

Debreceni Egyetem

Mezőgazdasági-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar

Állattenyésztési Tanszék

Tanszékvezető: Dr. Komlósi István

**PCR-EGYSZÁLÚ DNS KONFORMÁCIÓ POLIMORFIZMUS
ALKALMAZÁSA ÁLLATI EREDETŰ ÉLELMISZEREK
AZONOSÍTÁSÁRA**

Csikós Ádám

Molekuláris biológia MSc. II. évfolyam

Konzulens:

Dr. Czeglédi Levente

egyetemi adjunktus

Debrecen

2012

TARTALOMJEGYZÉK

Bevezetés	2
1. Témafelvetés	4
2. Szakirodalmi áttekintés	5
3. Anyag és módszer	12
3.1. Felhasznált bioinformatikai módszerek.....	12
3.2. Genomi DNS izolálása tejből	14
3.3. Genomi DNS izolálás sajtból	14
3.4. A DNS izolátumok mennyiségi ellenőrzése.....	15
3.5. A minták koncentrációinak egységesítése.....	15
3.6. PCR reakciók univerzális primerek felhasználásával	15
3.6.1. A polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction, PCR).....	15
3.6.2. Hőmérséklet grádiens PCR reakció	16
3.6.3. PCR reakció a négy primerpár alkalmazásával fajoként és a négy faj kevert DNS-ének felhasználásával	17
3.6.4. PCR reakciók különböző keverési arányokkal rendelkező DNS templátok felhasználásával	18
3.6.5. Agaróz gélelektroforézis.....	19
3.7. PCR-SSCP eljárás alkalmazása fajspecifikus poliakrilamid gélmintázatok kimutatásához ...	19
4. Eredmények és azok értékelése.....	22
4.1. Hőmérséklet grádiens PCR reakciók agaróz gélelektroforetikus eredményei	22
4.2. PCR-SSCP vizsgálatok poliakrilamid gélelektroforetikus eredményei	27
5. Következtetések és javaslatok.....	35
Összefoglalás	36
Köszönetnyilvánítás	38
Szakirodalmi jegyzék	39

BEVEZETÉS

Az emberi táplálkozás szempontjából kiemelkedő fontosságú élelmiszereknek minősülnek az egyes háziállatok tejei és az azokból készülő tejtermékek. A legelterjedtebb, tejet adó, háziiasított fajok a szarvasmarha (*Bos taurus*), a bivaly (*Bubalis domesticus*), a juh (*Ovis aries*) és a kecske (*Capra hircus*). A történelem folyamán végig az emberi élelmiszer-termelés és kereskedelem központi részét képezték és képezik jelenleg is a tejek és tejtermékek. A tej alapú élelmiszerek előállítása során időnként óhatatlanul előfordul azok nem megfelelő jelölése, esetenként hamisítása. A magasabb előállítási költségű tejekből készülő tejtermékek előállítási költségeit gyakran más fajokból származó alacsonyabb árú tejek alkalmazásával próbálták lentebb szorítani, ezzel természetesen a fogyasztót megkárosítva. Az elmúlt néhány évben, évtizedben egyre fontosabbá vált az, hogy az élelmiszerek összetevői milyen állatfajokból származnak. Elterjedt hamisítási gyakorlat, amikor a drágább juh, kecske vagy esetleg bivaly tejből készülő termék előállítási költségét úgy próbálják meg csökkenteni, hogy a gyártás során a sokkal olcsóbb tehéntejet keverik az említett fajok tejeivel, ugyanakkor a terméket változatlan áron hozzák forgalomba, megkárosítva ezzel a vásárlót.

Az Európai Közösség, majd később az Európai Unió (EU) törvényi szabályozást vezetett be a fentiekben ismertetett csalások megakadályozására. Megalkották az élelmiszerekre vonatkozó Protected Designation of Origin (PDO) megjelölést, ami szigorú keretek között definiálja az adott termék származási helyét, valamint az előállításának és termelésének körülményeit. Ugyanakkor az EU határain kívülről érkező termékek előállítása során a gyártókat nem köti ez az előírás, így szükséges lehet a nem uniós országokból érkező élelmiszerek összetevőinek alapos vizsgálatára, a fogyasztók védelme érdekében.

Az élelmiszerek vizsgálata során lehetőség van arra, hogy fajspecifikus biológiai markerek azonosításával fajazonosítást végezzenek, amely során megállapítják, hogy a termék címkézésén feltüntetett fajok vajon ténylegesen megtalálhatók az adott termékben, vagy azokat valamilyen másik fajjal helyettesítették a gyártás során. Az elmúlt évtizedekben jelentős számú analitikai, biokémiai és molekuláris biológiai technikát dolgoztak ki és alkalmaztak az élelmiszerekből történő fajazonosításra. Széleskörben elterjedt metodikák az immunológiai, kromatográfiás és elektroforetikus eljárások, amelyek nagy része rendkívül pontos, ugyanakkor a kivitelezési költségük viszonylag magasnak mondható. A termékekben található fajok detektálása többféle megközelítésben is történhet. A fehérjemeghatározásra alkalmazott módszerek közül említést érdemel az izoelektromos fókuszálás, a poliakrilamid gélelektroforézis, valamint e kettő kombinált változata, a pontosabb kimutatást és azonosítást lehetővé tevő kétdimenziós poliakrilamid

gélelektroforézis (2D-PAGE). A módszer során azonosított fehérjéket felépítő aminosavak pontos sorrendje is megállapítható tömegspektrometria alkalmazásával.

A fehérjék kimutatásán alapuló technikák mellett hasonlóan kiemelt szerepet kapnak a DNS alapú eljárások is. A fajspecifikus lánckezdő oligonukleotidokat (primer) alkalmazó multiplex PCR reakció alkalmas arra, hogy egyetlen mintán belül egy időben több faj jelenlétét is kimutassuk. A multiplex PCR reakciók mellett széleskörben alkalmazott módszer a PCR-restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (PCR-RFLP), amely során a PCR reakcióban felamplifikált DNS szakaszokat restrikciós enzimek segítségével fragmentálják, és agaróz gélelektroforézis segítségével azonosítják a fajokra jellemző eltérő nagyságú DNS darabokat. Említésre méltó, és a PCR-RFLP módszerhez képest kevesebb költséggel jár a PCR-egyszálú DNS konformáció polimorfizmus (PCR-SSCP). A módszer lényegét képezi, hogy a PCR reakció lejátszódása után, a felsokszorozott DNS szakaszokat megfelelő körülmények mellett egyszálúsítják, majd ezeket poliakrilamid gélen választják el egymástól, ahol a fajokra jellemző mintázat alakul ki, a bennük lévő szekvencia eltérések miatt.

A fent említett fehérje, valamint DNS alapú technikák mellett kidolgoztak zsírsav összetétel meghatározására alkalmas módszereket is. Ezeknek azonban jelentős hátránya, hogy sovány tejből készült termékek esetében nem alkalmazhatóak.

Az ismertetett kereskedelmi körülményeket figyelembe véve egyértelműen látható, hogy ezeknek a módszereknek az elterjedése és széleskörű alkalmazása meglehetősen indokolt, hiszen a csalások kiszűrése a fogyasztók, valamint a becsületes termelők védelmét szolgálja. Ugyanakkor meg kell jegyezni azt is, hogy a fentebb leírt módszerek némelyike olyan érzékeny kimutatást tesz lehetővé, hogy a mintából kimutatott kis mennyiségű szennyezés akaratlanul is bekövetkezhetett a gyártás során.

1. TÉMAFELVETÉS

Az élelmiszerek összetevőit adó fajok azonosítása a fogyasztók védelme és a termékhamisítások leleplezése érdekében kiemelkedő fontosságot élvez. Az alkalmazott kimutatási, azonosítási technikák viszonylagos magas költsége miatt igény van egy érzékeny, ugyanakkor költséghatékony fajazonosítási módszer kifejlesztésére.

Célunk volt egy olyan molekuláris biológiai módszer fejlesztése a fajok detektálása céljából, ami a fentebb megfogalmazott kritériumoknak megfelel, azaz eléggé érzékeny, de egyben költséghatékony is. Munkánk során juh, kecske, bivaly és szarvasmarha fajok elegytejeinek keverékeit, valamint kereskedelmi forgalomból származó sajtokat szeretnénk vizsgálni PCR-egyszálú DNS konformáció polimorfizmus (PCR-SSCP) alkalmazásával. A PCR-SSCP módszer alkalmazása lehetővé teszi, hogy a fajokat a közöttük meglévő szekvenciaeltérések alapján különítsük el egymástól. Bár az eltérés és annak pontos helye a szekvencián belül ismeretlen marad, a poliakrilamid gélen kapott, fajra jellemző mintázatok alkalmasak lehetnek a fajok azonosítására. Emellett a módszer nem igényli költséges vegyszerek, vagy eljárások további alkalmazását, mint például restrikciós enzimek vagy DNS szekvenáló felhasználását.

A vizsgálat tárgyát képező módszer fejlesztését laboratóriumi körülmények között összeállított mintákon – két faj elegytejének kevert mintája – végezzük el, míg a módszer alkalmazhatóságát kereskedelmi forgalomban kapható sajtokon teszteljük.

Ennek a technikának a térhódítása lehetővé tenné nem csak a tejtermékek, de más élelmiszeripari termékek összetevőinek faj, később pedig megfelelő markerek esetén a fajtaszintű azonosítását is.

