe frissen fejt tejminta esetében.

A fenti ábrán látható csóvához tartozó paraméterek közül, amelyeket a szoftver automatikusan generál, a feji rész és a csóva rész értékeit vettük figyelembe. Ebben az esetben az adott csóvához tartozó feji rész aránya 79,89%, míg a csóva rész 20,11%. Ezek az értékek az adott sejt genetikai anyagának kevésbé degradált állapotára utalnak, mivel a sejtmagi DNS kompakt jellegét jelzi a 79,89%-os érték, ezzel szemben a csóvához tartozó érték jelentősen kisebb.

Ugyanezt a sejtet megvizsgálva ImageJ 1.47 OpenComet kiegészítőjével a szoftver alapján a feji részre vonatkozó arány 77,79%, míg a csóva aránya 22,21% (31. ábra). Ebben az esetben is látható, hogy a csóvára vonatkozó érték messze elmarad a feji részre vonatkozó értéktől. Az arányokat összesen 85 sejtre határoztuk meg OpenComet szoftverrel, aminek eredményeképpen megállapítottuk, hogy a feji rész aránya 57,55 – 98,98%-os arányok között változott, míg a csóva rész aránya 1,02 – 42,45%-os arányok között változott. A feji részre vonatkozó arányok átlaga 80,72%, a hozzátartozó szórás értéke 11,77. A csóva részre vonatkozó arányok átlaga 18,39%, a hozzátartozó szórás értéke 11,77.



31. ábra. Egy kompakt csóva ImageJ 1.47 OpenComet szoftverrel detektált képe frissen fejt tejminta esetében.

Ugyanakkor a 6, 8, 10 és 18 hónapig érlelt sajtok esetében nem volt megfigyelhető és értékelhető csóva képződés (32. ábra).



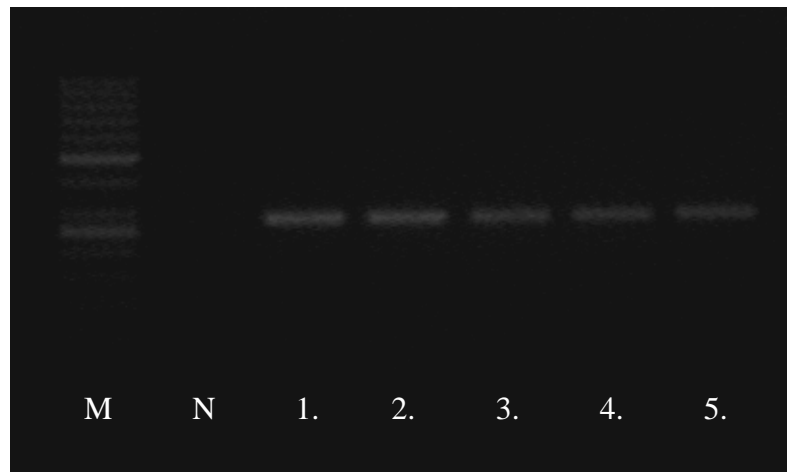
32. ábra. Az üstökös gélelektroforézis eredménye fluoreszcens mikroszkópiával detektálva 6 hónapig érlelt sajt esetében.

A képen látható, hogy comet képződés nem következett be, egységes diffúz háttér figyelhető meg etídium-bromiddal történő festést követően, ami a genom degradációját jelzi. Az ilyen esetekben kisebb méretű a háttérből kiemelkedő intenzitású pontok, foltok figyelhetőek meg, ezek kisebb DNS töredékek vagy bakteriális eredetű DNS darabok lehetnek.

Mivel az üstökös gélelektroforézis során az érlelt sajtok esetében nem volt megfigyelhető comet képződés, a DNS jelenlétének kimutatására univerzális

primerpárral elvégzendő PCR reakciót is összeállítottunk. Ebben az esetben a már korábban is alkalmazott 12S rRNS génre tervezett univerzális primerpárt használtuk fel.

Az 12S rRNS génre tervezett univerzális primerpárral minden az üstökös gélelektorforézis során vizsgált minta esetében amplifikálható volt a kérdéses DNS szakasz, ami azt jelzi, hogy a teljes genom ugyan már degradált formában van jelen, ugyanakkor kisebb méretű DNS szakaszok fennmaradtak, lehetőséget teremtve néhány száz bázispár nagyságú szakaszok felsokszorozására és így a PCR-SSCP módszerrel történő fajazonosítás kivitelezésére erősen degradált élelmiszerminták esetében is. A 33. ábrán a 12S rRNS univerzális primerpárral elvégzett PCR reakció eredménye figyelhető meg.

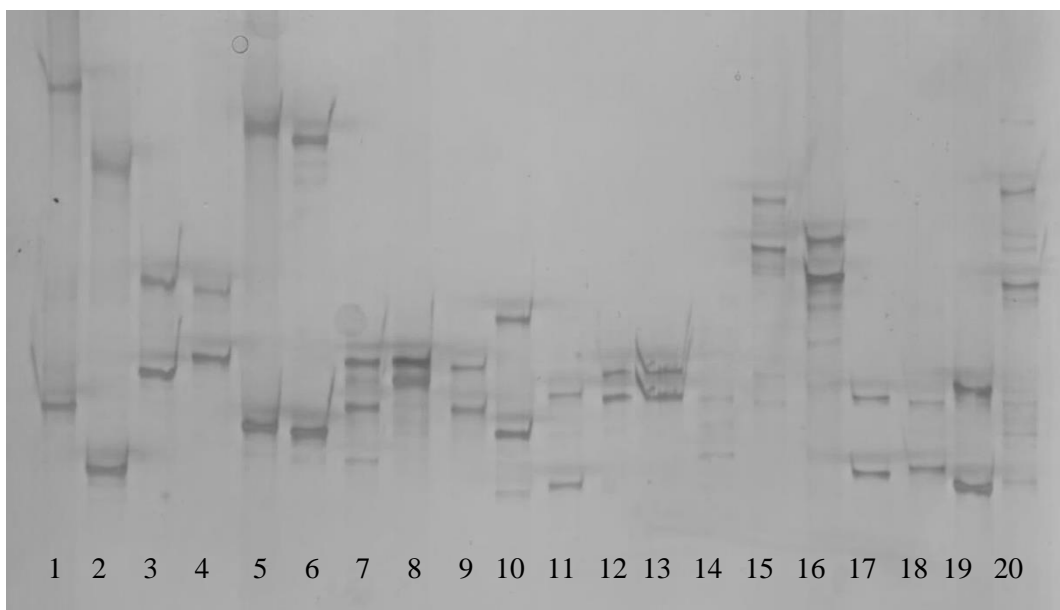


33. ábra. 12S rRNS univerzális primerpárral végzett PCR reakció agaróz gélelektroforetikus eredménye. M: 50 bp DNS létra; N: negatív kontroll; 1: frissen fejt tej; 2: 6 hónapig érlelt sajt; 3: 8 hónapig érlelt sajt; 4: 10 hónapig érlelt sajt; 5: 18 hónapig érlelt sajt.

5.4 Hús és hústermékek vizsgálata PCR SSCP metodika alkalmazásával

A hústermékekből történő fajazonosítás során 18 faj – köztük az ember – mitokondriális 12S rRNS gén szekvenciáját vizsgáltuk univerzális primerpár alkalmazásával PCR SSCP módszerrel. A vizsgálatba 7 baromfifaj, 5 emlős faj, 5 vadon élő állatfaj és az ember került bevonásra. Baromfifajok közül a házi galamb, házi tyúk, gyöngytyúk, pulyka, házi kacska, pézsmaréce, házi lúd került vizsgálatra; a háziasított emlős fajok közül a sertés, szarvasmarha, bivaly, juh, kecske, ló és a házi nyúl vett részt az elemzésben; vadon élő állatfajok közül vizsgáltuk a vaddisznó, muflon, őz, dámszarvas és gímszarvas fajok elválaszthatóságát. Az emberi DNS kimutatása a laboratóriumi munka szempontjából fontos tényező, ugyanis meghatározó egy fajazonosítási vizsgálat esetében, hogy a vizsgálatot végző személy ne szennyezze a vizsgálni kívánt DNS mintákat. Azonban a laboratóriumi munka szabályait betartva is előfordulhat a minták szennyeződése. A módszer alkalmas az emberi egyszálú DNS molekulák konformáció alapján történő elválasztására a többi fajtól, azonban emberi DNS jelenléte semmilyen esetben nem volt kimutatható a teljes vizsgálat folyamán.

A vizsgálatba vont 18 faj PCR SSCP-vel történő elkülönítése során megállapíthattuk, hogy a 18 faj esetében 17 elválasztható volt egymástól az egyszálú DNS konformációs különbségei alapján. Értékelhetően eltérő mintázatot, konformációs különbséget nem detektáltunk sem az azonos fajhoz tartozó juh-muflon minták esetében, sem a gím- és dámszarvas fajok között. A 18 faj PCR-SSCP vizsgálattal kapott eredménye, az egyes fajok specifikus mintázatait a 34. ábrán láthatóak.



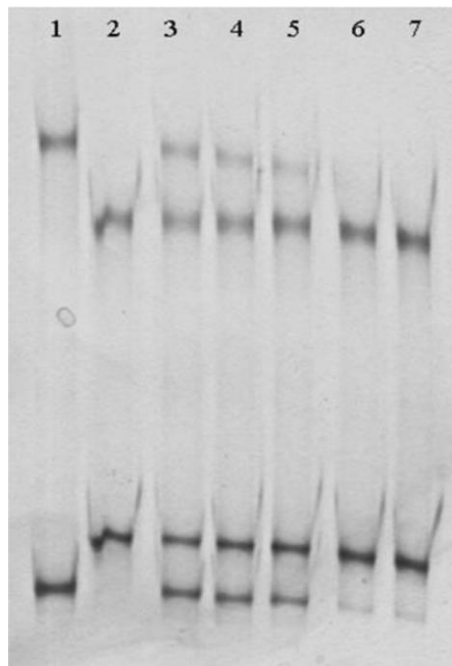
34. ábra. 18 faj kimutatása PCR-SSCP módszerrel. A 17. táblázatban a vizsgált fajok magyar és latin neve látható a fenti gélképen látható sorrendben feltüntetve.

17. táblázat. Hústermékek vizsgálata során tesztelt fajok

Sorszám	Magyar név	Latin név
1.	Házi galamb	<i>Columba livia domestica</i>
2.	Házi tyúk	<i>Gallus gallus</i>
3.	Gyöngytyúk	<i>Numida meleagris</i>
4.	Pulyka	<i>Meleagris gallopavo</i>
5.	Házi kacs	<i>Anas platyrhynchos domestica</i>
6.	Pézsmaréce	<i>Cairina moschata</i>
7.	Házi lúd	<i>Anser anser</i>
8.	Sertés	<i>Sus scrofa domestica</i>
9.	Vaddisznó	<i>Sus scrofa</i>
10.	Szarvasmarha	<i>Bos taurus</i>
11.	Bivaly	<i>Bubalus bubalis</i>
12.	Juh	<i>Ovis aries</i>
13.	Muflon	<i>Ovis aries orientalis</i>
14.	Kecske	<i>Capra hircus</i>
15.	Ló	<i>Equus caballus</i>
16.	Házi nyúl	<i>Oryctolagus cuniculus domestica</i>

Sorszám	Magyar név	Latin név
17.	Gímszarvas	<i>Cervus elaphus</i>
18.	Dámszarvas	<i>Dama dama</i>
19.	Őz	<i>Capreolus capreolus</i>
20.	Ember	<i>Homo sapiens</i>

A PCR-SSCP módszer érzékenységének tesztelését szárnyas fajokból származó húsmintákkal végeztük el. Házi tyúk és házi kacsá egysegű koncentrációjú DNS-ét kevertük meghatározott arányokban. A keverékek 20; 10; 5; 1; 0,5%-ban tartalmazták a házi tyúk DNS-ét a házi kacsá DNS-ével szemben. A PCR-SSCP eredményeképpen kapott sávmintázatot a 35. ábrán mutatjuk be.

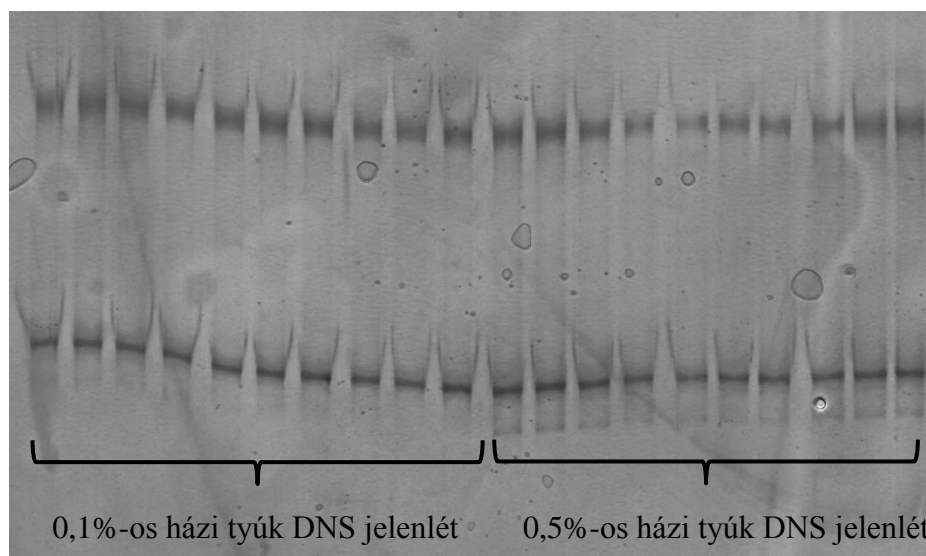


35. ábra. Házi tyúk és házi kacsá DNS keverékek poliakrilamid elektroforetikus eredménye. 1: Házi tyúk pozitív kontroll; 2: házi kacsá pozitív kontroll; 3: 20% házi tyúk jelenlét; 4: 10% házi tyúk jelenlét; 5: 5% házi tyúk jelenlét; 6: 1% házi tyúk jelenlét; 7: 0,5% házi tyúk jelenlét.

