

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**FAJAZONOSÍTÁS ÉLELMISZEREKBŐL PCR SSCP METODIKA
FEJLESZTÉSÉVEL**

Csikós Ádám

Témavezető: Dr. Czeglédi Levente



DEBRECENI EGYETEM
Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2015.

1. A doktori értekezés előzményei és célkitűzései

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 az élelmiszeripar egyes szereplői 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 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, kromatográfiai 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

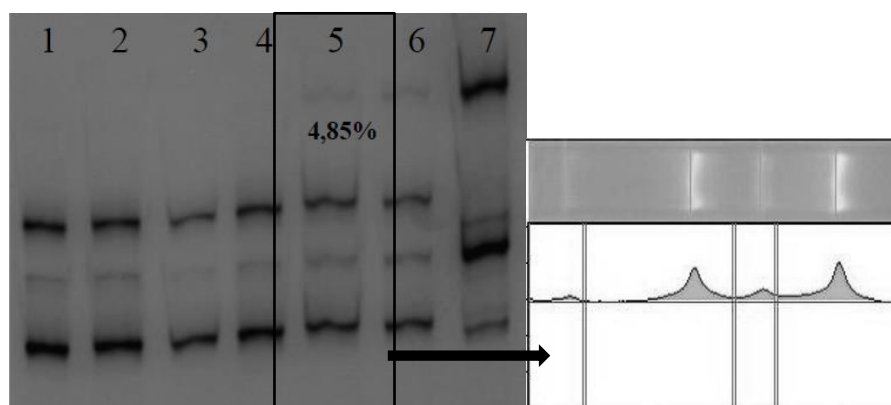
kombinálható bizonyos molekuláris genetikai metodikákkal – jelen esetben ez az egyszálú DNS konformáció polimorfizmus – így még specifikusabbá lehet tenni egy adott faj adott génjének a vizsgálatát, ezen keresztül pedig az élelmiszerekből történő fajazonosítás eredményessége növelhető. Jelen esetben az élelmiszerekből történő fajazonosítás lehetőségeinek vizsgálatát kereskedelmi forgalomból származó sajtok, hústermékek és haltestek felhasználásával szeretnék végrehajtani, emellett párhuzamosan a kvantitatív kimutatás lehetőségeit is tesztelni szeretnénk, illetve az érlelésnek alávetett termékek esetében a DNS degradáltsági fokáról szeretnénk képe kapni.

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

- tejkeverékek esetében a módszer érzékenységének vizsgálata, valamint sajttermékekből 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.

2. Tej és tejtermékének vizsgálata PCR-SSCP módszerrel

A módszer érzékenységének megállapítására meghatározott koncentrációjú DNS keverékeket, míg alkalmazhatóságának tesztelésére kereskedelmi forgalomból származó sajtokat használtunk. Univerzális primerpárt használtunk a mintákból származó DNS felszaporítására. 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. Az 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. 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 bivaly-szarvasmarha keverés esetében 3 v/v% keverési aránynál a gélelemző szoftver a szarvasmarha specifikus sáv intenzitását 4,85% értékben határozta meg a teljes sávintenzitáshoz viszonyítva. Ezzel objektív módon is bizonyítható a szarvasmarha jelenléte.



1 ábra: Szarvasmarha és bivaly kevert DNS-ével végzett poliakrilamid gélelektroforézis eredménye 0,1 v/v% - 5 v/v% tartományban.

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.

A módszer alkalmazhatóságát kereskedelmi forgalomban kapható sajtermékeken teszteltük. A vizsgálat során 39 magyarországi, 15 svájci és 66 boszniai, összesen 120 kereskedelmi forgalomból származó sajtot vetettünk alá PCR-SSCP módszerrel történő elemzésnek.

1. táblázat: 120 kereskedelmi forgalomból származó sajt PCR SSCP vizsgálati eredményei

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

3. 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

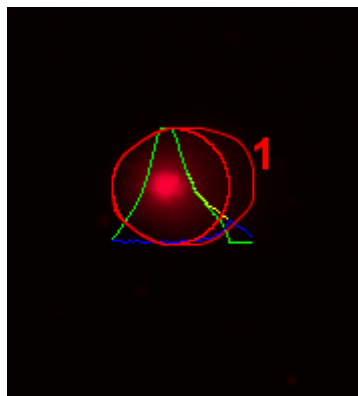
Meghatároztuk az relatív intenzitás értékek átlagait. A kalibrációs egyenlet megalkotásához az átlagos relatív intenzitás értékek és a hozzájuk tartozó keverési arányokat vettük figyelembe, így az ábrázolás során lineáris trendvonal alkalmazása mellett kaptuk meg a kalibrációs egyenletet. A kalibrációs 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. 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. A

LabWorks 4.0 programmal végzett kiértékelés eredményeképpen a 25 sajt esetében a szarvasmarha DNS százalékos aránya 4,68% és 77,68% között változott.