2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az emberiség történelme kezdetén több állatfaj háziasítását is végrehajtotta, amikor felismerte azoknak előnyeit. Az emberek háziállatai közé került a domesztikáció időszakában a szarvasmarha (*Bos taurus*), a házi bivaly (*Bubalus domesticus*), a juh (*Ovis aries*) és a kecske (*Capra hircus*). Ezeket mind húsukért, mind a tejükért hasznosították. A későbbiekben az élelmezés szempontjából központi szerepet kaptak az ezekből a fajokból származó tejek és az azokból készülő tejtermékek, mint például a sajtok. Ez azzal magyarázható, hogy a tejtermékek több, az ember számára jelentős tápanyagot tartalmaznak. Ezek közé a tápanyagok közé sorolhatjuk a tejfélékben fellelhető fehérjéket, aminosavakat, zsírsavakat, vitaminokat, szénhidrátokat, valamint ásványi anyagokat. Kialakult ezeknek a tejeknek és tejtermékeknek a kereskedelme, valamint fokozatosan kialakultak tradicionális módon készülő speciális tejtermékek is, amelyek a rájuk jellemző tulajdonságokat csak adott származási helyükön és adott körülmények között tudták felvenni. Erre egy igen jó példa a széleskörben ismert francia roquefort márványsajt, amelyet a Dél-Franciaországban található Roquefort-sur-Soulzon környékének barlangjaiban érlelnek. Mivel ezek a különleges márkák és előállításuk az idők során egyre költségesebbé vált, többször előfordult az élelmiszerek hamisítása, amivel bizonyos termelők csökkenteni akarták saját előállítási költségeiket, viszont az eladási árakat ugyanazon a szinten szerették volna tartani. Ennek legelterjedtebb módja alacsonyabb árú tehéntejjel keverni a juh, kecske vagy bivaly tejet a gyártás során. Természetesen ez nem csak az itt említett roquefort sajtra vonatkozik, hanem bármely más tejtermékre is.

A termékek eredetvédelme és a fogyasztók védelme érdekében az Európai Unió (EU) törvényhozása megalkotta a Protected Designation of Origin (PDO) termékmegjelölési formát, amely meghatározza a termék származási helyét, a termelés környezeti feltételeit, valamint azt, hogy a termelés egyetlen lépése sem játszódhat le a megjelölt földrajzi régió kívül. Ugyanakkor, azoknak a termékeknek a gyártási folyamatát nem szabályozza a PDO megjelölés, amelyek nem EU tagországokból származnak, így azok esetében fokozottan indokolt lehet a termékek ellenőrzése (Plath és mtsai., 1997).

Jelenleg a világ tejtermelésének döntő többsége ehhez a négy fajhoz köthető. Legelterjedtebb a szarvasmarha tartása, de földrajzi és éghajlati, valamint takarmányozási adottságoktól függően előtérbe kerülhet más, tejet adó állatfaj tartása is, amennyiben az adott földrajzi terület nem alkalmas a szarvasmarhatartás számára (Mayer, 2005).

Magyarországon a Központi Statisztikai Hivatal (KSH) adatai alapján a 2011-es évben 694 ezer szarvasmarhát tartottak számon, amiből 450 ezer egyed gazdasági szervezetek gondozásában, 244 ezer egyed pedig egyéni gazdálkodók kezében volt. A gazdasági szervezetek így a szarvasmarha-állomány megközelítőleg 65 %-át, míg az egyéni gazdálkodók 35 %-át tartották fent. A juhállomány ugyanebben az évben meghaladta az egymillió egyedet, 1 millió 81 ezer egyedre volt tehető a számuk, amelynek 13 %-át, 137 ezer egyedet gazdasági szervezetek birtokoltak, míg a fennmaradó 87 %-ot, vagyis 944 ezer egyedet az egyéni gazdálkodók tartották. Szintén a KSH adatai alapján a magyar kecskeállomány messze elmarad az előző két faj mögött, mindössze 75 ezer egyedet számlál (I1).

A tehéntejtermelés a 2010-es évben meghaladta az egymilliárd litert, 1 milliárd 640 millió 600 ezer liter volt a mennyisége, ebből az adott évben az egy egyedre eső tejtermelés 6696 liternek adódott (I2). Ugyanezen évben a juhtej termelésének éves mennyisége 1 millió 769 ezer liter (I3), míg a kecsketej éves mennyisége 3 millió 742 ezer liter volt (I4). A KSH adatbázisában nem áll rendelkezésre hivatalos adat a magyarországi bivalyállományról, valamint a bivalytej-termelés mértékéről.

Az Európai Unió 27 tagállamának vonatkozásában elmondható, hogy a szarvasmarha-állomány 2010-ben 89 millió 442 ezer egyedet számlált (I5), a termelt tehéntej mennyisége pedig 147 millió 363 ezer tonnát tett ki (I6).

A magyarországi tehéntejfogyasztás a KSH 2010-es adatai alapján 67,5 liter, ami magasabb az uniós átlagnál, ugyanis az csak 63,03 liter. Ennek ellenére kijelenthető, hogy a magyarországi tehéntejfogyasztás az uniós országok között a középmezőnybe tartozik, mivel a legtöbb tehéntejet az írek fogyasztják, 131,1 litert, míg a legkevesebbet, 23 litert a bolgárok.

A tehéntej pontos összetételét meghatározó vizsgálatok kimutatták, hogy a tej szárazanyag-tartalma jelentősen függ annak zsírtartalmától. Azok a tényezők, amelyek képesek változtatni a tej zsírtartalmán egyben a szárazanyag-tartalom változását is maguk után vonják. A tej szárazanyag-tartalmának változását ezen túl befolyásolja a laktációs stádium, az évszakhatás és genetikai tényezők is, viszont azt is egyértelműen kimutatták, hogy a laktációnak jelentősebb szerepe van a szárazanyag-tartalom meghatározásában, mint az évszakhatásnak. A tej fehérjetartalmára vonatkozóan ugyanezt a megállapítást tették, mint a szárazanyag-tartalom esetében. A tej fehérjefrakciójának összetétele fajtánként változik. Megállapították, hogy a fajtákat két csoportba lehet sorolni, az egyik esetben a tej koncentráltabb, vagyis az összes fehérjére nézve a valódi fehérjék és a kazein aránya magasabb a savófehérjékhez viszonyítva, míg a másik csoportnál fordított a helyzet és itt a tej is hígabb összetételű. Az első csoportba tartozó tejek magasabb kazein

tartalmuk miatt sajtgtyártásra alkalmasabbak, míg a második csoport tejei folyadék formában történő elfogyasztásra (Csapó és Csapóné, 2009).

A tejben található zsír úgynevezett „zsírgolyócskákat” alkot, amelyek belsejében trigliceridek találhatóak, külsejüket koleszterin, foszfolipidek, fehérjék, A-vitamin és egyéb összetevők alkotják. A tejben található lipidek megközelítőleg 97 %-a triglicerid alakban lelhető fel, ezekhez képest a mono- és digliceridek mennyisége szinte elhanyagolható. A tehéntej zsírsav összetételével kapcsolatban elmondható, hogy több mint 400 zsírsav található meg benne. A zsírsav-összetételt több tényező is befolyásolja, amelyek közé sorolható a takarmányozás, akárcsak a fehérjék esetében az évszakhatás és a laktációs stádium, a fajta, valamint az állat egészségi állapota.

Fontos az emlősök tejében fellelhető diszacharid, a laktóz. Két formájára az módosulat terjedt el az élővilágban. Kémiai természetét tekintve redukáló diszacharid, ami egy galaktózból és egy glükózból áll össze. A laktóz fontos szerepet játszik a tej ozmózisnyomásának állandó szinten tartásában, valamint kiemelkedő fontosságú a tejtermékek gyártása során, mint a gyártás folyamán felhasznált mikrobák tápanyaga.

Az ember táplálkozásában szintén fontos szerepet játszanak a tejben található ásványi anyagok, valamint vitaminok. Az ásványi elemek két frakciója különíthető el. Ezek a makro- és a mikroelemek. A tejben található makroelemek közül legnagyobb koncentrációban a kálium található meg, majd utána rendre következik a kalcium, a klór, a foszfor, a nátrium, a kén és végül a magnézium. A mikroelemek esetében a legnagyobb koncentrációban a cink képviselteti magát, utána következik sorrendben a szilícium, alumínium, vas, stroncium, bór, ón, fluor, réz, jód, molibdén, mangán, arzén, ólom, szelén, nikkel, króm, higany, kadmium és végül a kobalt.

Ugyanilyen fontosságot élveznek a vitaminok, amelyek általánosan két csoportra, a vízben és a zsírban oldódó vitaminok csoportjára oszthatók. A tejben mindkét csoportba tartozó vitaminok képviseltetik magukat. A zsírban oldódó vitaminok közül legnagyobb mennyiségben az E-vitamin található meg, majd utána az A-vitamin, a K-vitamin és legkisebb koncentrációban a D-vitamin. A vízben oldódó csoport tagjai közül legnagyobb koncentrációban a kolin fordul elő, ezt követik csökkenő sorrendben: inozitol, C-vitamin, pantoténsav, B₂-vitamin, nikotinsav, B₆-vitamin, B₁-vitamin, folsav, biotin és végül a B₁₂-vitamin (Csapó és Csapóné, 2009).

A szarvasmarha, bivaly, juh és kecske tejéből egyaránt készítenek sajtokat. A sajtkészítés során elválik egymástól a savó és a túró, a túróban marad vissza a tejfehérjék nagy hányada, főleg kazeinként. A sajtok érlelése során rendkívül kevés laktóz marad meg a sajtban, a hosszú érlelési

idejű sajtokban gyakorlatilag nem marad laktóz. A sajtok legfontosabb ásványi anyaga a kalcium, mennyisége 400 és 850 mg között változik 100 g termékben (Szalayné Kónya, Zs., 2009).

A tejet tejoltó enzimek és savanyítás segítségével megalvasztják, a keletkezett alvadékat feldolgozzák, majd a savót kivonják belőle. Az alvadékból készítik el a sajtot, amit azonnal frissen, vagy érlelés után lehet fogyasztani. A sajtoknak több fajtáját különböztetjük meg az alapján, hogy mennyi ideig érlelik azokat:

- túrosajtok, amik gyártás után azonnal fogyaszthatók;
- lágysajtok, érlelési idejük 1-3 hét, például a Pálpusztai sajt;
- félkemény sajtok, érlelési idejük 2-6 hét, például a Trappista;
- kemény sajtok, érlelési idejük 2-6 hónap, például az Ementáli;
- reszelni való sajtok, érlelési idejük 1-2 év, például a Parmezán (Kukovics és mtsai, 2009).