A fenti ábrán a bemutatott egységnyi DNS koncentrációt tartalmazó keverési arányok eredményeit figyelhetjük meg. A 7. minta esetében is megfigyelhető egy, a házi tyúk jelenlétére utaló sáv, ami alapján kijelenthetjük, hogy a PCR-SSCP módszer megfelelő érzékenységgel képes detektálni az egyes fajokat, hiszen ebben az esetben ez 0,5%-os

jelenlét kimutatását jelenti. A gyakorlatban, kereskedelmi forgalomból származó termékek esetében ennél jelentősen nagyobb arányú bekeveréseket várunk, így a módszer érzékenysége megfelelő mértékűnek tekinthető.

Mivel a legkisebb keverési arány esetében is egyértelműen jelentkezett a házi tyúkra jellemző sáv, ezért egy újabb lépésben 10-10 mintán teszteltük, hogy 0,1%-os arány esetében is megjelenik-e ez a specifikus sáv. 10 minta 0,5%-os arányban, 10 minta 0,1%-os arányban tartalmazta a házi tyúk DNS-ét. Ennek az SSCP vizsgálatnak az eredményeképpen megállapítottuk, hogy a 10 0,5%-os minta esetében mindegyiknél megfigyelhető volt házi tyúk specifikus sáv, míg a 10 0,1%-os minta esetében egyiknél sem volt megfigyelhető a házi tyúkra jellemző sávmintázat. A PCR-SSCP poliakrilamid gélelektroforetikus eredményét a 36. ábrán mutatjuk be.



36. ábra. A 0,1%-os arányú keverések esetében nem figyelhető meg házi tyúk specifikus sávmintázat, míg a 0,5%-os arányú keverések esetében minden mintánál megfigyelhető a házi tyúk specifikus sávmintázat.

A módszer érzékenységének tesztelését követően a hústermékekből történő fajazonosításban való alkalmazhatóságát teszteltük 65 kereskedelmi forgalomból származó hústermék esetében. A termékek baromfi és emlős fajokból készültek. A 65 termékből a termékek címkézése alapján 20 pulyka/csirke, 14 pulyka, 11 sertés, 8 csirke, 3 sertés/szarvasmarha, 2 pulyka/baromfi, 1 pulyka/csirke/baromfi, 1 baromfi, 1 kacsabaromfi, 1 ló/sertés, 1 pulyka/sertés, 1 baromfi/sertés, 1 lúd/sertés termékként volt

forgalmazva. A PCR-SSCP vizsgálatot mindegyik termékre elvégeztük a tervezett univerzális primerekkel. Az eredményeinket a 18. táblázatban foglaltuk össze.

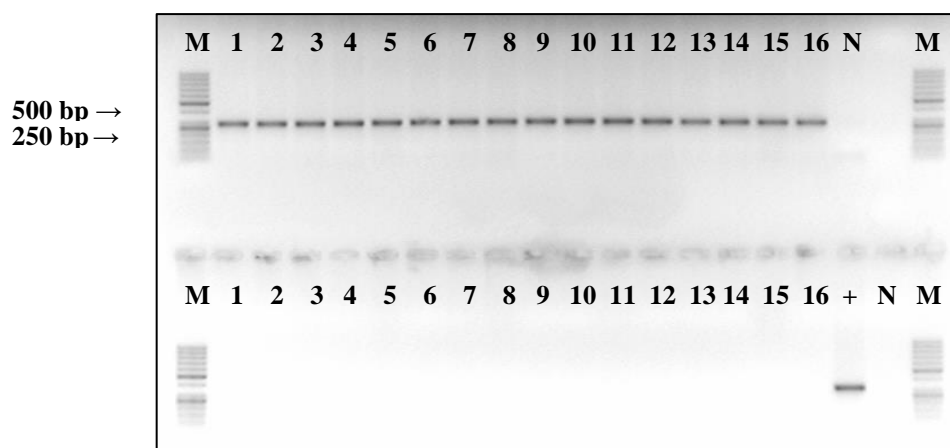
18. táblázat. Kereskedelmi hústermékek eredményei PCR-SSCP elválasztást követően

Jelölt faj	Sajtminták száma	PCR-SSCP módszer kimutatott fajok
Pulyka/házi tyúk	20	20 pulyka/házi tyúk
Pulyka	14	9 pulyka 5 pulyka/házi tyúk
Sertés	11	11 sertés
Házi tyúk	8	7 házi tyúk 1 házi tyúk/pulyka
Sertés/szarvasmarha	3	2 sertés 1 sertés/szarvasmarha
Pulyka/baromfi	2	2 pulyka/házi tyúk
Pulyka/házi tyúk/baromfi	1	1 pulyka/házi tyúk
Baromfi	1	1 házi tyúk
Kacsa/baromfi	1	1 kacsa/házi tyúk
Ló/sertés	1	1 ló/sertés/szarvasmarha
Pulyka/sertés	1	1 pulyka/házi tyúk
Baromfi/sertés	1	1 pulyka/házi tyúk/sertés
Lúd/sertés	1	1 lúd/sertés

A fenti táblázatban kiemelve szerepelnek azok a termékek, ahol egyértelműen kimutatható volt be nem vallott faj jelenléte. Azon eseteket, ahol a termék címkézésén baromfi volt feltüntetve, és ennek megfelelően csak szárnyas fajokat mutattunk ki nem tekinthettük élelmiszerhamisításnak. Így összességében 65 kereskedelmi terméket megvizsgálva 10 esetben volt kimutatható be nem vallott idegen faj jelenléte. Ez a vizsgált termékek 15,4%-át jelentette.

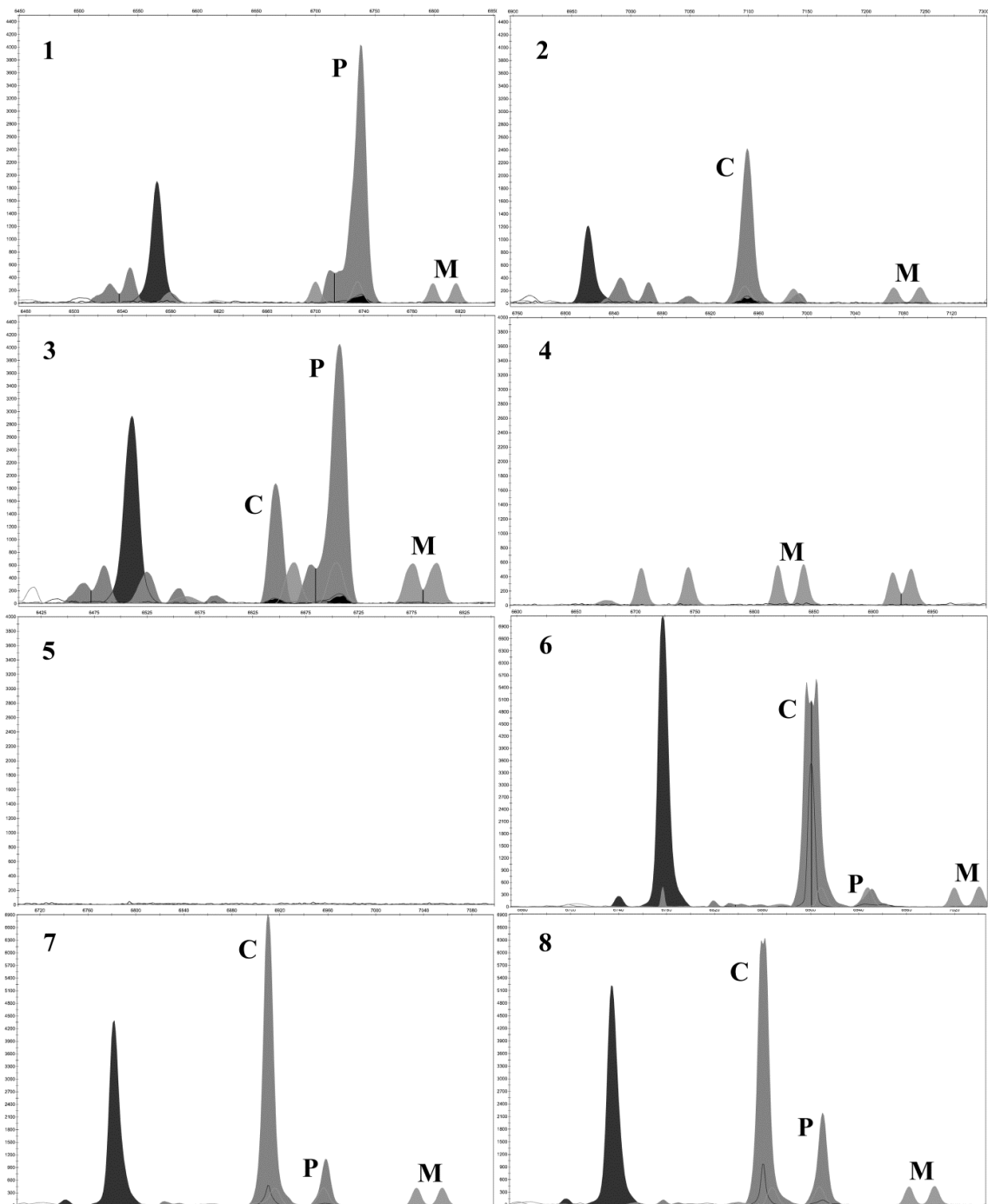
5.5 Sertés eredetű hús, máj és zsír kimutatása marhahúsban CE-SSCP módszerrel

A 37. ábrán megfigyelhető, hogy a 12S rRNS génre tervezett primerekkel elvégzett reakció eredményeként agaróz gélen detektálhatóak PCR termékek, míg a genomi DNS jelenlétét bizonyító RYR1 génre tervezett primerpárral végzett reakciók nem eredményeztek sávot az agaróz gélen, ami a mitokondriális génekkel végzett vizsgálat során a genomi DNS szennyezésének hiányát jelzi.



37. ábra. Fluoreszcensen jelölt PCR termékek agaróz gélelektroforetikus eredményei.

A kép felső részén a 12S rRNS génre tervezett primerekkel végzett PCR reakciók eredménye látható (283 bp). Az alsó részen a RYR1 génre tervezett primerpárral elvégzett PCR reakciók eredményei láthatóak (329 bp). Genomi DNS szennyezés nem mutatható ki a mitokondriális eredetű mintáknál. Az oszlopok 1-16. az anyag és módszer fejezetben leírt minták sorrendjét követik. +: pozitív kontroll, N: negatív kontroll, M: 50 bp DNS létra (Thermo Fischer Scientific, USA).



38. ábra. Sertés és szarvasmarha 12S rRNS gén fajspecifikus elektroferogrammjai CE-SSCP elválasztást követően. M: LIZ 500 DNS marker. A VIC-jelölt DNS szálakat világosszürke, a FAM-jelölt DNS szálakat fekete csúcsok jelölik. Konformációs eltérések csak a VIC-jelölt szálak esetében voltak kimutathatóak. A függőleges tengelyen a relatív fluoreszcencia egység (relative fluorescent units, RFU), a vízszintes tengelyen az adatpontok vannak jelölve. 1 adatpont megegyezik 220 msec migrációs idővel. 1: sertés kontroll; 2: szarvasmarha kontroll; 3: szarvasmarha+sertés kontroll; 4: LIZ standard kontroll; 5: negatív kontroll; 6: 99% szarvasmarha karaj + 1% sertés zsír;

7: 99% szarvasmarha karaj + 1% sertés karaj; 8: 99% szarvasmarha karaj + 1% sertés máj.

19. táblázat. mtDNS kópiaszám becslés különböző szövetekben saját spektrofotometrikus adatok alapján

Szövet	Koncentráció (ng/μl)	mtDNS számított mennyisége (ng) 1 mg szövetben	mtDNS kópiaszám közelítő becslése 1 mg szövetben
Sertés máj	2473.58	1236.79	$6.87 \cdot 10^{10}$
Sertés karaj	506.57	1.41	$1.41 \cdot 10^{10}$
Sertés zsír	117.91	58.9	$3.27 \cdot 10^9$

A 19. táblázat számításai azon a feltevésen alapulnak, hogy egy bázispár átlagos tömege 650g/mol és a sertés mtDNS hossza 16 679 bázispár (Ursing és mtsai., 1998). Ezen becslés alapján még 1 mg szövet is bőséges mennyiségű templátot szolgáltat a PCR reakció számára. A 38. ábrán látható, hogy a kontrollmintában lévő szarvasmarha és sertés specifikus csúcsok tisztán elkülönülnek egymástól, csak úgy mint a vizsgálati mintákban. A CE-SSCP eredménye alapján megállapítottuk, hogy ezzel a módszerrel 1v/v % keverési arány mellett tudjuk kimutatni a sertés zsír (38. ábra/6.), a sertés karaj (38. ábra/7) és a sertés máj (38. ábra/8) jelenlétét szarvasmarha m. longissimus dorsi-ból. A módszer azonban véleményünk szerint nem alkalmas a kiindulási anyagban lévő fajok kvantitatív becslésére, ugyanis az mtDNS kópiaszáma erősen függ a szövet típusától, ami különböző intenzitású csúcsokat eredményez (38. ábra). Ennek ismeretében megfogalmazható, hogy a nagyobb húsrész, testtömeg, a nagyobb zsírszövet, vastagabb szalonna nem feltétlenül jelent több sejtet, vagyis egységnyi testtömegben erősen változhat a kópiaszám.