4. Üstökös gélelektroforézis

Az üstökös gélelektroforézis a sejtekben található DNS degradáltóságának mérésére szolgáló módszer. Jelen esetben a módszert hosszabb ideig – 6, 8, 10 és 18 hónap – érlelt sajtok vizsgálatára alkalmaztuk, amelynek során kontrollként friss tejet használtunk fel. Az eredményeinket a fluoreszcens mikroszkópia során kapott képek szolgáltatták. A tárgylemezek detektálása Nikon Eclipse 500 fluoreszcens mikroszkóppal, Peltier hűtött Olympus DP72 kamerával történt. Az alkalmazott objektív 20x nagyítással rendelkezett, vagyis a teljes rendszer nagyítása 200x volt. A tárgylemezek festése etídium-bromiddal történt. Ezeknek a képeknek az elemzése ImageJ 1.47 szoftver OpenComet kiegészítőjével (NIH, USA) történt.

Egy sejtet megvizsgálva ImageJ 1.47 OpenComet kiegészítőjével a szoftver alapján a feji részre vonatkozó arány 77,79%, míg a csóva aránya 22,21%. Látható, hogy a csóvára vonatkozó érték messze elmarad a feji részre vonatkozó értéktől.



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

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

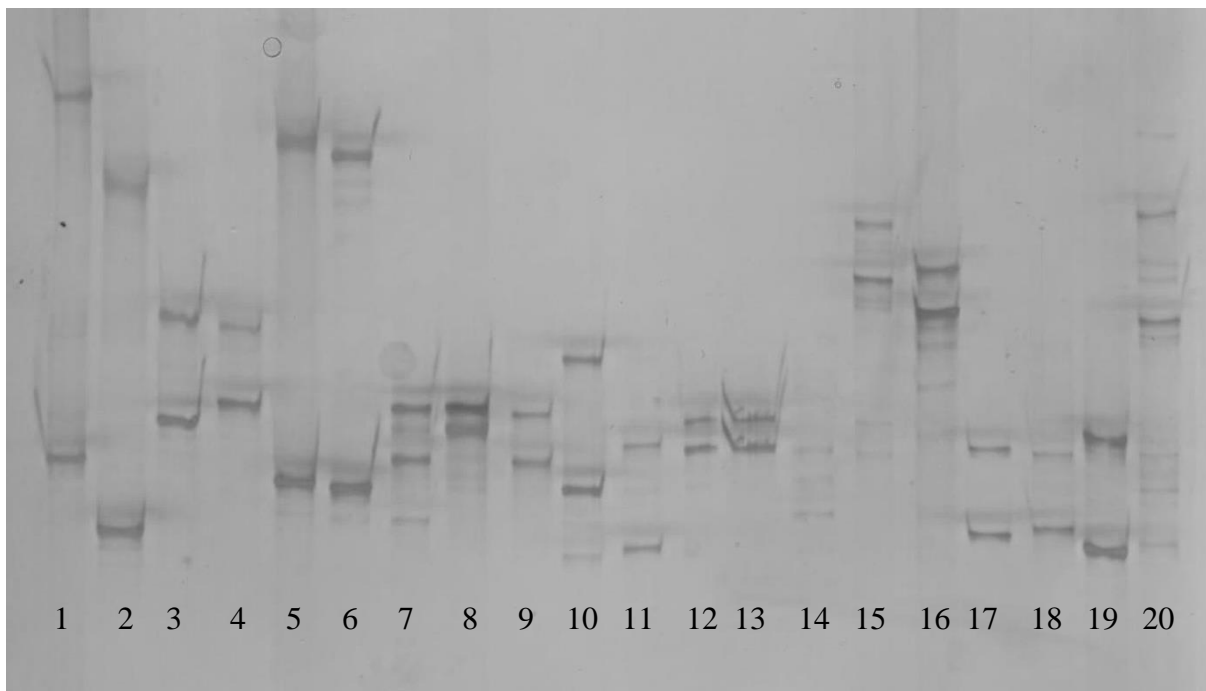
vonatkozó arányok átlaga 80,72%, a hozzátartozó szórás értéke 11,77. A csóva részre vonatkozó arányok átlaga 18,39%, a hozzátartozó szórás értéke 11,77. A 6, 8, 10 és 18 hónapig érlelt sajtok esetében nem volt megfigyelhető és értékelhető csóvaképződés.