Az elmúlt években az élelmiszeripari termékekből történő fajazonosítás kiemelkedő figyelmet kapott. Ezt a fokozott figyelmet a szigorodó kormányzati szabályozások is előremozdították (Bottero és mtsai., 2003). Nem csak a meghozott törvények és rendeleteket miatt fejlődik az élelmiszerekből történő fajazonosítás, hanem más gyakorlati megfontolások is szerepet játszanak ebben a tendenciában. Különösen fontos, hogy a fogyasztók pontosan legyenek tájékoztatva az egyes élelmiszerek összetételével kapcsolatban, ugyanis tejtermékek esetében elmondható, hogy számos tejfehérje van, amelyre súlyos allergiás reakció alakulhat ki (Abdel-Rahman és mtsai., 2007). Továbbá az tisztességtelen kereskedelmi verseny visszaszorítása és a vásárlók megbízható tájékoztatása miatt is szükség volt olyan eljárások kidolgozására, amelyek képesek a tejtermékekben található tehéntej százalékos arányának a megállapítására (Calvo és mtsai., 2002).

A tejtermékekkel végzendő analitikai és molekuláris biológiai vizsgálatok céljából számos eljárást dolgoztak ki, amelyek alkalmasak lehetnek a fajazonosítás elvégzésére (Addeo és mtsai., 1990a; Mayer, 2005). Ezek közé a technikák közé tartoznak az immunológiai, kromatográfiás és elektroforetikus eljárások. Ezeknek a többsége hosszas fejlesztési folyamaton haladt végig, amíg megfelelően érzékeny technikává vált az élelmiszerekkel végzendő munkavégzésben. Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy bár meglehetősen érzékeny és megbízható technikák tartoznak ebbe a csoportba, megvannak a hátrányaik is, amik közé a magas kivitelezési költség tartozik, valamint az a tény, hogy a legtöbb eljárás kevésbé alkalmazható hőkezelt termékek esetében (Abdel-Rahman és mtsai., 2007).

Számos módszert dolgoztak ki a tej zsírtartalmának és zsírsavösszetételének vizsgálatára, amelyek a tejben található különböző zsírsavak arányát, valamint a tej triglicerid összetételét hivatottak megállapítani. Ezeknek hatalmas hátránya, hogy a gyakorlatban nem alkalmazhatóak a sovány tehéntejjel végzett csalások kimutatására, ezért inkább olyan technikák fejlesztése indult meg, amelyek a tej fehérjefrakciójára koncentrálnak, alkalmazva a már említett immunológiai (Anguita és mtsai., 1996; Richter és mtsai., 1997), elektroforetikus (Amigo és mtsai., 1992; Commission Regulation, 1996), valamint kromatográfiás technikákat (Haza és mtsai., 1995; Mayer és mtsai., 1997). Az immunológiai módszerek közül az enzim-kapcsolt immunoszorbens assay (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) elterjedt módszerré vált, mivel kevesebb költséggel jár, mint más kifinomultabb módszerek, emellett könnyen és gyorsan végrehajtható, illetve ezeken túl automatizálható is (Giovannacci és mtsai., 2004). Kifejlesztettek egy indirekt, kompetitív ELISA-t, amivel lehetőség nyílt alacsony koncentrációban jelenlévő tehéntej kimutatása is, a kimutatási határ elérte a 1 v/v%-ot (García és mtsai., 1990).

Elektroforetikus technikák közül a tejben található kazein frakció vizsgálatára alkalmazták már az urea-poliakrilamid gélelektroforézist (urea-PAGE); a γ - és para- κ -kazeinek, valamint a savófehérjék vizsgálatára az izoelektromos fókuszálást (IEF). Az urea-PAGE az egyik legrégebbi elektroforetikus technika, amit a fajazonosításban felhasználnak (Foißy, 1981), alkalmas a tehéntej kimutatására más fajok tejeiből, viszont a sajtminták vizsgálatára alkalmatlanná válik, mert a sajtok érése során a kazeineknek több proteolitikus terméke jelenik meg, ami zavarja a tehéntejre jellemző α_{s1} -kazein, mint marker kimutatását. Az alkalmazott izoelektromos fókuszálás során a tehéntejben található γ_2 - és γ_3 -kazeinek jól elkülöníthetők a kecsketejre jellemző γ -kazein frakciótól, ugyanakkor hátránya az eljárásnak, hogy ugyanezen molekulák alapján a juh- és kecsketej nem különböztethető meg (Addeo és mtsai., 1990b). Ugyanezzel a módszerrel a tehéntej kimutatási határa 1 v/v%-nak adódik. A natív poliakrilamid gélelektroforézis teljes mértékben alkalmas arra, hogy a β -laktoglobulin vizsgálatával biztosan elkülönítsék a tehéntejet a juh vagy a kecske tejétől (Amigo és mtsai., 1992).

Az elektroforetikus és immunológiai technikákon túl a harmadik jelentős csoport a kimutatási módszerek sorában a kromatográfiás eljárások csoportja. A tej kazeinfrakcióját vizsgálták anion-cserélő HPLC segítségével, míg a para- κ -kazeineket kation-cserélő HPLC alkalmazásával. Az anion-cserélő HPLC alkalmazása során az α_{s1} -kazeint használták markerként, aminek segítségével megbecsülték a tejkeverékben lévő tehéntej százalékos arányát. A kation-cserélő HPLC alkalmazásával lehetőség van a szarvasmarha, juh és kecske para- κ -kazeinjeinek

elkülönítésére, valamint a módszer érett sajtok esetében is alkalmas arra, hogy kimutassa a hamisításra használt tehéntej jelenlétét (Mayer és mtsai., 1997a).

A széleskörben elterjedt módszereken túl DNS-alapú eljárások kidolgozása is megindult, mint például fajspecifikus primereket felhasználó polimeráz láncreakciók (PCR) alkalmazása (Maudet - Taberlet, 2001). Ennek az elméleti hátterét képezi, hogy a kérődző állatok egészséges emlőiből származó tej nagy számban tartalmaz szomatikus sejteket, amelyeknek túlnyomó részét leukociták adják, de ezek mellett megtalálhatóak epithél sejtek is benne. A leukociták védekező funkciót látnak el az emlőket megtámadó fertőző betegségekkel szemben. Az ezekben a sejtekben található genomi DNS-t lehet felhasználni PCR reakciókhoz (Amills és mtsai, 1997). Az emlőkből származó szomatikus sejtek képesek túlélni a sajtgyártás folyamatát, ugyanakkor kevés módszer alkalmas arra, hogy a sajtgyártás után ezekből a sejtekből a DNS kivonását lehetővé tegye és utána a kivont DNS-t PCR reakcióban fel lehessen használni (Bottero és mtsai., 2002).

A végrehajtott PCR reakciókat kombinálni lehet bizonyos eljárásokkal, így növelni lehet a kimutatás érzékenységet és specificitását is. Ilyen kombinált módszer a PCR-restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (PCR-RFLP), amelynek során a vizsgálni kívánt fajok DNS szakaszait a megfelelő primerek használatával felamplifikálják, majd restrikciós endonuklázal kezelik a kapott termékeket, végezetül a keletkező fragmentumokat agaróz gélelektroforézis segítségével szeparálják (Kocher és mtsai., 1989). A PCR-RFLP mellett a PCR-egyszálú DNS konformáció polimorfizmus (PCR-SSCP) is kombinált technika. Ez a módszer alkalmas egyedi, még ismeretlen pontmutációk kimutatására, de azok detektálására nem, mivel a módszerrel arról nem kapunk képet, hogy a vizsgált faj szekvenciáján belül hol találhatóak és milyen jellegűek a mutációk. Mindazonáltal a módszer előnye, hogy költségkímélő, valamint gyorsan kivitelezhető. Ennél a módszernél a PCR reakciót univerzális primerek alkalmazásával hajtják végre. Ezek a primerek más-más fajok esetében ugyanahhoz a konzervatív régióhoz kötődnek, ami azt eredményezi, hogy a fajokat az egyes szakaszokon belül található szekvencia-eltérések alapján lehet azonosítani. A reakció lejátszódása után a keletkező termékeket formamid jelenlétében magas hőfokon (95 °C) egyszálúvá teszik, majd az így előállított mintákat poliakrilamid gélen választják el egymástól, ahol fajra jellemző mintázatokat kapnak, ami alapján a mintában lévő faj DNS-e azonosítható (Plath és mtsai., 1997).

A kombinált, PCR alapú módszerek mellett alkalmaznak duplex és multiplex PCR reakciókat, amelyek során egy reakcióban kettő vagy több fajspecifikus primerpárt használnak fel. Így egy reakcióban lehetőség nyílik több faj kimutatására is. A PCR reakcióhoz felhasznált

fajspecifikus primerekkel az adott fajra jellemző méretű DNS szakaszok felszaporítása válik lehetővé. A reakció után agaróz gélelektroforézis segítségével választják el egymástól a fajra jellemző termékeket. Számos esetben ezekhez a vizsgálatokhoz a mitokondriális genom fajoként eltérő régióit használják fel, például a 12S rRNS gén és a D-loop régió variábilis szakaszait (López-Calleja és mtsai., 2005). Kevert tejet vizsgálva a mitokondriális D-loop régió szekvenciáját felhasználva sikerült kimutatni a jelenlévő tehéntejet 0,1 v/v% mértékben is (De és mtsai., 2011). Ebből az eredményből látszik, hogy rendkívül kis mértékű jelenlét esetén is lehetőség nyílik a tehéntej kimutatására a megfelelő módszerek felhasználásával.