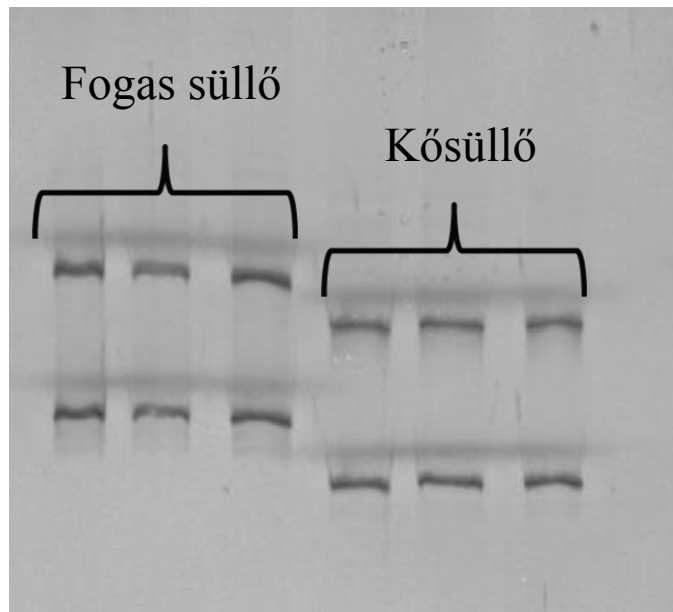
5.6 Halfajok azonosítása és elkülönítése PCR SSCP metodika alkalmazásával

A vizsgálat során magyarországi kereskedelmi forgalomban is kapható és vadvízi halfajok egymástól egyszálú DNS konformációban való eltérés alapján, poliakrilamid gélen történő elkülönítését, illetve azonosítását végeztük el. A 20. táblázat a vizsgálatba vont fajokat mutatja be. A táblázatban szereplő fajokat csoportokra bontva, illetve egységes egészként is vizsgáltuk különböző specifitású primereket alkalmazva. Az első megközelítés esetében a csoporton belül elkülönítés volt a cél, míg a második esetben minden faj elkülönítése a többtől egyetlen, a mitokondriális genomban lokalizálódó citokróm-oxidáz I. alegység génre tervezett univerzális primerpár alkalmazásával. A csoportosítás során 2 csoport került kialakításra, az egyes csoportok kialakításánál azt vettük figyelembe, hogy melyek azok a fajok, amelyek jellemzően egy másik faj helyettesítésére szolgálnak. A 20. táblázatban a vizsgálatba vont fajok nevei láthatóak.

20. táblázat. A vizsgálatba vont halfajok felsorolása

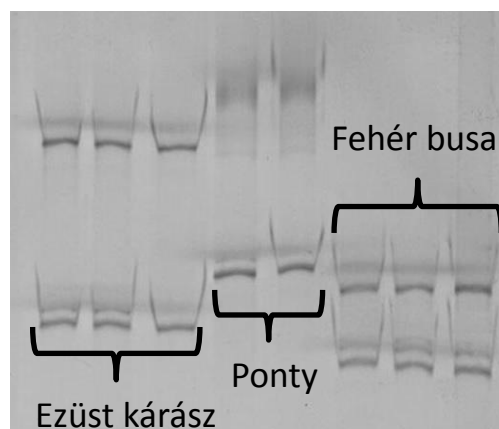
Magyar név	Latin név
Afrikai harcsa	<i>Clarias gariepinus</i>
Balin	<i>Aspius aspius</i>
Bodorka	<i>Rutilus rutilus</i>
Compó	<i>Tinca tinca</i>
Csuka	<i>Esox lucius</i>
Dévérkeszeg	<i>Abramis brama</i>
Ezüst kárász	<i>Carassius gibelio</i>
Fogassüllő	<i>Sander lucioperca</i>
Harcsa	<i>Silurus glanis</i>
Karikakeszeg	<i>Blicca bjoerkna</i>
Kőszüllő	<i>Sander volgensis</i>
Ponty	<i>Cyprinus carpio</i>
Razbóra	<i>Pseudorasbora parva</i>
Szélhajtó küsz	<i>Alburnus alburnus</i>
Szivárványos pisztráng	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
Vörösszárnyú keszeg	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>
Fehér busa	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>

A fogassüllő, kőszüllő, pisztráng valamint a fogassüllő, kőszüllő, ezüst kárász, ponty és fehér busa alkottak egy-egy csoportot.



39. ábra: Fogassüllő és kőszüllő elkülönítése PCR-SSCP módszerrel

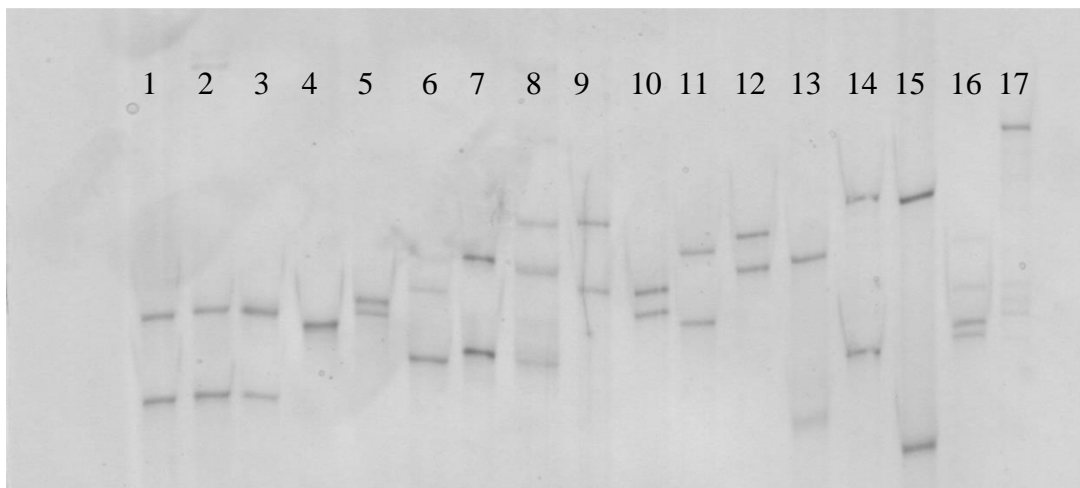
Az 39. ábrán fogassüllő és kőszüllő fajok sávmintázatai figyelhetőek meg. Megfigyelhető, hogy a két faj esetében jól elkülöníthető sávmintázatok alakulnak ki, amelyek lehetőséget teremtenek a két faj elkülönítésére. A fogassüllő és kőszüllő esetében három egyed, míg a pisztráng esetében négy egyed került vizsgálatra. Megfigyelhető továbbá az is, hogy a fogassüllő és kőszüllő esetében nem lehet fajon belüli variabilitást megfigyelni.



40. ábra: Ezüst kárász, ponty, fehér busa fajok elkülönítése PCR-SSCP módszerrel

A 40. ábrán ezüst kárász, ponty és fehér busa fajok elkülönítése történt PCR-SSCP rendszerben. Megfigyelhető, hogy mind az három faj esetében különböző sávmintázat alakul ki, vagyis egymástól elkülöníthetőek. Az első két ezüst kárász egyed alsó sávjai felett közvetlenül megfigyelhető egy halványabb sáv, ami viszont a harmadik egyednél nem jelenik meg. Ez magyarázható azzal is, hogy több esetben is előfordulhat, hogy az egyszálú DNS molekulák több stabil konformerrel is rendelkeznek. A ponty és a fehér busa esetében konzekvens sávmintázatok figyelhetőek meg.

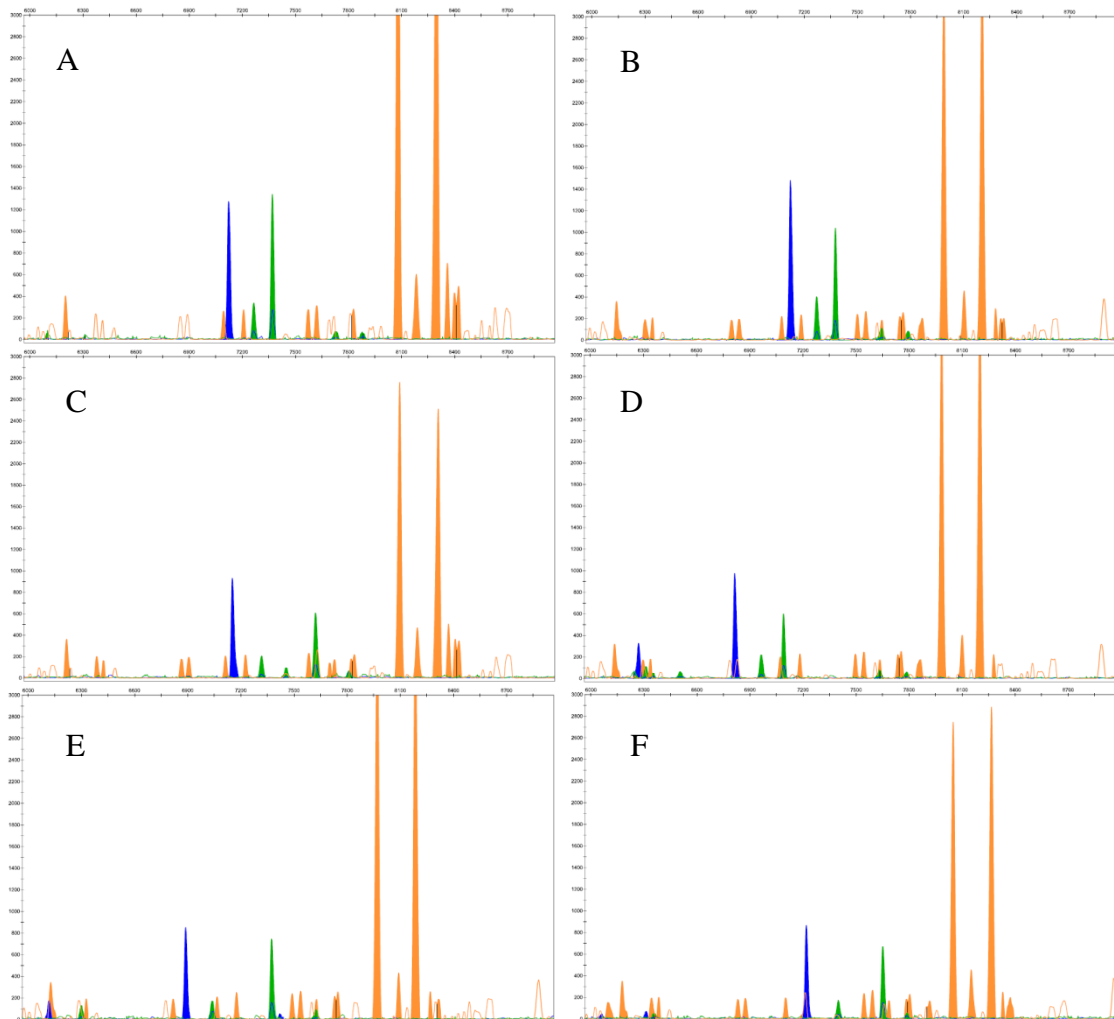
A 41. ábrán 15 faj sávmintázatát lehet elkülöníteni. Az 1., 2. és 3. minták kereskedelmi forgalomból származó haltetek voltak, amelyeket rendre szivárványos pisztrángként, pisztrángként és édesvízi pisztrángként jelöltek a termék címkézésén. A kapott eredmény alapján kijelenthető, hogy az eltérő elnevezés ellenére ugyanarról a fajról van szó, ugyanis azonos sávmintázat figyelhető meg. Jellemzően a szivárványos pisztrángot tenyésztik haltelepeken, ezért nagy valószínűséggel mindhárom esetben ezzel a fajjal állunk szemben. A többi faj esetében egyértelműen elkülöníthető sávmintázatok figyelhetőek meg, vagyis a fajok egymástól PCR-SSCP rendszerben elválaszthatóak. Külön kiemelendő a 8. minta, ami esetében 3 sáv is megfigyelhető, ez jó példa arra, hogy több stabil konformer is kialakulhat a DNS denaturációja során.



41. ábra: 1. szivárványos pisztráng, 2. pisztráng, 3. édesvízi pisztráng, 4. harcsa, 5. afrikai harcsa, 6. ponty, 7. ezüst kárász, 8. karikakeszeg, 9. dévérkeszeg, 10. vörös szárnyú keszeg, 11. szélhajtó küsz, 12. bodorka, 13. balin, 14. razbóra, 15. compó, 16. fogassüllő, 17. csuka

Összesen 15 halfaj vizsgálatát végeztük el PCR-SSCP rendszerben. A kapott eredmények ismeretében kijelenthetjük, hogy mind a 15 fajt képesek voltunk elkülöníteni mindösszesen egyetlen univerzális primerpár használatával, a denaturált egyszálú DNS konformációs különbségei alapján. A módszer használatával jelentősen csökkentettük a kimutatási költségeket szemben a PCR-RFLP vagy DNS szekvenálási eljárásokkal. Megállapíthatjuk, hogy rendelkezésünkre áll egy olyan univerzális primerpár, amellyel a vizsgált fajok esetében biztonsággal lehet előállítani olyan PCR terméket, amelynek denaturálásával fajspecifikus konformerek alakulnak így lehetővé téve a fajspecifikus elválasztást poliakrilamid gélen nem denaturáló körülmények között.