Mivel az üstökös gélelektroforézis során az érlelt sajtok esetében nem volt megfigyelhető csóvaképződés, 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 gélelektroforézis során vizsgált minta esetében amplifikálható volt a kérdéses DNS szakasz.

5. 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 kacsa, pézsmaréce, házi lúd került vizsgálatra; a házasított 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. 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. Nem mutatott értékelhetően eltérő mintázatot, vagyis konformációs különbség nem állt fenn a juh-muflon minták esetében, hiszen ez egy fajt jelent, illetve a gím- és dámszarvas fajok között. Az eltérő sávmintázat az egyes fajok között, az adott szakaszon belül jelentkező eltéréseknek köszönhető. Ezek az eltérések egyszálú DNS esetében eltérő konformációkat eredményeznek. A 18 faj PCR-SSCP vizsgálattal kapott eredménye, az egyes fajok specifikus mintázatai a 3. ábrán láthatóak.



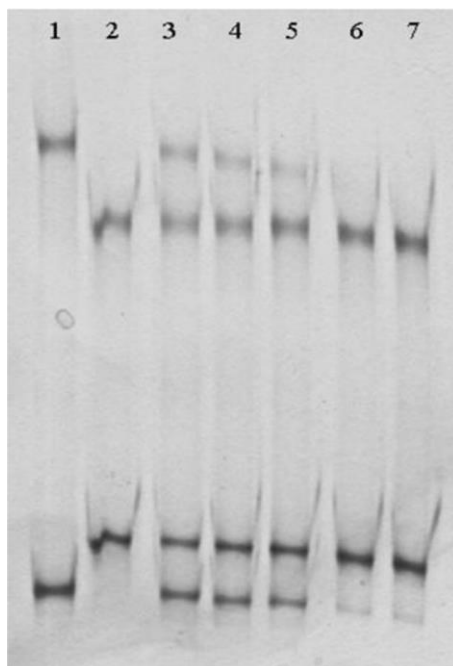
3. ábra: 18 faj kimutatása PCR-SSCP módszerrel.

A **2. táblázatban** a vizsgált fajok magyar és latin neve látható a fenti gélképen látható sorrendben feltüntetve.

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 kacsa	<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>

Sorszám	Magyar név	Latin név
15.	Ló	<i>Equus caballus</i>
16.	Házi nyúl	<i>Oryctolagus cuniculus domestica</i>
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 kacsa egységes koncentrációjú DNS-ét kevertük meghatározott arányokban. A keverékek 20; 10; 5; 1; 0,5%-ban tartalmazták a házi tyúk DNS-ét a házi kacsa DNS-ével szemben. A PCR-SSCP eredményeképpen kapott sávmintázatot a 4. ábrán mutatjuk be



4. ábra: Házi tyúk és házi kacsa DNS keverékek poliakrilamid elektroforetikus eredménye. 1: Házi tyúk pozitív kontroll; 2: házi kacsa 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 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 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 kacs/baromfi, 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 3. táblázatban foglaltuk össze.

3. táblázat: 65 kereskedelmi forgalomból származó hústermék PCR SSCP vizsgálati eredménye

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

Jelölt faj	Sajtminták száma	PCR-SSCP módszer kimutatott fajok
Pulyka/sertés	1	1 pulyka/házi tyúk
Baromfi/sertés	1	1 pulyka/házi tyúk/sertés
Lúd/sertés	1	1 lúd/sertés

Összességében 65 kereskedelmi terméket megvizsgálva 10 esetben volt kimutatható be nem vallott idegen faj jelenléte. Ez a vizsgált termékek 15,4%-át jelentette.

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 (... táblázat). 1-4. mintákat kontrollként használtuk fel. A minták teljes tömege 100 ± 1 mg volt. Az egyes minták elválasztása kapilláris elektroforézis rendszerben történt.