A fajazonosítás több szempont miatt is kiemelkedő fontosságúvá vált az elmúlt két évtizedben, különösen fontos szempont a kormányzat által hozott törvények betartatása a gyártókkal, de ugyanúgy fontosak az egészségügyi és társadalmi megfontolások (López-Calleja és mtsai., 2005). Ezek a megfontolások maguk után vonták a fentebb tárgyalt és bemutatott analitikai és molekuláris biológiai technikák fejlesztését és alkalmazását. Első körben a már régebben használt elektroforetikus és kromatográfiás technikák, majd később az immunológiai és a molekuláris biológiai eljárások terjedtek el. Azonban ezeknek a technikáknak a fejlesztése napjainkban is tovább zajlik, folytonosan hatékonyabb és költségkímélőbb metodikákat keresve.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Felhasznált bioinformatikai módszerek

Munkánk során kilenc faj 12S rRNS génjének nukleotid szekvenciáját használtuk fel többszörös illesztés végrehajtásához, amelynek eredménye alapján terveztük meg a vizsgálatainkhoz szükséges primereket. A szekvenciákat az amerikai NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) nukleotid adatbázisából töltöttük le. A vizsgált 9 faj magyar és latin nevét, valamint NCBI azonosítóját a 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat: A szekvencia-illesztés során felhasznált kilenc faj adatai

Sorszám	Faj magyar neve	Faj latin neve	NCBI azonosító
1.	Házi sertés	<i>Sus scrofa domestica</i>	AM158316.1
2.	Házi tyúk	<i>Gallus gallus</i>	JN695761.1
3.	Házi lúd	<i>Anser anser</i>	JN695751.1
4.	Házi kacsa	<i>Anas platyrhynchos</i>	JN695765.1
5.	Pulyka	<i>Meleagris gallopavo</i>	AJ490508.1
6.	Szarvasmarha	<i>Bos taurus</i>	GQ926965.1
7.	Kecske	<i>Capra hircus</i>	GQ926969.1
8.	Juh	<i>Ovis aries</i>	JQ622016.1
9.	Bivaly	<i>Bubalus bubalis</i>	GU119953.1

Mindegyik faj szekvenciájához tartozik egy kód, amellyel a szekvencia azonosítható az NCBI adatbázisában. Az elvégzett szekvencia-illesztést az EBI (*European Bioinformatics Institute*) honlapján található CLUSTALW algoritmust felhasználva végeztük el. Ez a bioinformatikai eszköz lehetővé teszi egyidejűleg több nukleotid szekvencia illesztését (Higgins és mtsai., 1992).

A kilenc faj 12S rRNS szekvenciáinak többszörös illesztése után kapott eredmény, valamint négy forward és egy reverse primer tapadási régiói:

```

gi|261499764|gb|GQ926965.1| - -ACAGCTTAAAACTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTTATACCTTCTAGAG 134
gi|261499768|gb|GQ926969.1| - -ACAGCCCCGAAACTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTTATACCTTCTAGAG 134
gi|381141733|gb|JQ622016.1| - -ACAGCCCCGAAACTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTTATACCTTCTAGAG 417
gi|262527447|gb|GU119953.1| - -ATAGCCTAAAACTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTTATATCCCCCTAGAG 134
gi|82524151|emb|AM158316.1| - -ACTGCCTAAAACTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTCACATCCACCTAGAG 320
gi|374676785|gb|JN695761.1| CAAACGCTTAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCCCAAACCCACCTAGAG 136
gi|21530873|emb|AJ490508.1| CAAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCCCTAAACCCACCTAGAG 93
gi|374676775|gb|JN695751.1| CAAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCCCAAACCCACCTAGAG 135
gi|374676789|gb|JN695765.1| CAAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTGGCGGTGCCCTAAACCCACCTAGAG 135
* * * * *

gi|261499764|gb|GQ926965.1| GAGCCTGTTCTATAATCGATAAACCCCGATAAACCTACCAATTCTTGCT 184
gi|261499768|gb|GQ926969.1| GAGCCTGTTCTATAATCGATAAACCCCGATAAACCTACCAATTCTTGCT 184
gi|381141733|gb|JQ622016.1| GAGCCTGTTCTATAATCGATAAACCCCGATAAACCTACCAATTCTTGCT 467
gi|262527447|gb|GU119953.1| GAGCCTGTTCTATAATCGATAAACCCCGATAGACCTACCAATTCTTGCT 184
gi|82524151|emb|AM158316.1| GAGCCTGTTCTATAATCGATAAACCCCGATAGACCTTACCAACCCTTGCC 370
gi|374676785|gb|JN695761.1| GAGCCTGTTCTATAATCGATAATCCACGATTCACCCAACCACCCCTTGCC 186
gi|21530873|emb|AJ490508.1| GAGCCTGTTCTGTAATCGATAATCCACGATCCACCCAACCACCTCTTGCC 143
gi|374676775|gb|JN695751.1| GAGCCTGTTCTGTAATCGATAATCCCGATTAAACCAACCACCCCTTGCC 185
gi|374676789|gb|JN695765.1| GAGCCTGTTCTGTAATCGATGATCCACGATCAACCCAACCGCCCTTGCC 185
* * * * *

gi|261499764|gb|GQ926965.1| AA -TACAGTCTATATACCGCCATCTTCAGCAAACCTTAA -AA -GGA AAA 231
gi|261499768|gb|GQ926969.1| AA -TACAGTCTATATACCGCCATCTTCAGCAAACCTTAA -AA -GGAACA 231
gi|381141733|gb|JQ622016.1| AA -TACAGTCTATATACCGCCATCTTCAGCAAACCTTAA -AAAGGAACA 515
gi|262527447|gb|GU119953.1| AA -TGCAGTCTATATACCGCCATCTTCAGCAAACCTTAA -AA -GGTACA 231
gi|82524151|emb|AM158316.1| AA -TTAGCCCTATATACCGCCATCTTCAGCAAACCTTAA -AA -GGAACA 417
gi|374676785|gb|JN695761.1| AG -CACAGCTACATACCGCGTCGCCAGCCACCTCTAATGAAAGAACA 235
gi|21530873|emb|AJ490508.1| AA -CACAGCTACATACCGCGTCGCCAGCCACCTAAAATGAAAGATCA 192
gi|374676775|gb|JN695751.1| AA -CACAGCTACATACCGCGTCGCCAGCCACCTCGAATGAGAGCACA 234
gi|374676789|gb|JN695765.1| AAGCACGCCCTACATACCGCGTCGCCAGCCACCTCGAATGAGAGCGCA 235
* * * * *

gi|261499764|gb|GQ926965.1| AAAGTAAGCGTAATTATGATACATAAAAACGTTAGGTCAAGGTGTAACCT 281
gi|261499768|gb|GQ926969.1| AAAGTAAGCTCAATACAACACATAAAGACGTTAGGTCAAGGTGTAACCT 281
gi|381141733|gb|JQ622016.1| AAAGTAAGCTCAATAAACAACATAAAGACGTTAGGTCAAGGTGTAACCT 565
gi|262527447|gb|GU119953.1| AAAGTAAGCGCAATACAATGCATAAAAACGTTAGGTCAAGGTGTAACCT 281
gi|82524151|emb|AM158316.1| ATAGTAAGCACAATCATAGCACATAAAAACGTTAGGTCAAGGTGTAGCTT 467
gi|374676785|gb|JN695761.1| ACAGTGAGCTCAATAGCCCTCGCTAATAAGACAGGTCAAGGTATAGCCT 285
gi|21530873|emb|AJ490508.1| ATAGTGAGCTCAATAGTCCC -CACTAACAAGACAGGTCAAGGTATAGCCC 241
gi|374676775|gb|JN695751.1| ACAGTGGACACAATAGCACCCCGCTAATAAGACAGGTCAAGGTATAGCCT 284
gi|374676789|gb|JN695765.1| ACAGTGGGCGCAACAGCACCCCGCTAATAAGACAGGTCAAGGTATAGCCT 285
* * * * *

gi|261499764|gb|GQ926965.1| ATGAAATGGGAAGAAATGGGCTACATTCTCTACACCAAGAG -AATCAA -G 329
gi|261499768|gb|GQ926969.1| ATGGAATGGGAAGAAATGGGCTACATTTTCTACCTTAAGAA -AATTA - 328
gi|381141733|gb|JQ622016.1| ATGGAGTGGGAAGAAATGGGCTACATTTTCTACCCAAGAAA -ATTTAA - 612
gi|262527447|gb|GU119953.1| ATGAAATGGGAAGAAATGGGCTACATTTTCTACACCAAGAAATACCCAA - 329
gi|82524151|emb|AM158316.1| ATGGGTGGGAAGAAATGGGCTACATTTTCTACAT -AAGAATATCCACCA 516
gi|374676785|gb|JN695761.1| ATGGGTGG -GAGAAATGGGCTACATTTTCTA -ACATAGAA - - -CAA - 327
gi|21530873|emb|AJ490508.1| ATGAGGTGG -AAGAAATGGGCTACATTTTCTA -ACATAGAA - - -CAG - 283
gi|374676775|gb|JN695751.1| ATGGAGTGG -AAGAAATGGGCTACATTTCCCTATTATAGGG - - -CAA - 326
gi|374676789|gb|JN695765.1| ATGGGACGG -AAGAAATGGGCTACATTTCCCTATGCATAGGG - - -CAA - 328
* * * * *

gi|261499764|gb|GQ926965.1| CACGAAAGTTATTATGAAA -CCAATAACCAAGAGGAGGATTTAGCAGTAAA 378
gi|261499768|gb|GQ926969.1| TACGAAAGCCATTATGAAA -TTAATGACCAAAGGAGGATTTAGTAGTAAA 377
gi|381141733|gb|JQ622016.1| TACGAAAGCCATTATGAAA -TTAATAGCCAAAGGAGGATTTAGCAGTAAA 661
gi|262527447|gb|GU119953.1| CACGAAAGTTATTATGAAAGTTAATAACCAAAGGAGGATTTAGCAGTAAA 379
gi|82524151|emb|AM158316.1| CACGAAAGTTTTTATGAAA -CTAAAAACCAAAGGAGGATTTAGCAGTAAA 565
gi|374676785|gb|JN695761.1| -ACGAAAAAGGACGTGAAACCCGCCCTTAGAAGGAGGATTTAGCAGTAAA 376
gi|21530873|emb|AJ490508.1| -ACGAAAAAGGCGTGAAACTCGCCCTTGGAGGAGGATTTAGCAGTAAA 332
gi|374676775|gb|JN695751.1| CACGGAAGAAGCGTGAAACC -ACTTCTGGAAGGCGGATTTAGCAGTAAA 375
gi|374676789|gb|JN695765.1| CACGGAAGAAGATGAAACT -GCTTCTAGAGGAGGATTTAGCAGTAAA 377
* * * * *

```

A többszörös illesztés segítségével megtudtuk, melyek azok a szekvencia részletek, amelyek mind a kilenc faj esetében megegyeztek. Az ilyen, konzervatív szekvencia szakaszokra terveztük a későbbi vizsgálatok során felhasználható univerzális primereket.