A PCR-SSCP elvégzése után az alkalmazott univerzális primereket fluoreszcensen jelölt formában is felhasználtuk kapilláris elektroforézis – SSCP (CE-SSCP) végrehajtásához. Ennek során az emberi fogyasztás során fontosnak tekinthető fajokat szeretnénk volna elkülöníteni. Összehasonlítottuk az európai harcsa, afrikai harcsa, fekete törpeharcsa, ezüst kárász, ponty és szivárványos pisztráng fajok CE-SSCP módszerrel kapott mintázatait. Az elemzés eredményeképpen megállapítottuk, hogy az európai harcsa és afrikai harcsa nem vált el, azonos mintázatot adott CE-SSCP rendszerben, míg a többi faj elkülöníthető volt a kapott sávmintázatok alapján. A 42. ábrán mutatjuk be a CE-SSCP eredményét. Minden kép esetében a vízszintes tengelyen az adatpontok vannak ábrázolva, a függőleges tengelyen pedig a relatív fluoreszcencia egység (relative fluorescent unit, RFU), vagyis a fluoreszcens jel erőssége.



42. ábra. Afrikai harcsa (A), európai harcsa (B), fekete törpeharcsa (C), ponty (D), ezüst kárász (E) és szivárványos pisztráng (F) CE-SSCP során kapott mintázatai. F: FAM (fluorescein amidite); V: VIC (...).

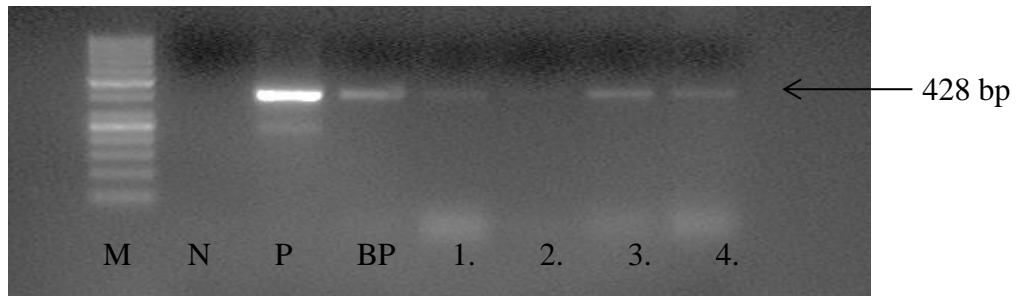
A kék színnel jelölt csúcsok jelzik a VIC fluoreszcens festékkel jelölt reverse primer által felszaporított szálakat, míg a zöld színnel jelölt csúcsok a FAM jelölt forward primer által felszaporított szálakat jelentik. A fenti ábrán látható, hogy a hat halfaj közül azonos mintázatot mutat az európai harcsa az afrikai harcsával, míg a többi faj eltérő mintázattal rendelkezik, ezért elkülöníthetők ebben a rendszerben. Itt kell megjegyezni, hogy bár egyszerűbb megközelítést jelent a gélen elvégzett PCR-SSCP módszer a CE-SSCP-vel szemben, mégis az előbbi módszer alkalmazásával az európai és afrikai harcsa esetében is eltérő mintázatot kaptunk, a két faj elkülöníthető volt fajspecifikus sávmintázataik alapján.

5.7 Ponty DNS jelenlétének kimutatása bomlásnak indult mintából, illetve légylárvából



A ponty fajra specifikus primerek alkalmaságát teszteltük olyan formán, hogy ponty húsát bomlásnak tettük ki. Az idő előre haladásával a húsmintán megjelentek légylárvák is. A primerek robusztusságát azzal bizonyítottuk, hogy mind a bomlásnak indult húsból, mind a húson növekvő lárvákból DNS-t izoláltunk, majd ponty specifikus primerpárral végeztünk el a kivont DNS-t templátként használva PCR reakciót. Vizsgálatunkban szerepelt negatív kontroll és pozitív kontrollként bomlásnak nem indult mintából kivont ponty DNS is. Az NCBI GenBank adatbázisban található házi légy (*Musca domestica*) citokróm b gén szekvenciájára BLAST algoritmust alkalmazva illesztettük a ponty specifikus primerpár szekvenciáját és ennek eredményeképpen nem találtunk olyan szakaszt a házi légy esetében, ahová a ponty specifikus primerek tapadhatnának.

Az elvégzett PCR reakciók után kapott agaróz gélelektroforézis eredménye a 43. ábrán figyelhető meg.



43. ábra. A fenti ábrán légylárvákból származó DNS-sel, ponty specifikus primer felhasználásával végzett PCR reakció eredménye figyelhető meg. 1-4. Légylárvákból származó DNS-sel elvégzett PCR reakciók eredménye. M: 50 bp DNS létra. N: negatív kontroll. P: pozitív kontroll, BP: bomlásnak indult ponty.

Az alkalmazott ponty specifikus primer alkalmazásával légylárvákból származó DNS templátot felhasználva is sikerült kimutatni a ponty jelenlétét, ami arra utal, hogy a légylárvák testére tapadva vagy a tápcsatornájuk kezdeti szakaszában lévő táplálékból is lehetőség nyílik kimutatni egy adott faj jelenlétét, így bizonyítva az adott faj jelenlétét. Emellett a módszer bizonyítja a pontyra specifikus primerpár robosztusságát is, hiszen kis mennyiségből is képes a ponty DNS felszaporítására. A fenti ábrán negatív kontroll minta esetében, ahogy azt vártuk, nem kaptunk jelet, a pozitív kontrollként nem degradált ponty minta esetében erős jelet kaptunk, míg a légylárvák DNS-ével végzett PCR reakciók eredményeként halvány, de egyértelműen a ponty termék méretével megegyező terméket kaptunk.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

A molekuláris genetikai módszerek fejlesztése az elmúlt megközelítőleg két évtized folyamán kiemelkedő fontosságúvá vált az élelmiszerekből történő fajazonosítás területén (Asensio és mtsai. 2009). Ennek ismeretében vizsgálataink során molekuláris genetikai módszerek tesztelését végeztük el élelmiszerekből történő fajazonosítási metodika fejlesztése érdekében.

Vizsgálataink során sajtttermékeket, hústermékeket és halfajokat választottunk el PCR-egyszálú DNS konformáció polimorfizmus módszer alkalmazásával. A szakirodalmat olvasva kevés olyan közlemény lelhető fel, ami foglalkozik a PCR-SSCP módszer alkalmazásával sajtttermékek vizsgálata során. Plath és mtsai. (1997) munkájukban szarvasmarha, juh, kecske és bivaly tejéből kivont DNS felhasználásával próbálták a négy fajt PCR-SSCP módszerrel elkülöníteni egymástól, esetükben azonban a juh és a kecske nem mutatott eltérő sávmintázatot, 50-50%-os és 95-5%-os arányban keverték kecske és szarvasmarha DNS-ét. Ennek eredményeképpen képesen voltak az 50-50%-os keverés esetében mindkét fajt detektálni, de 95-5%-os arányok mellett már ugyanez nem volt sikeres. Sajtttermékek vizsgálata során esetünkben 3-5%-os kimutatási határérték volt elérhető a PCR-SSCP módszer alkalmazásával. Ugyanakkor más módszerek alkalmazásával ez a határérték csökkenthetővé válik. Duplex-PCR reakció alkalmazásával Rea és mtsai. (2001) képesek voltak szarvasmarha és bivaly fajok megkülönböztetésére mozzarella sajtok elemzése során, ahol a kimutatási határérték esetükben 1%-nak adódott. Ugyanezen fajok vizsgálatát végezték el szintén duplex-PCR rendszerben López-Calleja és mtsai. (2005), esetükben a kimutatási határérték már 0,1% volt, ami erősen érzékeny. Látható, hogy duplex-PCR reakcióban két faj elkülönítése meglehetősen egyszerűen és nagy érzékenységgel végezhető el, azonban hátránya a módszernek a PCR-SSCP-vel szemben, hogy egyszerre mindössze két faj vizsgálható és két primerpár használata szükséges. Multiplex-PCR alkalmazásával növelhető ugyan a vizsgált fajok száma, azonban az alkalmazott primerpárok számának növekedésével együtt a primerek tervezése bonyolultabbá válik és az esetleges keresztreakciók elkerülésének esélye is csökken. Bottero és mtsai. (2003) multiplex rendszerben szarvasmarha, juh és kecske fajok elválasztását végezték el. Esetükben a kimutatási határérték 0,5%-nak adódott. Itt azonban meg kell azt is jegyezni, hogy ezzel

a módszer érzékenysége bizonyítható, viszont a gyakorlatban ilyen kismértékű hamisításnak nincs gazdasági haszna.

Hústermékek esetén vizsgálatunkban 18 faj volt elkülöníthető PCR-SSCP rendszerben. 2001-es tanulmányukban Jürgen és mtsai. összesen 15 faj elkülönítését végezték el. A mi eredményeinkhez hasonlóan az ő esetükben sem lehetett elkülöníteni a sertést a vaddisznótól, ami a szekvenciák egyezésével magyarázható, illetve nem vizsgálták a muflont, a gyöngytyúkot és a pézsmarécét. Sarri és mtsai. (2014) 5 faj esetében vizsgálták meg az elkülönítés lehetőségét PCR-SSCP módszert alkalmazva. Négy összeállítást alkalmaztak, az első esetben házi tyúk és pulyka került összehasonlításra, a második esetben házi tyúk, pulyka és sertés, a harmadik csoportban szarvasmarha, sertés, házi tyúk és pulyka, a negyedik esetben szarvasmarha, sertés, juh, házi tyúk és pulyka. Ennek eredményeképpen megállapították, hogy mind az öt faj elkülöníthető egymástól. Vizsgálatukban összesen 12 hústerméket elemeztek és mindegyik esetben csak a termék címkézésén bevallott fajok voltak kimutathatóak. Ezzel szemben vizsgálatunkban 65 hústermék közül 10 esetében volt kimutatható be nem vallott faj jelenléte. A kimutatási határérték 0,5% volt esetünkben (Tisza és mtsai. 2016). Duplex- és multiplex-PCR reakció alkalmazásával szintén alacsonyabb kimutatási határérték érhető el, csak úgy, mint a sajtttermékek esetében. Dalmasso és mtsai. (2004) multiplex-PCR reakció alkalmazásával kérődző, baromfi, hal és sertés húsokat mutattak ki élelmiszerekből 0,002%-os arányban a sertés jelenlétére vonatkoztatva. Ennél magasabb arányban, de még így is rendkívül nagy érzékenység mellett lehetett kimutatni baromfi és sertés jelenlétét, elérve 0,01%-os kimutatási határértéket (Krcmar és Rencova, 2003).

Halakkal végzett fajazonosítás során PCR-SSCP módszer alkalmazása mellett 15 édesvízi fajt különítettünk el sikeresen. A célszekvenciánk a mitokondriális genomban lokalizálódó citokróm-oxidáz I. alegység génjében volt megtalálható, hasonlóan a sajtttermékek és hústermékek elkülönítéséhez, ahol szintén a mitokondriális genomban fellelhető 12S rRNS gén szekvenciája jelentette a célszekvenciát. Halakkal végzett fajazonosítási munkák során szintén jellemzően mitokondriális gének kerülnek fókuszba, mint a 12S rRNS (Asensio és mtsai., 2001) és 16S rRNS (Khamnamtong és mtsai., 2005) gének. Nem csak a halakkal folytatott vizsgálatok, de más állatcsoportokkal és termékekkel végzett munka során is ki kell emelni azt a tényt, hogy

a PCR-SSCP módszer rendkívül érzékeny a DNS-ben jelentkező bázispár eltérésekre, mivel egy adott szakaszon belül akár egyetlen bázispár eltérést is képes kimutatni konformációs változás formájában (Oohara, 1997). További előnye a módszernek, hogy alkalmas degradált DNS vizsgálatára is, mivel a szükséges PCR termék mérete legfeljebb néhány száz bázispár nagyságú kell, hogy legyen (Rehbein és mtsai., 1999). Sripairoj és mtsai. (2010) Pangasiidae családba tartozó kilenc fajt vizsgáltak PCR-SSCP módszer alkalmazásával. Munkájuk során a kilenc faj közül ötöt sikerült elkülöníteniük, azonban ebben a csoportban szerepel négy, gazdaságilag fontos faj is. Egy másik tanulmányban Schievenhövel és mtsai. (2013) hét, a Sparidae családba tartozó faj elválasztását végezték el PCR-SSCP módszerrel. A hét faj közül ötöt tudtak elkülöníteni, míg egy esetben fajon belüli eltérést figyeltek meg. Kimutatási határérték megállapítására egyik esetben sem került sor, csupán a fajok sávmintázat szerinti elválasztása valósult meg, ahogy az történt a mi esetünkben is.