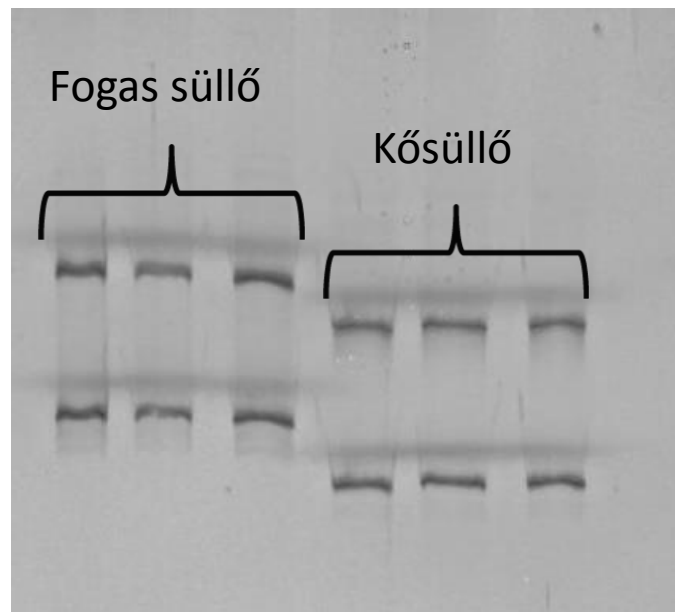
4. táblázat: Sertés és szarvasmarha húskeverékek

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 CE-SSCP eredménye alapján megállapítottuk, hogy ezzel a módszerrel 1v/v % keverési arány mellett tudjuk kimutatni a sertés zsír, a sertés karaj és a sertés máj 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. 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.

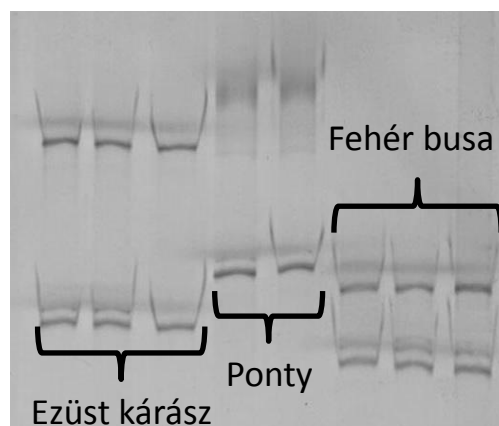
6. Halfajok azonosítása és elkülönítése PCR SSCP metodika alkalmazásával

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.



5. ábra: Fogassüllő és kősüllő elkülönítése PCR-SSCP módszerrel

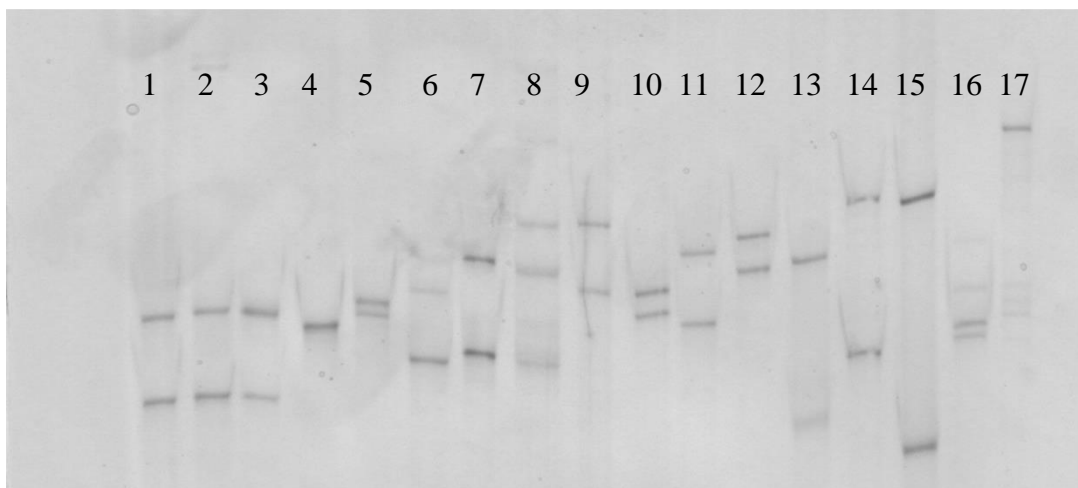
Az 5. ábrán fogassüllő és kősüllő sávmintázatai figyelhetőek meg. Megfigyelhető, hogy mindkét faj esetében jól elkülöníthető sávmintázatok alakulnak ki, amelyek lehetőséget teremtenek a két faj elkülönítésére.