3.2. Genomi DNS izolálása tejből

A PCR-SSCP módszer kezdeti lépése volt, hogy a vizsgálni kívánt DNS szakaszt polimeráz láncreakcióban a megfelelő primerek segítségével felszaporítottuk. Ehhez szükségünk volt DNS templátra, vagyis a vizsgálni kívánt fajból származó genomiális, vagy bizonyos esetekben extranukleáris DNS-re. A DNS kivonáshoz Zsolnai és Orbán (1999) módszerét vettük alapul, melyet több pontban módosítottunk.

A DNS izolálás lépései a következők:

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. lépést kétszer megismételtük.
6. A mintákat tartalmazó eppendorff csöveket papírtörölkőre 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 felfuszpendáltuk.
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.

3.3. Genomi DNS izolálás sajtból

A sajtmintákból történő DNS izolálás a De és munkatársai (2011) által leírt fenol-kloroformos módszer alapján történt.

Az izolálás lépései a következők voltak:

1. A sajtmintákat folyékony nitrogén segítségével homogenizáltuk.
2. A homogenizált mintákból 70 mg-ot mértünk ki 2 ml-es eppendorff 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 papírtörlőre 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.

3.4. A DNS izolátumok mennyiségi ellenőrzése

A DNS izolálást követően az egyes minták koncentrációját spektrofotometriás vizsgálatokkal lehet megállapítani. Az izolálás után mintáink koncentrációját NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) készülék segítségével határoztuk meg.

3.5. A minták koncentrációinak egységesítése

Az elegytejmintákból kivont DNS minták végkoncentrációját 100 ng/ μl -es értékre állítottuk be. Mivel közvetlenül a kivonás után az egyes minták koncentrációja jelentősen eltért egymástól, szükséges volt a minták hígítása vagy koncentrálása a koncentráció értékek egységesítése céljából.

3.6. PCR reakciók univerzális primerek felhasználásával

3.6.1. A polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction, PCR)

A polimeráz láncreakció egy széles körben elterjedt molekuláris biológiai módszer, amelyet K. B. Mullis dolgozott ki 1985-ben. Az eljárást nem csak a kutatásban, de a diagnosztikában, illetve

a törvényszéki vizsgálatokban is alkalmazzák. A módszerrel lehetőség nyílt bármilyen szervezetből származó, bármilyen célszekvencia felszaporítására megfelelő primerek alkalmazása mellett. A módszer egy hőstabil DNS-polimeráz enzimet igényel (Taq polimeráz) a DNS célszekvencia felszaporítására a primerek mellett, és a ciklusokból felépülő folyamat egy a hőmérsékletet rendkívül pontosan és gyorsan szabályzó készülékben játszódik le (thermocycler).

A reakció elméleti háttere, hogy a DNS templát 5' végével komplementer oligonukleotidok képesek megfelelő hőmérséklet mellett a folyamat kezdő lépéseként egyszálúvá tett DNS láncaihoz hibridizálni. A DNS polimeráz a primertől indulva 5'-3' irányban haladva az egyszálú DNS templáton megszintetizálja az adott szál komplementerét, ehhez dezoxiribonukleozid-5'-trifoszfátokat (dNTP) használ fel.

A reakció ciklusokból épül fel, amelyek meghatározott hőmérsékleten lejátszódó lépésekből állnak össze. Az első lépés a denaturálás, amelynek során a felszaporítandó, még kétszálú DNS-t 95 °C-on egyszálúsítjuk. A második lépés az anellálás, amikor is az egyszálú oligonukleotid primerek a hőmérséklet csökkenésének hatására hibridizálnak az egyszálú DNS templátokkal. Az egyes primerek az esetek többségében 8-20 nukleotid hosszúságúak és szintetikusak. A harmadik lépcsőfok a polimerizáció/extenzió folyamata, amely alatt 72-75 °C-on a hőstabil enzim – Taq polimeráz – a primerek 3' végét hosszabítja meg, ez az elongáció, valamint lejátszódik a templát DNS-sel komplementer szál szintézise is 5'-3' irányban, ez az extenzió. A ciklusok 35-40 alkalommal is ismétlődhetnek, amelyek során a Taq polimeráz az újonnan szintetizálódó DNS-szálakat is templátként hasznosíthatja, ami a DNS mennyiségének exponenciális növekedését vonja maga után.

3.6.2 Hőmérséklet grádiens PCR reakció

A fajok szekvenciáinak többszörös illesztése alapján öt primer került megrendelésre, négy forward és egy reverz primer. A forward primerek mindössze néhány nukleotidban különböznek. Az univerzális primerek adatait a 2. táblázat tartalmazza. 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.

A hőmérséklet grádiens PCR reakció során alkalmazott reakcióelegy összetétele 10 µl-re vonatkoztatva:

- 2 mM MgCl₂ (Fermentas)
- 10x Dream Taq puffer (Fermentas)
- 100 µM dNTP (Fermentas)
- 1 pmol reverz primer (Sigma)
- 1 pmol forward primer (Sigma)
- 0,5 U Dream Taq polimeráz (Fermentas)

A reakcióelegyet lamináris boxban mértük össze. 9 µl PCR mixhez 100 ng DNS-t adtunk.

A reakció során alkalmazott hőmérséklet grádiens 57,8-65 °C közötti tartományban állítottuk be. A PCR reakció eredménye alapján a további PCR reakciókhoz 60 °C anellálási hőmérsékletet választottunk ki.

2. táblázat: A felhasznált univerzális primerek adatai

Sorszám	Kód	Szekvencia (5'-3')	Termékméret (bp)	Célszekvencia lokalizációja
1.	10_12SrRNA_R	TTTACTGCTAAATCCTCCTT	278	12S rRNS gén
2.	10_12SrRNA_F1	ACTCTAAGGACTTGGCGGTG		
3.	10_12SrRNA_F2	AAACTCTAAGGACTTGGCGG	280	
4.	10_12SrRNA_F3	AACTCTAAGGACTTGGCGGTG	279	
5.	10_12SrRNA_F4	TCTAAGGACTTGGCGGTGC	276	

3.6.3. PCR reakció a négy primerpár alkalmazásával fajoként 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 20 µl-re vonatkoztatva:

- 4 mM MgCl₂ (Fermentas)
- 10x Dream Taq puffer (Fermentas)
- 200 µM dNTP (Fermentas)
- 2 pmol reverz primer (Sigma)
- 2 pmol forward primer (Sigma)
- 1U Dream Taq polimeráz (Fermentas)

A reakcióelegyet lamináris boxban mértük össze. 18 µl PCR reakcióelegyhez 100 ng DNS-t adtunk. A reakció körülményeit a 3. táblázat tartalmazza. A további vizsgálataink során minden esetben ezeket a reakció körülményeket állítottuk be.

3. táblázat: A PCR reakció körülményei

<i>Ciklus lépései</i>	<i>Hőmérséklet (°C)</i>	<i>Időtartam (perc)</i>	<i>Ciklusszám</i>
Taq polimeráz aktiválása	95	1,5	1
Denaturálás	95	0,5	35
Anellálás	60	0,5	
Extenzió	72	0,5	
Végső lánc hosszabítás	72	5,0	1

A PCR reakció sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

3.6.4 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%, emelett 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.

3.6.5. Agaróz gélelektroforézis

A molekuláris biológiai vizsgálatok során széleskörben alkalmazott szeparálási eljárás az agaróz gélelektroforézis. Az eljárás során a vizsgálni kívánt minták elektromos erőter hatására a töltésükkel ellentétes elektródok irányába vándorolnak az agaróz gél mátrixában. A szeparálás alapját képezi, hogy a PCR reakció során felszaporodott fragmentumok a gél anyagában a méretük függvényében vándorolnak.

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.

3.7. PCR-SSCP eljárás alkalmazása fajspecifikus poliakrilamid gélmintázatok kimutatásához

A PCR-egyszálú DNS konformáció polimorfizmus (PCR-SSCP) alkalmas módszer pontmutációk kimutatására, valamint az ezek miatt kialakuló konformációs eltérések kimutatására, bár az egyes mutációk ismeretlenek maradnak, azok jelenlétére csak a létrejövő konformációs eltérésekből lehet következtetni, amelyek, mint fajra jellemző gélmintázatok mutathatók ki poliakrilamid gélelektroforézis alkalmazásával. Mivel a szekvenciákban fellelhető eltérések fajra jellemzőek lehetnek, így a módszer jól alkalmazható fajazonosításra. Az egyszálú DNS molekulák nem denaturáló közegben felvesznek egy bizonyos struktúrát, ami több intramolekuláris kölcsönhatás együttes hatásának eredményeképpen alakul ki. A nem denaturáló poliakrilamid gél

végrehajtott SSCP analízis lehetővé teszi a mutációval rendelkező DNS szálak elkülönítését (Hayashi, 1999).

A módszer kivitelezéséhez előzetesen univerzális primerek felhasználásával PCR reakcióban felszaporítottuk a vizsgálni kívánt DNS szakaszokat. Az univerzális primerek segítségével felszaporított DNS szakaszok hossza kis mértékben eltérő volt, méretük 280, 279, 278, 276 bp volt.

A poliakrilamid gél összetétele

2,4 ml 10x TBE puffert (Sigma), 9,9 ml 40% Acrylamide/bis-Acrylamide Solution-t (Sigma) mértünk össze, majd dH₂O-val 40 ml-re egészítettük ki, hozzáadtunk 400 µl 10 %-os ammónium perszulfát oldatot (Sigma), valamint 30 µl TEMED- et (tetrametil-etiléndiamin; BioRad).

A PCR termékek előkészítése SSCP-hez

A korábban előállított PCR termékeket 95 °C-on denaturáltuk 5 percig, 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.

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 gél 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.