A kvalitatív kimutatás – „van - nincs” – lehetőségén túl egyik legfontosabb kihívás az egyes összetevők mennyiségének becslése, meghatározása. Mafra és mtsai. (2007) által leírt módszert alapul véve végeztük el juh és szarvasmarha DNS-t tartalmazó sajtok esetében a szarvasmarha mennyiségi kimutatását. Kalibrációs egyenletet állítottunk fel, amelynek segítségével becsülhetővé vált a kimutatandó DNS mennyisége. A tanulmányban kecske és szarvasmarha arányát határozták meg hasonló módon. Esetünkben 9-13% között mozgott a szarvasmarha jelenléte 17 sajt esetében, míg esetünkben 25 sajtot vizsgálva 4-77% között változott ez az arány. Habár sokkal pontosabban mennyiségi kimutatást végrehajtani real-time PCR módszerrel lehet, annak kivitelezése sokkal időigényesebb, bonyolultabb és anyagköltsége is magasabb. Ennek ellenére jelentős irodalma lelhető fel a real-time PCR-rel végzett mennyiségi meghatározásoknak. Soares és mtsai. (2010) feldolgozott baromfi termékek esetében vizsgálták a sertés jelenlétének és mennyiségi meghatározhatóságának lehetőségeit SYBR Green festéket alkalmazó rendszerben. A sertés DNS kimutatási határértéke itt is a már korábban duplex-PCR módszernél leírt határértéket érte el, vagyis 0,1% volt, ami jelen esetben 5 pg DNS mennyiséget jelentett.

Az élelmiszerekben lévő DNS degradáltsági fokának megállapítására használják az üstökös gélelektroforézis elnevezésű elválasztási módszert. Munkánk során hosszú ideig – 6, 8, 10 és 18 hónap – érlelt sajtokat vizsgáltunk. Eredetileg a módszert radioaktív

sugárzásnak kitett emlős sejttenyészetek vizsgálatára fejlesztették ki (Ostling és Johanson, 1984). A későbbiekben a radioaktivitás hatását széles körűen vizsgálták élelmiszerek esetében is (Verbeek és mtsai., 2007; Khawar és mtsai., 2010). A sugárzással tartósított élelmiszerek vizsgálatára az Európai Unió is az üstökös gélelektroforézis módszert jelölte meg hivatalosan elfogadott módszerként (Internetes hivatkozás 3.). Az idő hatását élelmiszerek esetében Cerda és mtsai. (1998) vizsgálták házi tyúk húsán. Vizsgálatuk rövidebb időtartamot ölelt fel, mint a fentebb említett sajtok érlelési ideje. Frissen beszerzett húsmintákat +4°C-on tartottak 12 napon keresztül, az üstökös gélelektroforézist az 1., 3., 7., 10., és 12. napokon végezték el. Időben előre haladva a genomi DNS egyre degradáltabb formát mutatott, kezdetben kompakt csóva nélküli genom, később hosszú csóvaképződés, majd diffúz, szétterjedő csóva volt megfigyelhető esetükben. Az utolsó vizsgálati napon már bakteriális jeleket is detektáltak. Ez az eredmény rávilágít arra, hogy már 12 nap eltelte után is erősen degradált genommal állunk szemben, míg több hónapos érlelés esetén csak rövid DNS szakaszok maradnak vissza, ahogy azt az Eredmények fejezet Üstökös gélelektroforézis alfejezetének végén bemutatott PCR-reakció eredményével szemléltettünk.

7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

A dolgozatomban szereplő vizsgálatok eredményeit figyelembe véve az alább felsorolt új tudományos eredményeket lehet megfogalmazni:

1. A PCR-SSCP vizsgálat fejlesztése során tej és sajtermékek esetében megállapítottuk a módszer érzékenységét, ami ebben az esetben 3-5%-os arányok között változott szarvasmarha DNS-re vonatkoztatva. A módszer érzékenységének megállapítását követően az alkalmazhatóságot teszteltük összesen 120 kereskedelmi minta esetében. Megállapítottuk, hogy a 120 termékből 36 esetben egyértelműen kimutatható volt olyan faj jelenléte, amelyet a gyártó nem tüntetett fel az adott termék címkézésén, ami az összes minta 30%-át jelenti.

A sajtokban az érlelés során végbemenő változásoknak a sejtek genomjára gyakorolt hatását üstökös gélelektroforézis módszerrel vizsgáltuk. Ennek eredményeképpen megállapítottuk, hogy frissen fejt tej esetében kompakt csóva alakzatok alakulnak ki, míg 6, 8, 10 és 18 hónapos érlelésnek kitett sajtok esetében ezek a struktúrák teljesen hiányoznak. Az érlelt sajtok esetében 12S rRNS univerzális primerpárral elvégzett PCR reakció jól detektálható PCR terméket eredményezett.

2. A PCR-SSCP módszert hústermékekre alkalmazva szintén megállapítottuk a metodika érzékenységét, amihez meghatározott arányban kevert házi tyúk és házi kacsá egyseges koncentrációjú DNS izolátumait használtuk. 0,5%-os házi tyúk jelenlét is detektálható volt a házi kacsá DNS-ével szemben. A módszer segítségével 20 faj esetében 18 elválasztható volt egymástól az egyszálú DNS konformációs különbségei alapján. A hústermékek esetében is a módszer alkalmazhatóságát szeretnénk volna tesztelni, ezért 65 kereskedelmi forgalomból származó hústerméken teszteltük a kimutatás sikerességét, aminek eredményeképpen 10 esetben volt detektálható hamisítás.

3. A magyarországi, édesvízi halfajok esetében 16 halfajt PCR-SSCP rendszerben egyidejűleg választottunk el univerzális primerpár alkalmazásával. A vizsgálat eredményeképpen mind a 16 fajt sikeresen választottuk el poliakrilamid gélen egyszálú DNS-ük konformációs különbségei alapján. A következőekben felsorolt 16 fajt sikerült elválasztanunk: szivárványos pisztráng, európai harsca, afrikai harsca, ponty, ezüst

kárász, karikakeszeg, dévérkeszeg, vörös szárnyú keszeg, kűsz, bodorka, balin, razbóra, compó, fogassüllő, csuka. Az alkalmazott univerzális primerpárokat fluoreszcens jelöléssel ellátva kapilláris elektroforézis rendszerben vizsgáltuk az európai harcsa, afrikai harcsa, fekete törpeharcsa, ponty, ezüst kárász, szivárványos pisztráng fajok elválasztási lehetőségeit. A vizsgált 6 faj közül nem mutatott különbséget az európai harcsa és afrikai harcsa, a többi faj eltérő mintázattal rendelkezett.

8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK GYAKORLATI HASZNOSÍTHATÓSÁGA

A PCR-SSCP módszer egy relatív alacsony költséggel bíró, időtakarékos alternatívát jelenthet a további fajazonosítási vizsgálatok elvégzésére. A tervezett univerzális primerek széleskörűen alkalmazhatóak mind szárnyas, emlős és halfajok esetében, ami tovább csökkenti a módszer költségeit. Habár jelen dolgozat keretében a legtöbb gazdasági állatfaj szerepelt, a későbbiekben bioinformatikai megközelítést alkalmazva tesztelhetőek az univerzális primerpárok más fajok szekvenciáin is, annak megállapítására, hogy a vizsgált fajokban azonosított konzervatív régiók más fajok esetében is megtalálhatóak-e és így alapot adhatnak-e a módszer szélesebb körű fogyasztóvédelemben történő használatának.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

Az elmúlt években bekövetkezett élelmiszerhamisítási botrányok nem csak a problémával már eddig is foglalkozó kutatói társadalom, de a fogyasztók figyelmét is ráirányították egy igen jelentős, az élelmiszerbiztonságot veszélyeztető problémára. Egyes termelők a nagyobb haszon reményében alacsonyabb költségű összetevőket használnak fel termékeik előállításához, azonban az adott terméket ilyen esetben félrevezető címkézéssel látják el, ami magasabb költségű összetevőket jelez a vásárló számára, így magasabb összeget fizet ki egy olyan termékért, ami valójában a jelzett összetevőt vagy sokkal kisebb arányban, vagy akár szélsőséges esetben egyáltalán nem tartalmazza. A fentebb felvázolt probléma a kutatókat analitikai módszerek számos változatának fejlesztésére sarkallta.

Vizsgálataink központi eleme volt olyan metodika, metodikák fejlesztése, amelyek lehetővé teszik az élelmiszerekből DNS szintjén történő fajazonosítást. A PCR egyszálú DNS konformáció polimorfizmus egy költséghatékony, meglehetősen egyszerűen kivitelezhető alternatívát kínál ennek a problémának a megoldására. A módszer fejlesztése során gazdasági állatfajokat sikerült elválasztanunk egymástól DNS szintjén lévő konformációs eltérések alapján. Ennek eredményeképpen baromfi fajok esetében sikeresen elválasztottuk egymástól a házi tyúk, házi kacsa, házi lúd, gyöngytyúk, pézsmaréce, házi pulyka és fácán fajokat egyetlen reakcióban, egyidejűleg, mindössze egyetlen univerzális primerpárt alkalmazva a PCR reakciók során. Az emlős fajok esetében is sikeres elválasztást tudunk elérni. Megkülönböztethető az alkalmazott rendszerben a sertés, szarvasmarha, bivaly, juh, kecske, gímszarvas, házi nyúl, ló és őz fajok. A módszer jelen esetben nem tudott különbséget tenni a gím- és dámszarvas valamint a juh-muflon párok esetében, ami a közeli genetikai rokonsággal magyarázható. A harmadik csoportban halfajok elválasztása történt meg. Ennek eredményeképpen több magyarországi édesvizekben jelenlévő fajt sikerült elkülöníteni egymástól. Sikeresen történt meg a következő fajok elválasztása: kősüllő, fogassüllő, ezüst kárász, ponty, fehér busa, dévérkeszeg, balin, csuka, compó, naphal, bodorka, vörös szárnyú keszeg, kűsz, razbóra, szivárványos pisztráng, afrikai harcsa, európai harcsa, karikakeszeg.

A vizsgálataink során a kvantitatív kimutatás lehetőségeit is vizsgáltuk. Ennek során juh és szarvasmarha specifikus primerpárok alkalmazásával egy kalibrációs egyenletet állítottunk fel, amelynek segítségével becsülni lehet a két faj DNS-ének százalékos arányát sajttermékek esetében. 25 kereskedelmi forgalomban kapható sajtot vizsgáltunk duplex-PCR reakcióban, miután PCR-SSCP rendszerben kimutattuk, hogy mind juh, mind szarvasmarha DNS-t tartalmaznak. A vizsgálat eredményeképpen megállapítottuk, hogy a 25 sajt esetében a szarvasmarha faj DNS-ének jelenléte 4,68% és 77,68% között változott.

Vizsgálatainkban a sajtok érlelése során bekövetkező DNS degradáció mértékéről is képet szerettünk volna kapni. Ennek tesztelésére üstökös gélelektroforézis módszert alkalmaztunk. A technika alkalmazása során friss tehéntej szolgált pozitív kontrollként, míg a vizsgálati minták 6, 8, 10 és 18 hónapig érlelt tehéntejből készült sajtok voltak. A frissen fejt tehéntej esetében kompakt üstökös formák alakultak ki a gélelektroforézis során, amely a genomi DNS viszonylagos sértetlenségét mutatta. Ezzel szemben az érlelt sajtok esetében nem volt kimutatható üstökös képződés. Ugyanakkor a PCR-SSCP vizsgálatok során alkalmazott 12SrRNS génre tervezett univerzális primer alkalmazásával sikerült jól detektálható PCR terméket amplifikálni mind a friss tej, mind az érlelt sajtok esetében. Ez rámutat a PCR-SSCP vizsgálatokhoz alkalmazott univerzális primerpár robusztusságára, valamint jelzi, hogy bár a nukleáris genom már nem mutatható ki az érlelés előrehaladtával, a mitokondriális genom valószínűleg kevésbé sérül és lehetőség marad arra, hogy hosszú ideig szuboptimális közegben tárolt élelmiszer esetében is elvégezhető legyen egy PCR reakcióra alapozott teszt.

A fenti eredményeket figyelembe véve elmondhatjuk, hogy sikerült egy kellőképpen széleskörűen alkalmazható primerpárt tervezni, amellyel sikeresen elválaszthatóak emlős és szárnyas gazdasági állatfajok ugyanazon rendszerben, egy PCR reakció végrehajtásával és denaturálást követően poliakrilamid gélen történő elválasztásával.

Egy másik, szintén univerzális primerpár segítségével összesen 15 Magyarország édesvízeiben előforduló halfaj elválasztása valósulhatott meg ismételten csak egyetlen rendszerben, egyetlen reakció végrehajtásával.

A kvantitatív elemzés eredményeképpen sikerült egy juh-szarvasmarha DNS arány megállapítására alkalmazható kalibrációs egyenletet felállítani.

A genomi DNS degradációjának vizsgálata hosszabb ideig érlelt sajtok esetében kimutatta, hogy bár a nukleáris genom hónapokig tartó érlelést követően teljes mértékben degradálódik, megfelelő primerpár alkalmazásával az ilyen mintákból is lehetőség van néhány száz bp hosszúságú szakaszok felszaporítására és ez alapján fajazonosítás elvégzésére.

Eredményeink ismeretében levonhatjuk azt a következtetést, hogy a PCR-SSCP módszer fejlesztése során sikerült összesen 38 vizsgált fajból 33 állatfajt elkülöníteni egymástól egyszálú DNS-ük konformációs eltérései alapján mindössze két, általunk tervezett univerzális primerpár alkalmazásával. A molekuláris genetikai módszerek az elmúlt két évtizedben és jelenleg is széleskörű kutatási területet képeznek az állati eredetű élelmiszerekből történő fajazonosítás témakörében. Természetesen a PCR-SSCP módszer csak egy lehetséges megközelítési mód, emellett az általunk tesztelt további módszerek is alkalmazhatóak és további kutatási vonalat jelenthetnek a fajazonosítási módszerek vizsgálata során.