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

A 6. ábrán ezüst kárász, ponty és fehér busa fajok elkülönítése történt PCR-SSCP rendszerben. Megfigyelhető, hogy mind a három faj esetében különböző sávmintázat alakul ki, vagyis egymástól elkülöníthetők. 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 7. ábrán 15 faj sávmintázatát lehet elkülöníteni. Az 1., 2. és 3. minták kereskedelmi forgalomból származó haltestek 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 kiemelő a 8. minta, ami esetében 3 sáv is megfigyelhető, ez jó példa arra, hogy több stabil konformer is kialakulhat a DNS denaturációja során.



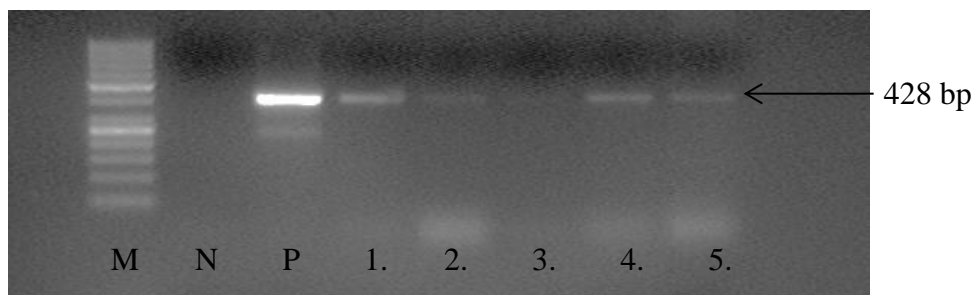
7. ábra: 1. szivárványos pisztráng, 2. pisztráng, 3. édesvízi pisztráng, 4. harcsa, 5. afrikai harcsa, 6. ponty, 7. ezüst kárász, 8. karikakeszeg, 9. dévérkeszeg, 10. vörös szárnyú keszeg, 11. szélhajtó küsz, 12. bodorka, 13. balin, 14. razbóra, 15. compó, 16. fogassüllő, 17. csuka

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 PCR-SSCP elvégzése után az alkalmazott univerzális primereket fluoreszcensen jelölt formában is felhasználtuk kapilláris elektroforézis – SSCP (CE-SSCP) végrehajtásához. 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.

Ponty DNS jelenlétének kimutatása bomlásnak indult mintából, illetve légylárvából

A ponty fajra specifikus primerek alkalmasságát 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 rothadt húsból, mind a húson növekvő lárvákból DNS-t izoláltunk, majd ponty specifikus primerpárral végeztünk el a kivont DNS-t templátként használva PCR reakciót.



8. ábra: A fenti ábrán légylárvákból származó DNS-sel, ponty specifikus primer felhasználásával végzett PCR reakció eredménye figyelhető meg. 1-5. Légylárvákból származó DNS-sel elvégzett PCR reakciók eredménye. M: 50 bp DNS létra. N: negatív kontroll. P: pozitív kontroll.

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.

7. 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 sajttermékeket, hústermékeket és halfajokat választottunk el PCR-egyszálú DNS konfomáció polimorfizmus módszer alkalmazásával. A szakirodalmat olvasva kevés olyan közlemény lelhető fel, ami foglalkozik a PCR-SSCP módszer alkalmazásával sajttermékek 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. Sajttermékek 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 sajtkészítmények 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 sajtkészítmények 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).

Sriphairoj 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 – érelt sajtokat vizsgáltunk. Eredetileg a módszert radioaktív sugárzásnak kitett emlős sejtenyészetek 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.

8. 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 kacsacsőr DNS izolátumait használtuk. 0,5%-os házi tyúkjelenlét is detektálható volt a házi kacsacsőr 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 szerettük 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 harcsa, afrikai harcsa, ponty, ezüst kárász, karikakeszeg, dévérkeszeg, vörös szárnyú keszeg, küsz, 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.

9. 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.

10. A tézisben idézett irodalmak jegyzéke

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.

Asensio, L., González, I., García, T., & Martín, R. (2008). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control*, 19, 1–8.

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.

Dalmasso, 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

Krcmar, P., & Rencova, E. (2003). Identification of species-specific DNA in feedstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7655–7658.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

Sriphairoj, 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.

Tisza, Á., Csikós, Á., Simon, Á., Gulyás, G., Jávora, 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.

Verbeek, F., Koppen, G., Schaeken, B., Verschaeve, L. (2007) Automated detection of irradiated food with the comet assay. *Radiation Protection Dosimetry*. 128, 421-426.

Internetes hivatkozás 3.: http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/irradiation/13784-2001_en.pdf

11. Publikációs jegyzék



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



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., Reglódi 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-Porobja, 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 génváltozatok 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.**, Koncos 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.