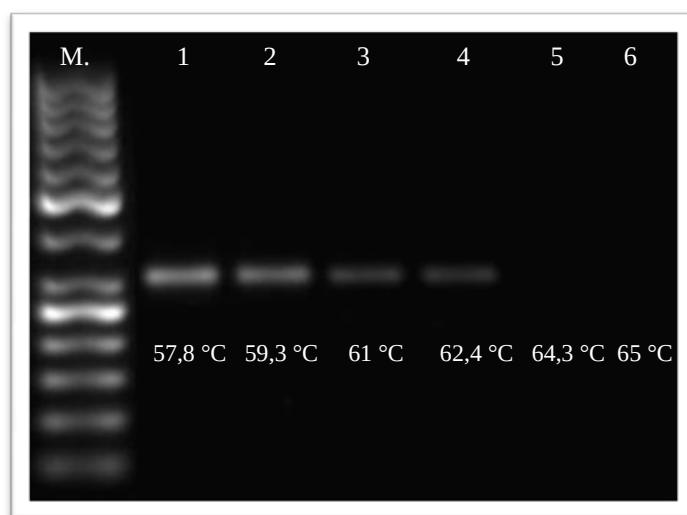
4. Leállítás

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

4. EREDMÉNYEK ÉS AZOK ÉRTÉKELÉSE

4.1. Hőmérséklet grádiens PCR reakciók agaróz gélelektroforetikus eredményei

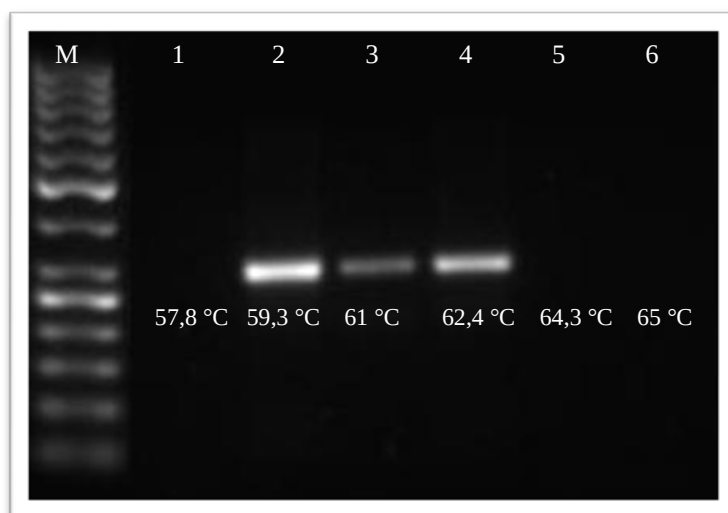
A 12S rRNS szekvenciáival elvégzett többszörös illesztés után tervezett univerzális primereket először hőmérséklet grádiens PCR során teszteltük. A reakcióelegybe mind a négy vizsgálni kívánt faj DNS-e belekerült, majd az egyes reakciókat meghatározott hőmérsékleteken hajtottuk végre. Minden primerpárt, minden hőmérsékleten teszteltünk. A PCR reakciók eredményességét agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztük, valamint a kapott sávok alapján állapítottuk meg azt az anellálási hőmérsékletet, amelyik minden rendelkezésünkre álló primer számára optimális. Ez a hőmérséklet végül 60 °C-nak adódott, mivel a négy reakció ellenőrzéseként kapott gélképek alapján megállapíthattuk, hogy 59,3 °C-nál minden esetben kaptunk jelet, vagyis ezen a hőmérsékleten a primerkombinációk jól működnek. A négy primerpárral végzett PCR reakció eredményeit a következő négy ábrán mutatjuk be. Az 1. ábrán az R-F1 primerpárral végzett reakció eredménye látható.



1. 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

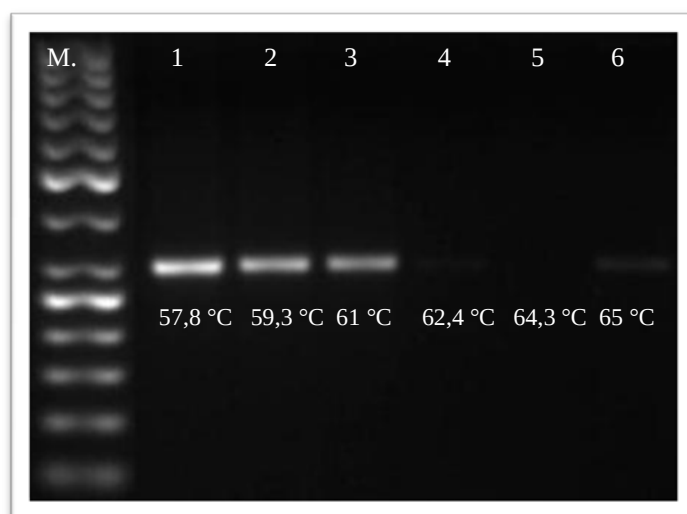
A második primerpár az R-F2 jelzést kapta, amellyel szintén végrehajtottuk a hőmérséklet grádiens reakciót. Ennek az eredményét a 2. ábrán láthatjuk.



2. *ábra*: Az R-F2 univerzális primerpár DNS mintázata

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

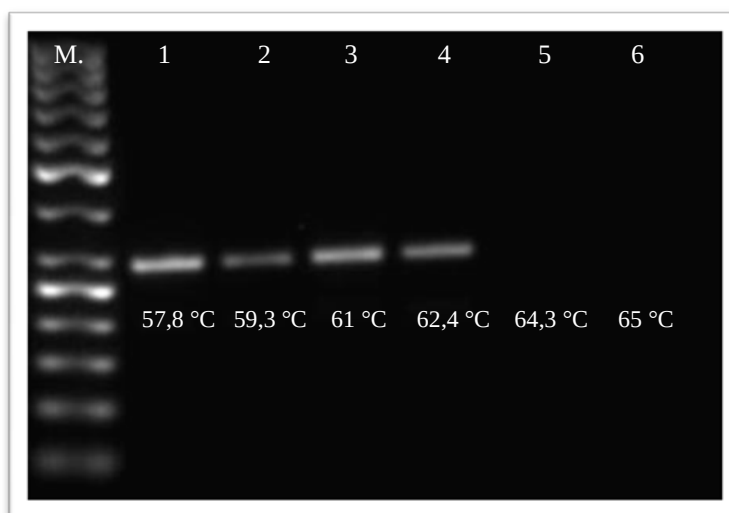
A harmadik primerpár az R-F3 volt, amellyel végzett optimalizálás eredményét a 3. *ábrán* mutatjuk be.



3. *ábra*: Az R-F3 univerzális primerpár gélmintázata

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

A negyedik reakcióban az R-F4 primerpárt ellenőriztük, ennek a reakciónak az eredményét a 4. *ábra* mutatja be.

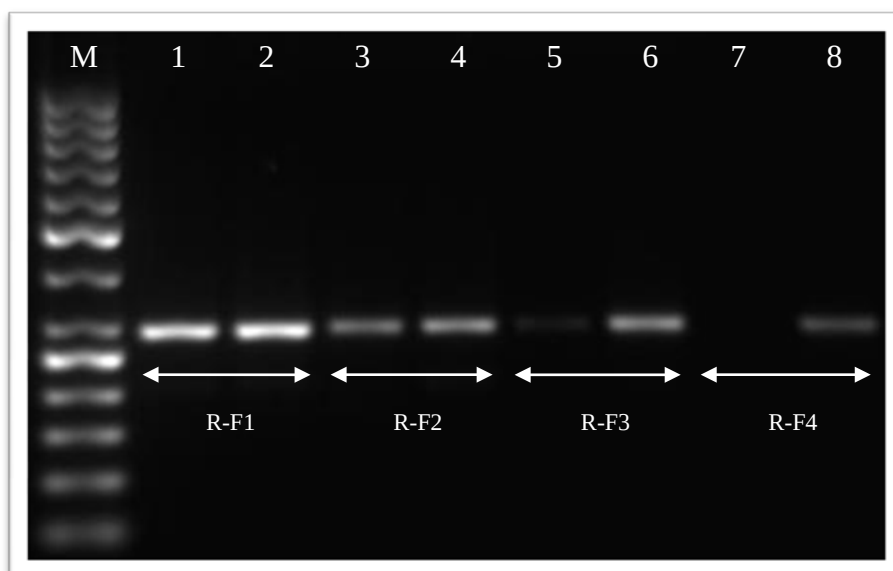


4. ábra: Az R-F4 univerzális primerpár gélmintázata

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

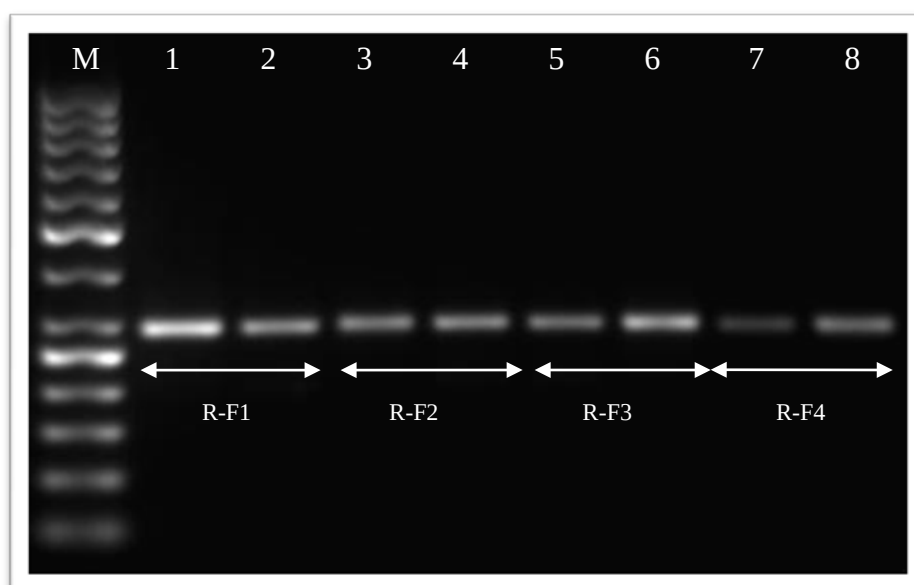
Az elvégzett hőmérséklet grádiens reakciók után anellálási hőmérsékletnek 60 °C-ot határoztunk meg, majd a primerpárokat külön-külön reakcióban teszteltük minden egyes faj DNS-ével, valamint egy reakcióban mind a négy faj DNS-ének felhasználásával. Az elvégzett reakciók alkalmasak voltak arra, hogy megbizonyosodjunk arról megfelelő anellálási hőmérsékletet választottunk. Mind a négy faj esetében kaptunk PCR terméket, mindegyik primerpár alkalmazásával. A négy faj DNS keverékét felhasználó reakció ellenőrzése során is pozitív eredményt kaptunk, ugyanis a négy primerpár ebben a reakcióban is működőképesnek bizonyult. Eredményeinket az 5.-9. ábrák mutatják be.