10. SUMMARY

Food scandals in recent years raised the attention of not only researchers having already been dealing with this issue, but that of the customers, as well, to a significant issue of food safety. Certain producers use cheaper ingredients during the production of their products to achieve higher profit. However, these producers mislabel these products indicating ingredients of higher costs, thus, the customer pays a higher amount of money for a product containing the given ingredient in a much lower concentration or in an extreme case, this product does not even contain this ingredient. The issue above urged the researchers to develop various analytical methods.

The central element of our studies was the development of a method or methods making possible the identification of species from food in the level of DNA. The PCR single strand conformation polymorphism technique offers a cost-effective, quite simple alternative to solve this problem. During the development of the method, farm animal species were able to be distinguished from each other on the basis of conformational differences in the DNA level. As a result, the chicken, duck, domestic goose, guinea fowl, muscovy ducks, turkey and pheasant species were distinguished from each other simultaneously, in a single reaction using a single universal primer pair during the PCR reactions. Successful separation was able to be achieved in case of mammalian species. In the system applied, pig, cattle, buffalo, sheep, goat, red deer, domestic rabbit, horse and roe deer species were able to be distinguished from each other. The method was currently unable to make a difference between red deer and fallow deer as well as sheep and mouflon, which can be explained by the close genetic relationship. In the third group, fish species were separated. As a result, many Hungarian freshwater species were successfully separated from each other, namely the Volga pikeperch, zander, Prussian carp, carp, silver carp, common bream, asp, common pike, tench, pond perch, roach, rudd, bleak, stone moroco, rainbow trout, African catfish, wels catfish and silver bream.

During our research, the possibilities of quantification were also studied. In the course of this study, a calibration equation was set applying the specific primer pairs of sheep and cattle, with the help of which the percentage of the DNA of these two species in processed cheese can be estimated. 25 commercially available cheeses were tested by

duplex PCR reaction after demonstrating by PCR-SSCP system that they contain both sheep and cattle DNA. As a result of the study it was found that for the 25 cheeses, the presence of cattle DNA varied between 4.68% and 77.68%. In our studies we wanted to get a view about the extent of DNA degradation during the ripening of cheeses. Comet assay method was used to test DNA degradation. During the application of this technique, fresh cow milk was used as positive control, while the samples were cheeses from cow milk ripened for 6, 8, 10 and 18 months. In case of fresh cow milk, compact comet structures were evolved during gel electrophoresis, showing the relative integrity of genomic DNA. In contrast, there were no detectable comet structures in case of ripened cheeses. However, by the application of a universal primer designed for the 12SrRNA gene applied during the PCR-SSCP investigations, a well-detectable PCR product was able to be amplified for both the fresh milk and the ripened cheeses. This indicates the robustness of the universal primer pair applied for the PCR-SSCP assay, and it indicates that albeit the nuclear genome is no longer detectable in the progression of ripening, the mitochondrial genome probably gets less damaged and there will be a possibility to perform a test based on a PCR reaction even for a foodstuff stored under suboptimal condition for a long time.

Considering the results above, it can be stated that we succeeded to create a primer pair able to be used widespread enough, with the help of which the mammalian and poultry farm animal species can be distinguished from each other by a PCR reaction and its separation on polyacrylamide gel after denaturation.

Using a second universal primer pair, 15 Hungarian freshwater fish species were able to be separated in a single system and by performing a single reaction.

As a result of the quantitative analysis, a calibration equation for the determination of the sheep-cattle DNA ratio was able to be set.

The analysis of genomic DNA degradation for cheeses ripened for longer time showed that albeit the nuclear genome gets totally degraded during months of ripening, by the application of appropriate primer pairs it is possible to propagate sections with the length of few hundred bp from these samples and to perform species identification.

On the basis of the results achieved, it can be concluded that by the application of two universal primer pairs designed by us, 33 animal species out of the investigated 38 were able to be distinguished from each other on the basis of the conformational differences in their single-stranded DNA, during the development of the PCR-SSCP method. For two decades, molecular genetic studies have been a broad range of research regarding the species identification from foodstuffs of animal origin. Naturally, the PCR SSCP method is only one possible approach. Other methods also tested by us may be applied for further research and may create further research pathways in the investigation of species identification methods.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Adam, T. – Mathies, W. – Mathies, R. (1994): Ultra-high-speed DNA fragment separations using microfabricated capillary array electrophoresis chips. *Proceedings of National Academy of Science*. 91, 11348-11352.
2. Altschul, S.F. – Gish, W. – Miller, W. – Myers, E.W. – Lipman, D.J. (1990): Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215, 403-410.
3. Amigo, L. – Ramos, M. – Calhau, L. – Barbosa, M. (1992): Comparison of electrophoresis, isoelectric focusing and immunodiffusion in determinations of cows' and goats' milk in Serra da Estrela cheeses. *Lait*. 72, 95-101.
4. Anguita, G. – Martín, R. – García, T. – Morales, P. – Haza, A.I. – González, I. – Sanz, B. – Hernández, P.E. (1996): Immunostick ELISA for detection of cow's milk in ewe's milk and cheese using a monoclonal antibody against bovine β -casein. *Journal of Food Protection*. 59, 436-437.
5. Ardura, A. – Horreo, J.L. – Hernandez, E. – Jardon, A. – Pola, I. – Martinez, J.L. (2012) Forensic DNA analysis reveals use of high trophic level marine fishin commercial aquaculture fish meals. *Fisheries Research*. 115-116, 115-120.
6. Ardura, A. – Pola, I. – Lind, A.R. – Garcia-Vazquez, E. (2010) DNA-based methods for species authentication of Amazonian commercial fish. *Food Research International*. 43, 2295-2302.
7. Asensio, L., González, I., Fernández, A., Rodríguez, M.A., Hernández, P.E., García, T., Martín, R. (2001). PCR-SSCP: A simple method for the authentication of grouper (*Epinephelus guaza*), wreck fish (*Polyprion americanus*), and Nile perch (*Lates niloticus*) fillets. *J. Agric. Food Chem*. 49, 1720–1723.

8. Asensio, L., González, I., García, T., & Martín, R. (2008). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control*, 19, 1–8.
9. Ballin N. Z., Vogensen F. K., Karlsson A. H. (2009). Species determination—Can we detect and quantify meat adulteration? *Meat Science*, 83(2), 165-174.
10. Biyani, M. – Nishigaki, K. (2001) Hundredfold productivity of genome analysis by introduction of microtemperature-gradient gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 22, 23-28.
11. Borgo, R. – Souty-Grosset, C. – Bouchon, D. – Gomot, L. (1996) PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA for identification snail meat species. *Journal of Food Science*. 61, 1-4.
12. Bottero, M.T. – Civera, T. – Nucera, D. – Rosati, S. – Sacchi, P. – Turi, R.M. (2003) A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cow's, goat's and sheep's milk in dairy products. *International Dairy Journal*. 13, 277-282.
13. Buzás, Zs. – Varga, L. (1995) Rapid method for separation of microsatellite alleles by the phastsystem. *PCR Methods and Applications*. 4(6), 380-381.
14. Cammá, 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.
15. Chen, X. – Kwok, P.Y. (1997) Template-directed dye-terminator incorporation (TDI) assay: a homogeneous DNA diagnostic method based on fluorescence resonance energy transfer. *Nucleic Acids Research*. 25, 347-353.

16. Chou, C.C. – Lin, S.P. – Lee, K.M. – Hsu, C.T. – Vickroy, T.W. – Zen, J. M. (2007). Fast differentiation of meats from fifteen animal species by liquid chromatography with electrochemical detection using copper nanoparticle plated electrodes. *Journal of Chromatography B*. 846, 230–239.
17. Chrambach, A. (1980) Electrophoresis and electrofocusing on polyacrylamide gel in the study of native macromolecules. *Electrophoresis*. 29, 23-46.
18. Chrambach, A. (1987) The practice of quantitative gel electrophoresis. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 15, 52.
19. Commission Regulation. (1996) Reference method for the detection of cows' milk and caseinate in cheeses from ewes' milk, goats' milk and buffaloes' milk or mixtures of ewes', goats' and buffaloes' milk. EC no 1081/96 of 14 June 1996. *Official Journal of European Communities*. L142, 15-25.
20. Costes, B. – Fanen, P. – Goossens, M. – Ghanem, N. (1993) A rapid, efficient, and sensitive assay for simultaneous detection of multiple cystic fibrosis mutations. *Human Mutation*. 2, 185-191.
21. Cremonesi, L. – Firpo, S. – Ferrari, M. – Righetti, P.G. – Gelfi, C. (1997) Double-gradient DGGE for optimized detection of DNA point mutations. *Biotechniques*. 22, 326-330.
22. Dalmaso, A., Fontanella, E., Piatti, B., Civera, T., Rosati, S., & Bottero, M. T. (2004). A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Molecular and Cellular Probes*, 18, 81–87.

23. Das, S.K., Sengupta, D., Ghosh, D., Dutta, D. (2012): An innovative method of cellulose acetate membrane based isolation of mitochondria and mtDNA extraction from the liver of *Duttaphrynus melanostictus* (Schneider, 1799). *Indian Journal of Biotechnology*, 11(2): 171-175.
24. De, S. – Brahma, B. – Polley, S. – Mukherjee, A. – Banerjee, D. – Gohaina, M. – Singh, K.P. – Singh, R. – Datta, T.K. – Goswami, S.L. (2011) Simplex and duplex PCR assays for species specific identification of cattle and buffalo milk and cheese. *Food Control*. 22, 690-696.
25. Dhanasekaran, S. – Doherty, T.M. – Kenneth, J. (2010) Comparison of different standards for real-time PCR based absolute quantification. *Journal of Immunological Methods*. 354, 34-39.
26. Dheda, K. – Huggett, J.F. – Bustin, S.A. – Johnson, M.A. – Rook, G. – Zumla, A. (2004) Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*. 37, 112-119.
27. Di Pinto, A. – Forte, V.T. – Conversano, M.C. – Tantillo, G.M. (2005) Duplex polymerase chain reaction for detection of pork meat in horse meat fresh sausages from Italian retail sources. *Food Control*. 16, 391-394.
28. Dooley, J.J. – Paine, K.E. – Garrett, S.D. – Brown, H.M. (2004) Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. *Meat Science*. 68, 431-438.
29. Draisci, R. – Palleschi, L. – Ferretti, E. – Lucentini, L. – Cammarata, P. (2000) Quantitation of anabolic hormones and their metabolites in bovine serum and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 870, 511-522.

30. Fei, S. – Okayama, T. – Yamanoue, M. – Nishikawa, I. – Mannen, H. – Tsuji, S. (1996) Species identification of meat and meat products by PCR. *Animal Science and Technology (Japan)*. 67, 900-905.
31. Fésüs, L. – Komlósi, I. – Varga, L. – Zsolnai, A. (2000) Molekuláris genetikai módszerek alkalmazása az állattenyésztésben. *Agroinform Kiadó és Nyomda Kft.*, Budapest.
32. Fischer, S.G. – Lerman, L.S. (1979) Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell*. 16, 191-200.
33. Giovannacci, I. – Guizard, C. – Carlier, M. – Duval, V. – Martin, J.L. – Demeulemester, C. (2004) Species identification of meat products by ELISA. *International Journal of Food Science and Technology*. 39, 863-867.
34. Girish, P.S. – Anjaneyulu, A.S.R. – Viswas, K.N. – Shivakumar, B.M. – Anand, M. – Patel, M. – Sharma, B. (2005) Meat species identification by polymerase chain reaction-restrictionfragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Science*. 70, 107-112.
35. Goebel, A.M. – Donnelly, J.M. – Atz, M.E. (1999) PCR primers and amplification methods for 12S ribosomal DNA, the control region, cytochrome oxidase I, and cytochrome b in bufonids and other frogs, and an overview of PCR primers which have amplified DNA in amphibians successfully. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 11, 163-199.
36. Guldberg, P. – Guttler, F. (1994) „Broad-range” DGGE for single-step mutation scanning of entire genes: application to human phenylalanine hydroxylase gene. *Nucleic Acids Research*. 22, 880-881.

37. Hajósné Novák, M. (1999) Genetikai variabilitás a növénynemesítésben. Mezőgazda Kiadó
38. Haran, T.E. – Kahn, J.D. – Crothers, D.M. (1994) Sequence elements responsible for DNA curvature. *Journal of Molecular Biology*. 244, 135-143.
39. Hartwig, M. – Hartmann, S. – Steinhart, H. (1997) Physiological quantities of naturally occurring steroid hormones (androgens and progestogens), precursors and metabolites in beef of differing sexual origin. *European Food Research and Technology*. 205, 5–10.
40. Haunshi, S. – Basumatary, R. – Girish, P.S. – Doley, S. – Bardoloi, R.K. – Kumar, A. (2009) Identification of chicken, duck, pigeon and pig meat by species-specific markers of mitochondrial origin. *Meat Science*. 83, 454-459.
41. Hayashi, K. (1991) PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods and Applications*. 1, 34-38.
42. Hayashi, K. (1992) PCR-SSCP: A method for detection of mutations. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*. 9, 73-79.
43. Hayashi, K. (1999) Recent enhancements in SSCP. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*. 14, 193-196.
44. Haza, A.I. – Morales, P. – Martín, R. – García, T. – Anguita, G. – González, I. – Sanz, B. – Hernández, P.E. (1995) Immunoreactivity of goats' milk casein fractionated by ionexchange chromatography. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 43, 2025-2029.

45. He H., Hong X., Feng Y., Wang Y., Ying J., Liu Q., Qian Y., Zhou X., Wang D. (2015). Application of Quadruple Multiplex PCR Detection for Beef, Duck, Mutton and Pork in Mixed Meat. *Journal of Food and Nutrition Research*, 3(6), 392-398.
46. Horreo, J.L. – Ardura, A. – Pola, I.G. – Martinez, J.L. – Garcia-Vazquez, E. (2012) Universal primers for species authentication of animal foodstuff in a single polymerase chain reaction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93, 354-361.
47. Hou B., Meng X., Zhang L., Guo J., Li S., Jin H. (2015). Development of a sensitive and specific multiplex PCR method for the simultaneous detection of chicken, duck and goose DNA in meat products. *Meat Science*, 101 90-94.
48. Jones, B.M. – Knapp, L.A. (2009) Temporal temperature gradient electrophoresis for detection of single nucleotide polymorphism [In: Komar, A.A. Single nucleotide polymorphisms methods and protocols, Second Edition] Humana Press, 153-164.
49. Karabasanavar N. S., Singh S., Kumar D., Shebannavar S. N. (2014). Detection of pork adulteration by highly-specific PCR assay of mitochondrial D-loop. *Food Chemistry*, 145 530-534.
50. Karapanagiotidis, I.T. – Bell, M.V. – Little, D.C. – Yakupitiyage, A. – Rakshit, S.K. (2006). Polyunsaturated fatty acid content of wild and farmed tilapias in Thailand: Effect of aquaculture practices and implications for human nutrition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4304–4310.
51. 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.

52. Khamnamtong, B., Klinbunga, S., Menasveta, P. (2005). Species identification of five Penaeid shrimps using PCR-RFLP and SSCP analyses of 16 S ribosomal DNA. *J. Biochem.Mol. Biol.* 38, 491–499.
53. Khawar, A., Bhatti, I.A., Khan, Q.M., Khan, A.I., Asi, M.R., Ali, T. (2010) Evaluation of irradiation in foods using DNA Comet assay. *Journal of Food Science and Technology.* 48, 106-109.
54. Kocher, T.D. – Thomas, W.K. – Mayer, A. – Edwards, S.V. – Paabo, S. – Villablanca, F.X. – Wilson, A.C. (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86, 6196-6200.
55. Koressaar, T. – Remm, M. (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics.* 23, 1289-1291.
56. Kozulic, B. (1995) Models of gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry.* 231, 1-12.
57. Krcmar, P., & Rencova, E. (2003). Identification of species-specific DNA in feedstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7655–7658.
58. Lazaro, D.R. – D’Agostino, M. – Pla, M. – Cook, N. (2004) Construction strategy for an Internal amplification control for real-time diagnostic assays using nucleic acid sequence-based amplification: development and clinical application. *Journal of Clinical Microbiology.* 42, 5832-5836.

59. Lindstedt, B.A. – Heir, E. – Vardund, T. – Kapperud, G. (2000) Fluorescent amplified fragment length polymorphism genotyping of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing. *Journal of Clinical Microbiology*. 38, 1623-1627.
60. Lipman, D.J. – Pearson, W.R. (1985) Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science*. 227, 1435-1441.
61. Locke, B.R. – Trinh, S.H. (1999) When can the Ogston-Morris-Rodbard-Chrambach model be applied to gel electrophoresis? *Electrophoresis*. 20, 3331-3334.
62. López-Calleja, I.M. – González, I. – Fajardo, V. – Hernández, P.E. – García, T. – Martín, R. (2007) Application of an indirect ELISA and a PCR technique for detection of cows' milk in sheep's and goats' milk cheeses. *International Dairy Journal*. 17, 87-93.
63. Macek, M.Jr. – Mercier, B. – Mackova, A. – Miller, P.W. – Hamosh, A. – Ferec, C. – Cutting, G.R. (1997) Sensitivity of the denaturing gradient gel electrophoresis technique in detection of known mutations and novel Asian mutations in the CFTR gene. *Human Mutation*. 9, 136-147.
64. Mafra, I., Roxo, Á., Ferreira, M.P.L.V.O.I., Oliveira, M.B.P.P. (2007) A duplex polymerase chain reaction for the quantitative detection of cows' milk in goats' milk cheese. *International Dairy Journal*. 17, 1132-1138.
65. Mane, B.G. – Mendiratta, S.K. – Tiwari, A.K. (2009) Polymerase chain reaction assay for identification of chicken in meat and meat products. *Food Chemistry*. 116, 806-810.

66. Martín, I. – García, T. – Fajardo, V. – López-Calleja, I. – Hernández, P.E. – González, I. – Martín, R. (2007) Species-specific PCR for the identification of ruminant species in feedstuffs. *Meat Science*. 75, 120-127.
67. 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.
68. Maxam, A.M. – Gilbert, W. (1977) A new method for sequencing DNA. *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.* 74, 560-564.
69. Mayer, H.K. – Heidler, D. – Rockenbauer, C. (1997) Determination of the percentages of cows', ewes' and goats' milk in cheese by isoelectric focusing and cation-exchange HPLC of γ - and para- κ -caseins. *International Dairy Journal*. 7, 619-628.
70. Merrill, C.R. – Goldman, D. – Van Keuren, M.L. (1984) Gel protein stains: Silver stains. In *Methods and Enzymology*. 104, 441-447.
71. Meyer, R. – Höfelein, C. – Lüthy, J. – Candrian, U. (1995) Polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism analysis: A simple method for species identification in food. *Journal of AOAC International*. 78, 1542-1551.
72. Meyer, R., Candrian, U., Lüthy, J. (1994) Detection of pork in Heated Meat Products by Polymerase Chain Reaction (PCR). *Journal of Association of Analytical Communities International*, 77, 617-622.

73. Monteil-Sosa, J.F. – Ruiz-Pesini, E. – Montoya, J. – Roncalés, P. – López-Pérez, M.J. – Pérez-Martos, A. (2000) Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 2829-2832.
74. 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.
75. Mullis, K.B. – Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155, 335-350.
76. Mulloy, K.B. (1996) Two case reports of neurological disease in coal mine preparation plant workers. *American Journal of Industrial Medicine*. 30, 56-61.
77. Myers, R.M. – Fischer, S.G. – Lerman, L.S. – Maniatis, T. (1985) Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*. 13, 3131-3145.
78. Myers, R.M. – Maniatis, T. – Lerman, L.S. (1987) Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods in Enzymology*. 155, 501-527.
79. Nakashita, R. – Suzuki, Y. – Akamatsu, F. – Iizumi, Y. – Korenaga, T. – Chikaraishi, Y. (2008). Stable carbon, nitrogen, and oxygen isotope analysis as a potential tool for verifying geographical origin of beef. *Analytica Chimica Acta*. 617, 148–152.

80. Negrini, R. – Nicoloso, L. – Crepaldi, P. – Milanesi, E. – Marino, R. – Perini, D. (2008). Traceability of four European Protected Geographic Indication (PGI) beef products using Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) and Bayesian statistics. *Meat Science*. 80, 1212–1217.
81. Nordström, T. – Ronaghi, M. – Forsberg, M. – Forsberg, L. – DeFaire, U. – Morgenstern, R. – Nyren, P. (2000) Direct analysis of single-nucleotide polymorphism on double stranded DNA by pyrosequencing. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 31, 107-112.
82. Ogura, M. – Agata, Y. – Watanabe, K. – McCormick, R.M. – Hamaguchi, Y. – Aso, Y. – Mitsuhashi, M. (1998) RNA chip: quality assessment of RNA by microchannel linear gel electrophoresis in injection-molded plastic chips. *Clinical Chemistry*. 44, 2249-2255.
83. Oohara, I. (1997). Detection of single strand conformation polymorphisms (SSCPs) on mitochondrial DNA fragments between two domesticated strains of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fisheries Sci.* 63, 151–152.
84. Ostling, O., Johanson, K.J. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 123, 291-298.
85. Pearson, W.R. – Lipman, D.J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of the United States of America*. 85, 2444-2448.
86. Peters, H. – Robinson, P.N. (2010) Temperature and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. [In: Patrinos, G.P. – Ansorge, W. *Molecular Diagnostics*, Second Edition.] Elsevier. 75-86.

87. Pfaff, M.W. – Tichopad, A. – Prgomet, C. – Neuvians, T.P. (2005) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*. 26, 509-515.
88. Plath, A. – Krause, I. – Einspanier, R. (1997) Species identification in dairy products by three different DNA-based techniques. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*. 205, 437-441.
89. Prado, M. – Calo-Mata, P. – Villa, T.G. – Cepeda, A. – Barros-Velázquez, J. (2007) Co-amplification and sequencing of a cytochrome b fragment affecting the identification of cattle in PCR-RFLP food authentication studies. *Food Chemistry*. 105, 436-442.
90. Primrose, S. – Woolfe, M. – Rollinson, S. (2010) Food forensics: methods for determining the authenticity of foodstuffs. *Trends in Food Science and Technology*. 104, 60-65.
91. Quesada, M.A. (1997) Replaceable polymers in DNA sequencing by capillary electrophoresis. *Current Opinions in Biotechnology*. 8, 82-93.
92. Radonic, A. – Thulke, S. – Mackay, I.M. – Landt, O. – Siegert, W. – Nitsche, A. (2004) Guideline for reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 313, 856-862.
93. Rastogi, G. – Dharne, M.S. – Walujkar, S. – Kumar, A. – Patole, M.S. – Shouche, Y.S. (2007) Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers. *Meat Science*. 76, 666-674.

94. Rehbein, H., Mackie, I.M., Pryde, S., Gonzales-Sotelo, C., Medina, I., Perez-Martin, R., Quinteiro, J., Rey-Mendez, M. (1999). Fish species identification in canned tuna by PCR-SSCP: validation by a collaborative study and investigation of intra-species variability of the DNA-patterns. *Food Chem.* 64, 263–268.
95. Richter, W. – Krause, I. – Graf, C. – Sperrer, I. – Schwarzer, C. – Klostermeyer, H. (1997) An indirect competitive ELISA for the detection of cow's milk and caseinate in goats' and ewes' milk and cheese using polyclonal antibodies against bovine γ -caseins. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung.* 204, 21-26.
96. Righetti, P.G. – Gelfi, C. (1997) Electrophoresis gel media: the state of the art. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.* 699, 63-75.
97. Righetti, P.G. (1989) Of matrices and men. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods.* 19, 1-20.
98. Robin, E.D. – Wong, R. (1988) Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *Journal of Cellular Physiology.* 136, 507-513.
99. Rodriguez, M.A. – García, T. – González, I. – Asensio, L. – Hernández, P.E. – Martín, R. (2004) PCR identification of beef, sheep, goat and pork in raw and heat-treated meat mixtures. *Journal of Food Protection.* 67, 172-177.
100. Rodriguez, M.A. – García, T. – González, I. – Hernández, P.E. – Martín, R. (2005) TaqMan real-time PCR for detection and quantitation of pork in meat mixtures. *Meat Science.* 70, 113-120.

101. Saiki, R.K. – Scharf, S. – Faloona, F. – Mullis, K.B. – Horn, G.T. – Erlich, H.A. – Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230, 1350-1354.
102. Sambrook, J. – Russel, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.) Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
103. Sanger, F. – Nicklen, S. – Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.* 74, 5463-5467.
104. Santos, C.G. – Melo, V.S. – Amaral, J.S. – Estevinho, L. – Oliveira, M.B.P.P. – Mafra, I. (2012) Identification of hare meat by a species-specific marker of mitochondrial origin. *Meat Science*. 90, 836-841.
105. Sasazaki, S. – Itoh, K. – Arimitsu, S. – Imada, T. – Takasuga, A. – Nagaishi, H. – Takano, S. – Mannen, H. – Tsuji, S. (2004) Development of breed identification markers derived from AFLPin beef cattle. *Meat Science*. 67, 275-280.
106. Sawyer, J. – Wood, C. – Shanahan, D. – Gout, S. – McDowell, D. (2003) Real-time PCR for quantitative meat species testing. *Food Control*. 14, 579-583.
107. Schievehövel, K. – Rehbein, H. (2013) Differentiation of Sparidae species by DNA sequence analysis, PCR-SSCP and IEF of sarcoplasmic proteins. *Food Chemistry*. 138, 154-160.

108. Sievers, F. – Wilm, A. – Dineen, D.G. – Gibson, T.J. – Karplus, K. – Li, W. – Lopez, R. – McWilliam, H. – Remmert, M. – Söding, J. – Thompson, J.D. – Higgins, D.G. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*. 7, 1-6.
109. Sigmon, J. – Larcom, L.L. (1996) The effect of ethidium bromide on mobility of DNA fragments in agarose gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 17, 1524-1527.
110. Skarpeid, H.J. – Kvaal, K. – Hildrum, K.I. (1998). Identification of animal species in ground meat mixtures by multivariate analysis of isoelectric focusing protein profiles. *Electrophoresis*, 19, 3103–3109.
111. Soares, S. – Amaral, J.S. – Mafra, I. – Oliveira, M.B.P.P. (2010) Quantitative detection of poultry meat adulteration with pork by a duplex PCR assay. *Meat Science*. 85, 531-536.
112. Soares, S., Amaral, J.S., Oliveira, M.B.P.P., Mafra, I. (2013) A SYBR Green real-time PCR assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products. *Meat Science*. 94, 115-120.
113. Sripairoj, K., Klinbunga, S., Kamonrat, W., Nanakorn, U. (2010) Species identification of four economically important Pangasiid catfishes and closely related species using SSCP markers. *Aquaculture*. 308, S47-S50.
114. Stamoulis, P. – Stamatis, C. – Sarafidou, T. – Mamuris, Z. (2010) Development and application of molecular markers for poultry meat identification in food chain. *Food Control*. 21, 1061-1065.