Az 5. ábrán a szarvasmarha DNS-ével elvégzett reakció agaróz gélen kapott eredményét láthatjuk, 6. ábra a bivaly, a 7. ábra a juh, a 8. ábra a kecske, míg a 9. ábra a mind a 4 fajt tartalmazó DNS mix-el végzett reakció eredményeit mutatja be.



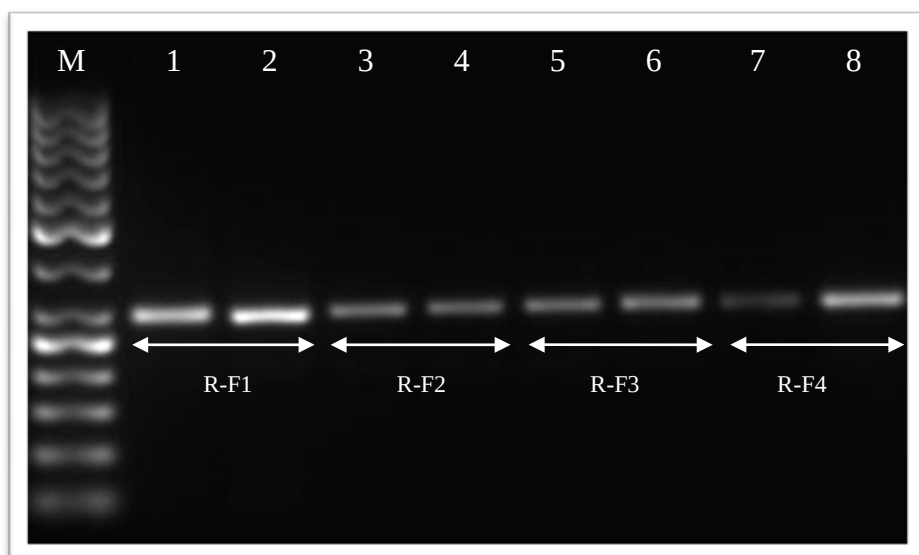
5. ábra: Az univerzális primerpárok tesztelése szarvasmarha DNS-sel 60 °C-on.

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



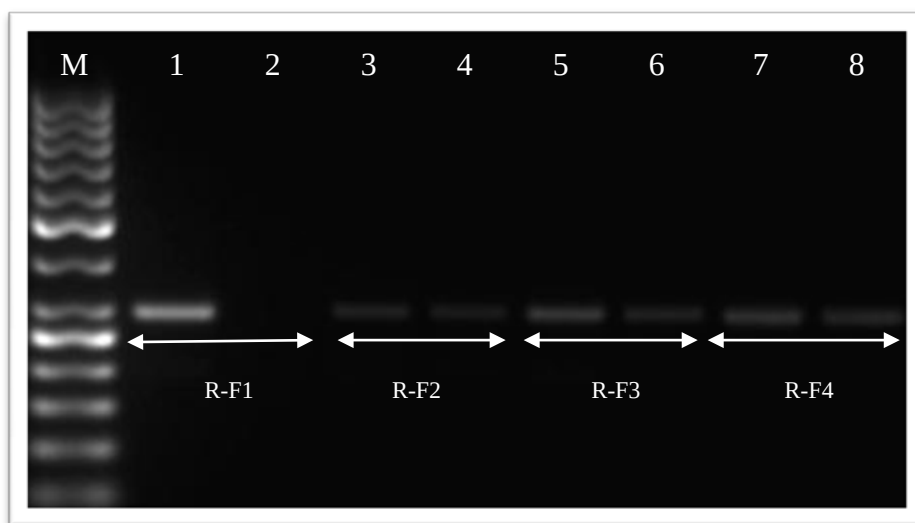
6. ábra: Az univerzális primerpárok tesztelése bivaly DNS-ével 60 °C-on.

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



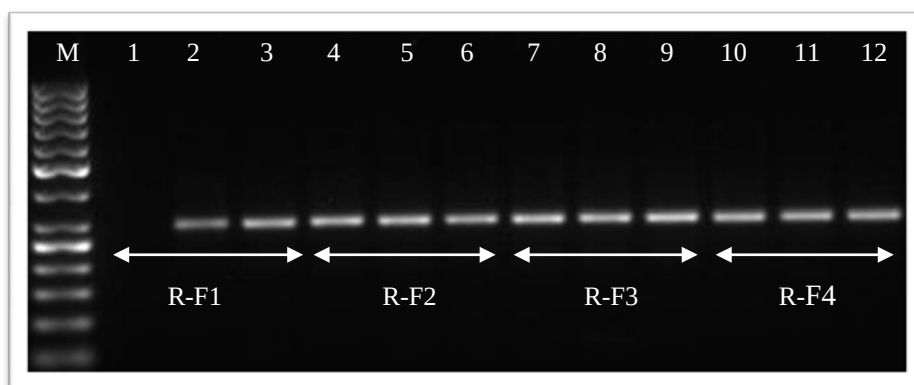
7. ábra: Az univerzális primerpárok tesztelése juh DNS-ével 60 °C-on.

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



8. ábra: Az univerzális primerpárok tesztelése kecske DNS-ével 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

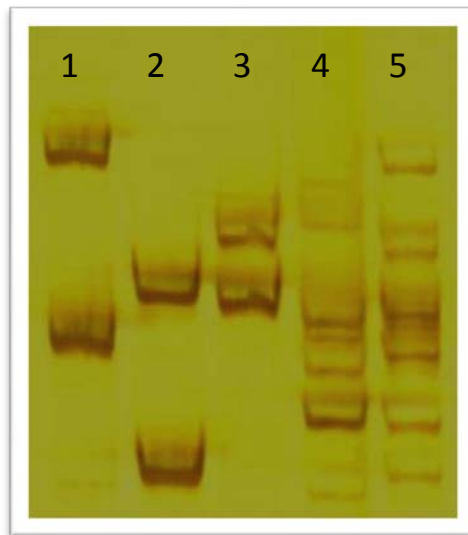


9. ábra: Az univerzális primerpárok tesztelése kecske, juh, bivaly és szarvasmarha kevert DNS-ével 60 °C-on

M: 50 bp-os DNS marker; kecske, juh, bivaly és szarvasmarha genomi DNS együttes tesztelése az **1-2.** 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

4.2. PCR-SSCP vizsgálatok poliakrilamid gélelektroforetikus eredményei

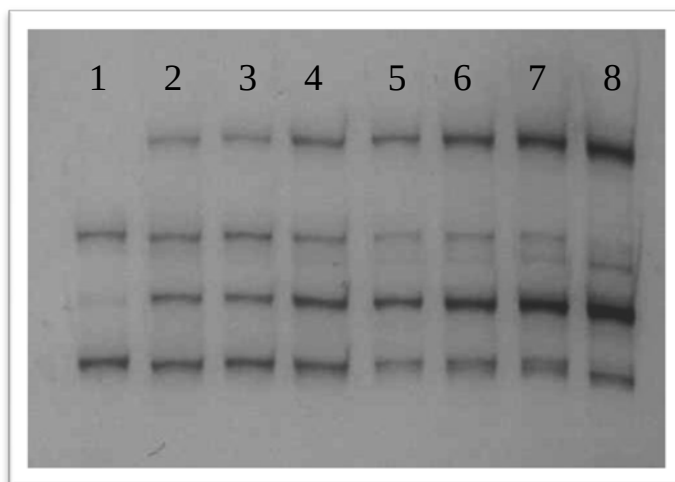
Az előzetes vizsgálatokban optimalizált primerpárok közül az R-F1 kombinációt választottuk ki a további PCR reakciók kivitelezéséhez. Az optimalizált univerzális primerek felhasználásával PCR reakciót állítottunk össze, amelynek során külön-külön fajonként szaporítottuk fel a 12S rRNS gén szekvenciáját, valamint összeállítottunk olyan reakciót is, amely egyszerre tartalmazta mind a négy faj DNS-ét is. Mielőtt a PCR termékeket előkészítettük SSCP-hez, agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztük a PCR reakció sikerességét. Amennyiben a reakció sikeresnek bizonyult, a PCR termékeket előkészítettük SSCP vizsgálatához. Az SSCP során poliakrilamid gélen választottuk el egymástól az előzetesen egyszálúsított DNS szakaszokat. Az egyszálúsítás következtében az egyes DNS szálak egyedi, fajra jellemző struktúrát vesznek fel, ami a fajok között meglévő szekvencia különbségek miatt, gélmintázatbeli különbségekként lehet kimutatni. Az általunk tervezett és optimalizált primerekkel sikerült végrehajtanunk a négy faj egyértelmű elkülönítését poliakrilamid gélen. A felhasznált univerzális primerekkel végrehajtott PCR reakciót követő SSCP vizsgálat eredményét a 10. ábra mutatja be.