115. Syvanen, J.R. – Aalto-Setälä, K. – Harju, L. – Kontula, K. – Soderlund, H. (1990) A primer-guided nucleotide incorporation assay in the genotyping of apolipoprotein E. *Genomics*. 8, 684-692.
116. Thellin, O. – Zorzi, W. – Lakaye, B. – De Borman, B. – Coumans, B. – Henne, G. – Grisar, T. – Igout, A. – Heinen, E. (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology*. 75, 197-200.
117. Theophilus B. D. M., Rapley R. Wallace, A. J. (2002) PCR Mutation Detection Protocols. *Methods in Molecular Biology*, 187, 151-163.
118. Thomas, F. – Jamin, E. – Wietzerbin, K. – Guerin, R. – Lees, M. - Morvan, E. (2008). Determination of origin of Atlantic salmon (*Salmo salar*): The use of multiprobe and multielement isotopic analyses in combination with fatty acid composition to assess wild or farmed origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 989–997.
119. Tisza, Á., Csikós, Á., Simon, Á., Gulyás, G., Jávör, A., Czeglédi, L. (2016) Identification of poultry species using polymerase chain reaction single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) and capillary electrophoresis single strand conformation polymorphism (CE-SSCP) methods. *Food Control*. 59, 430-438.
120. Tominaga, T. (2007) Rapid determination of multi-locus sequence types of *Listeria monocytogenes* by microtemperature-gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*. 70, 471-478.
121. Tully, L.A. – Parsons, T.J. – Steighner, R.J. – Holland, M.M. – Marino, M.A. – Prenger, V.L. (2000) A sensitive denaturing gradient gel electrophoresis assay reveals a high frequency of heteroplasmy in hypervariable region 1 of the human mtDNA control region. *American Journal of Human Genetics*. 67, 432-443.

122. Udvardi, M.K. – Czechowski, T. – Scheible, W.R. (2008) Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *Plant Cell*. 20, 1736-1737.
123. Untergrasser, A. – Cutcutache, I. – Koressaar, T. – Ye, J. – Faircloth, B.C. – Remm, M. – Rozen, S.G. (2012) Primer3 – new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. 40, 115.
124. Vallejo-Cordoba, B. – Cota-Rivas, M. (1998). Meat species identification by linear discriminant analysis of capillary electrophoresis protein profiles. *Journal of Capillary Electrophoresis*. 5, 171–175.
125. Verbeek, F., Koppen, G., Schaeken, B., Verschaeve, L. (2007) Automated detection of irradiated food with the comet assay. *Radiation Protection Dosimetry*. 128, 421-426.
126. Vos, P. – Hogers, R. – Bleeker, M. – Reijans, M. – van de Lee, T. – Hornes, M. – Frijters, A. – Pot, J. – Peleman, J. – Kuiper, M. – Zabeau, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23, 4407-4414.
127. Wang, Q. – Zhang, X. – Zhang, H-Y. –Zhang, J. – Chen, G-Q. – Zhao, D-H. – Ma, H-P. – Liao, W-J. (2010) Identification of 12 animal species meat by T-RFLP on the 12S rRNA gene. *Meat Science*. 85, 265-269.
128. Williams, J.G.K. – Kubelik, A.R. – Livak, K.L. – Rafalski, J.A. – Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18, 6531-6535.

129. Wise, L.D. – Gordon, L.R. – Soper, K.A. – Duchai, D.M. – Morrissey, R.E. (1995) Developmental neurotoxicity evaluation of acrylamide in Sprague-Dawley rats. *Neurotoxicology and Teratology*. 17, 189-198.
130. Wolf, C. – Burgener, M. – Hübner, P. – Lüthy, J. (2000) PCR-RFLP analysis of mitochondrial DANN: differentiation of fish species. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. 33, 144-150.
131. Yoshino, K. – Nishigaki, K. – Husimi, Y. (1991) Temperature sweep gel electrophoresis: a simple method to detect point mutations. *Nucleic Acids Research*. 19, 3153.
132. Zipper, H. – Brunner, H. – Bernhagen, J. – Vitzthum, F. (2004) Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research*. 32, e103.
133. Zoller, P. – Redila-Flores, T. – Chu, D. – Patel, A. (2005) Temporal temperature gradient electrophoresis: A powerful technique to screen mutations. <http://www.biocompare.com/Application-Notes/42665-Temporal-Temperature-Gradient-Electrophoresis-A-Powerful-Technique-To-Screen-Mutations/#top>
134. Zsolnai, A. – Anton, I. – Kuhn, C. – Fésüs, L. (2003) Detection of single-nucleotide polymorphisms coding for three ovine prion protein variants by primer extension assay and capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 24, 634-638.
135. Zsolnai, A. – Orbán, L. – Chrambach, A. (1993) Agarose electrophoresis of DNA in discontinuous buffers, using a horizontal slab apparatus and a buffer system with improved properties. *Electrophoresis*. 14(3), 179-184.

136. Zsolnai, A. – Orbán, L. (1999) Accelerated separation of random complex DNA patterns in gels: comparing the performance of discontinuous and continuous buffers. *Electrophoresis*. 20(7), 1462-1468.
137. Zsolnai, A. – Tóth, G. – Molnár, J. – Stéger, V. – Marincs, F. – Jánosi, A. – Ujhelyi, G. – Koppányné Szabó, E. – Mohr, A. – Anton, I. – Szántó-Egész, R. – Sipos, R. – Egerszegi, I. – Dallmann, K. – Tóth, P. – Micsinai, A. – Brüssow, K.P. – Rátky, J. (2013) Looking for breed differentiating SNP loci and for a SNP set for parentage testing in Mangalica. *Archiv Tierzucht*. 56, 200-207.
138. Internet 1: <http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>
139. Internet 2: <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>
140. Internet 3: http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/irradiation/137842001_en.pdf



Nyilvántartási szám: DEENK/266/2015.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Csikós Ádám
Neptun kód: EN4NXN
Doktori Iskola: Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10047736

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Magyar nyelvű tudományos közlemény(ek) hazai folyóiratban (2)

1. **Csikós Á.**, Simon Á., Homonai K., Gulyás G., Tisza Á., Tamás A., Reglődi D., Jávor A., Czeglédi L.: Polimorfizmus keresése a szarvasmarha hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid 5. exonjában.
Agrártud. közl. 65, 17-20, 2015. ISSN: 1587-1282.
2. **Csikós Á.**, Simon Á., Tisza Á., Gulyás G., Jávor A., Czeglédi L.: PCR-TTGE módszer alkalmazása DNS mutációk kimutatására.
Agrártud. közl. 57, 21-25, 2014. ISSN: 1587-1282.

Idegen nyelvű tudományos közlemény(ek) hazai folyóiratban (1)

3. **Csikós, Á.**, Hodzic, A., Pasic-Juhás, E., Jávor, A., Hrkovic-Porobija, A., Goletic, T., Gulyás, G., Czeglédi, L.: Applicability and sensitivity of PCR SSCP method for milk species identification in cheese.
Acta Aliment. "Accepted by Publisher" (2016) ISSN: 0139-3006.
IF:0.274 (2014)





Idegen nyelvű tudományos közlemény(ek) külföldi folyóiratban (2)

4. Tisza, Á., **Csikós, Á.**, Simon, Á., Gulyás, G., Jávor, A., Czeglédi, L.: Identification of poultry species using polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) and capillary electrophoresis-single strand conformation polymorphism (CE-SSCP) methods.
Food Control. 59, 430-438, 2016. ISSN: 0956-7135.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.006>
IF:2.806 (2014)
5. Simon, Á., Tisza, Á., **Csikós, Á.**, Jávor, A., Czeglédi, L.: Detection of pig meat, liver and lard in beef by CE-SSCP.
Poljoprivreda. 21 (1), 212-215, 2015. ISSN: 1330-7142.
DOI: <http://dx.doi.org/10.18047/poljo.21.1.sup.50>

Magyar nyelvű konferencia közlemény(ek) (2)

6. Tisza Á., Simon Á., **Csikós Á.**, Jávor A., Gulyás G., Czeglédi L.: Kapilláris elektroforézis - egyszálú konformációs DNS polimorfizmus (CE-SSCP) módszer alkalmazása a házigalamb (*Columba livia domestica*) DNS mintázatának meghatározásához.
In: Tavaszi Szél Konferencia, Eger 2015. április 10-12. : Absztraktkötet 2015. Publio Kiadó, Budapest, 42, 2015. ISBN: 9789633977026
7. Simon Á., Gulyás G., **Csikós Á.**, Jávor A., Czeglédi L.: A szarvasmarha szőrszint befolyásoló MC1R géneváltozatok kimutatása PCR-SSCP módszerrel : [poszter].
In: XXXV. Óvári Tudományos Nap: A magyar és nemzetközi agrár- és élelmiszer-gazdaság lehetőségei : [előadások és poszterek teljes anyaga CD]. Szerk.: Schmidt R., Bali Papp Á., Nyugat-magyarországi Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, Mosonmagyaróvár, [1], 2014. ISBN: 9789633341940

Idegen nyelvű konferencia közlemény(ek) (1)

8. **Csikós, Á.**, Tisza, Á., Simon, Á., Gulyás, G., Jávor, A., Czeglédi, L.: Species identification in meat products by PCR-single strand conformation polymorphism and DNA sequencing.
In: Innovative researches for the future of agriculture and rural areas development : Vth International Scientific Symposium for PhD Students and Students of Agricultural Colleges, 18-20 September 2014 Bydgoszcz-Inowrocław, Poland. University of Technology and Life Sciences Press, Bydgoszcz, 42, 2014.



További Közlemények

Magyar nyelvű könyv(ek) (1)

9. Czeglédi L., **Csikós Á.**: Molekuláris biológiai technikák alkalmazása az élelmiszer-eredetvizsgálatban. 68 p., 2015.

Magyar nyelvű közlemény(ek) hazai folyóiratban (1)

10. Soltész B., Gulyás G., **Csikós Á.**, Koncsos G., Vass N., Oláh J., Jávor A., Czeglédi L.: Szarvasmarha és bivaly tej és tejtermékének elkülönítése DNS-alapú technika alkalmazásával.
Agrártud. közl. 49, 279-282, 2012. ISSN: 1587-1282.

Magyar nyelvű konferencia közlemény(ek) (1)

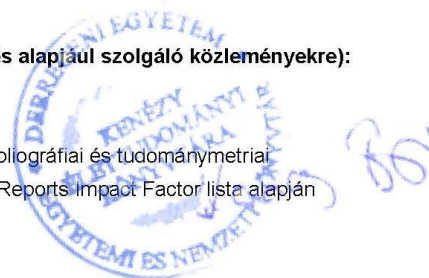
11. **Csikós Á.**: PCR-egyszálú DNS konformáció polimorfizmus alkalmazása állati eredetű élelmiszerek azonosítására.
In: Kari Tudományos Diákköri Konferencia. Kiadta: a Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-Élelmiszertudományi És Környezetgazdálkodási Kar Tudományos Diákköri Tanács, Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-Élelmiszertudományi És Környezetgazdálkodási Kar Tudományos Diákköri Tanács, Debrecen, 19, 2012.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 3,08

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 3,08

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2015.12.17.



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek Dr. Czeglédi Levente egyetemi adjunktusnak a doktori képzésem során nyújtott széleskörű támogatásáért, a kutatások elvégzéséhez szükséges feltételek megteremtéséért és szakmai munkám lelkiismeretes irányításáért.

Köszönettel tartozom Dr. Jávor András, valamint Dr. Komlósi István professzor uraknak, amiért tanszéki keretek között lehetővé tették, hogy doktori disszertációmhoz tartozó laboratóriumi munkámat az Állatgenetikai Laboratóriumban végezhettem el.

Külön köszönetet szeretnék mondani Dr. Gulyás Gabriella tanszéki mérnöknek a molekuláris genetikai módszerek elsajátítása során nyújtott segítségéért.

Szeretném megköszönni Dr. Mészár Zoltán egyetemi adjunktusnak a fluoreszcens mikroszkópia során nyújtott nélkülözhetetlen szakértelmét és segítségét.

A laboratóriumi munka során nyújtott segítségükért, szeretnék köszönetet mondani Simon Ádámnak és Tisza Ákosnak.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani az Állattenyésztési Tanszéken dolgozó valamennyi kollégának segítségükért és együttműködésükért.

Köszönettel tartozom családomnak és barátaimnak, amiért türelmükkel és támogatásukkal végig mellettem álltak.

NYILATKOZAT

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola keretében készítettem, a Debreceni Egyetem doktori (Ph.D.) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2015. december 07.

.....
a jelölt aláírása

NYILATKOZAT

Tanúsítom, hogy Csikós Ádám doktorjelölt 2013-2015 között a fent megnevezett Doktori Iskola keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult, az értekezés a jelölt önálló munkája. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2015. december 07.

.....
a témavezető(k) aláírása