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

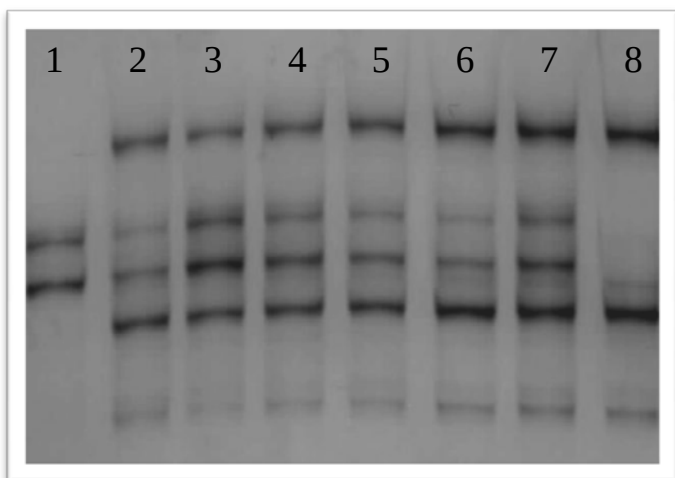
Az R-F1 univerzális primerpár PCR-SSCP mintázata az **1.** mintában szarvasmarha, a **2.** mintában bivaly, a **3.** mintában juh, a **4.** mintában kecske genomi DNS-sel, valamint az **5.** mintában szarvasmarha/bivaly/juh/kecske genomi DNS-sel

A **10. ábrán** látható sávok bizonyítják, hogy a négy faj az általunk tervezett primerek segítségével egyértelműen elkülöníthető egymástól. Ezt a tényt kihasználva olyan kísérleti beállításokat alkalmaztunk, amelyek során azonos koncentrációjú DNS oldatokat kevertünk össze előre meghatározott térfogatszázalékban. Minden beállítás során szarvasmarha DNS volt az, amit egy másik faj – bivaly, juh, kecske – DNS-éhez kevertünk meghatározott százalékban: 5 v/v%, 10 v/v%, 20 v/v%, 30 v/v%, 40 v/v% és 50 v/v%. Ezek mellé kontrollmintának 100 v/v%-ban szarvasmarha, valamint 100 v/v%-ban bivaly, juh és kecske DNS-t tartalmazó mintákat is felhasználtunk. A **11-13. ábrán** bemutatjuk az 5 v/v% és 50 v/v% közötti keverési tartományban elvégzett SSCP vizsgálatok során kapott eredményeket.



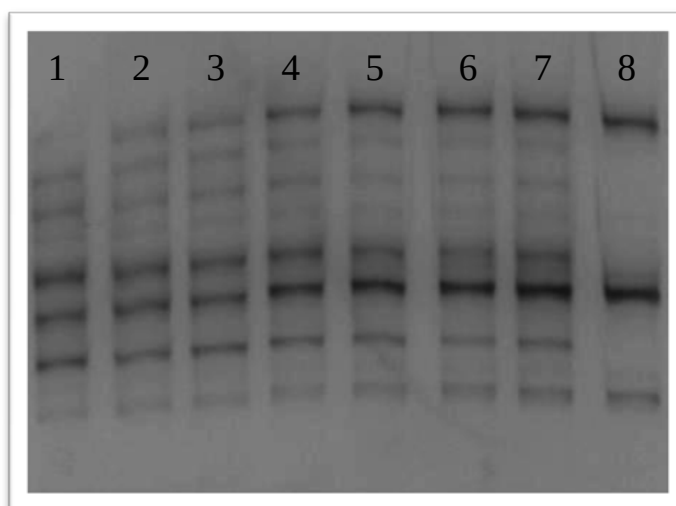
11. ábra: Szarvasmarha és bivaly DNS keverékeivel végzett poliakrilamid gélelektroforézis 5 v/v% - 50 v/v% tartományban.

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.



12. ábra: Szarvasmarha és juh DNS keverékeivel végzett poliakrilamid gélelektroforézis 5 v/v% - 50 v/v% tartományban.

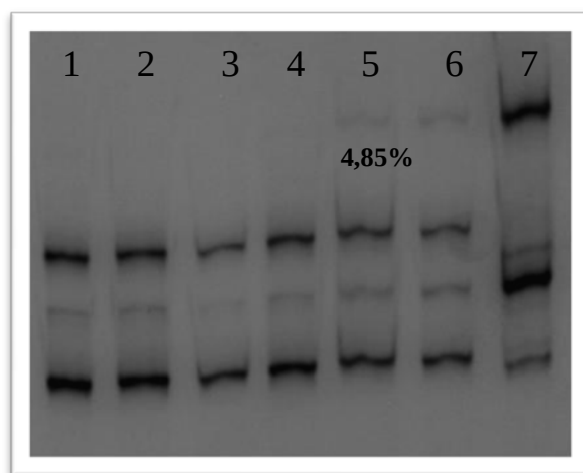
Az **1.** mintában 100 v/v% juh DNS, a **2.** mintában 5 v/v% szarvasmarha és 95 v/v% juh DNS, a **3.** mintában 10 v/v% szarvasmarha és 90 v/v% juh DNS, a **4.** mintában 20 v/v% szarvasmarha és 80 v/v% juh DNS, az **5.** mintában 30 v/v% szarvasmarha és 70 v/v% juh DNS, a **6.** mintában 40 v/v% szarvasmarha 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.



13. ábra: Szarvasmarha és kecske DNS keverékeivel végzett poliakrilamid gélelektroforézis 5 v/v% - 50 v/v% tartományban

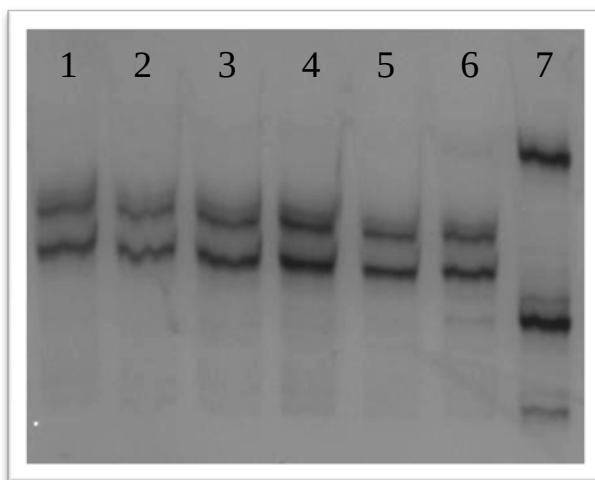
Az **1.** mintában 100 v/v% kecske DNS, a **2.** mintában 5 v/v% szarvasmarha és 95 v/v% kecske DNS, a **3.** mintában 10 v/v% szarvasmarha és 90 v/v% kecske DNS, a **4.** mintában 20 v/v% szarvasmarha és 80 v/v% kecske DNS, az **5.** mintában 30 v/v% szarvasmarha és 70 v/v% kecske DNS, a **6.** mintában 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.

Mivel a kapott eredmények alapján egyértelműen megállapítható, hogy a szarvasmarha DNS 5 v/v%-os jelenléte kimutatható egy másik faj DNS mintájából, a vizsgálatainkat tovább folytattuk, csökkentve a szarvasmarha százalékos arányát a keverékekben. Ez a következőképpen valósult meg, minden faj DNS mintájához 0,1 v/v%-ban, 0,5 v/v%-ban, 1 v/v%-ban, 3 v/v%-ban és 5 v/v%-ban kevertünk szarvasmarha DNS-t, majd ezzel a kísérleti beállítással végeztük el a PCR-SSCP vizsgálatot. Megállapítottuk, hogy a PCR-SSCP módszer alsó kimutatási határa 3-5 v/v%-nak adódik. A gélelektroforézis után kapott gélképeken látható mintázatok az Uvipro Platinum (Uvitec) szoftver segítségével kvantitáltuk, vagyis a képeken látható sávok intenzitásértékeit állapítottuk meg. Ez az érték nem ad arról felvilágosítást, hogy az egyes mintákban milyen arányban található meg a szarvasmarha DNS, azt mutatja meg, hogy szoftver használatával hol mutatható ki annak jelenléte. A 0,1 v/v% és 5 v/v% keverési arányok közötti értékeket alkalmazó beállítások eredményeit a 14.-16. ábrákon szemléltetjük.



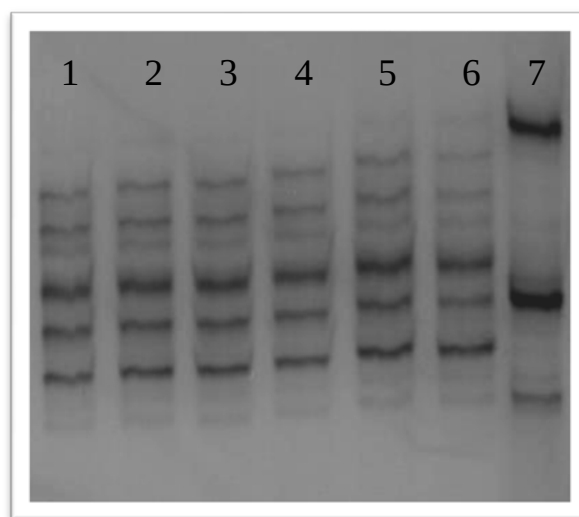
14. ábra: Szarvasmarha és bivaly kevert DNS-ével végzett poliakrilamid gélelektroforézis eredménye 0,1 v/v% - 5 v/v% tartományban.

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.



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

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.



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

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.

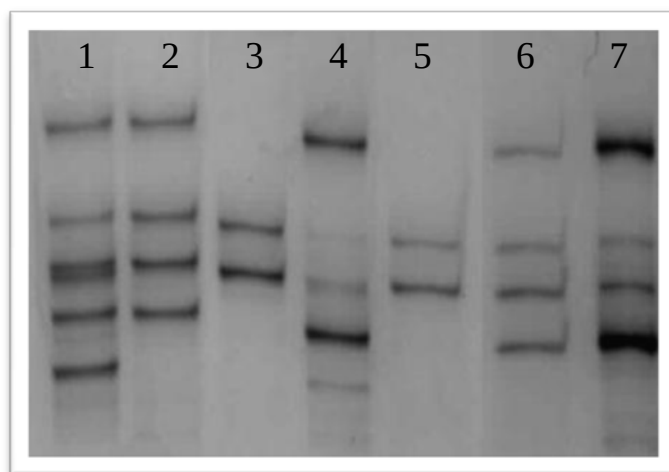
Az elvégzett SSCP vizsgálatokkal arra kerestük a választ, hogy a módszer milyen alacsony arányban jelenlévő szarvasmarha DNS mennyiség kimutatására alkalmas. Az 5 v/v% - 50 v/v% tartományban elvégzett vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a módszer alkalmas az 5 v/v%-ban jelenlévő szarvasmarha DNS kimutatására. Mivel ebben a mintasorozatban ez volt a legkisebb keverési arány, amit beállítottunk, és mivel minden faj esetében alkalmas volt a módszer az 5 v/v%-ban jelenlévő szarvasmarha DNS kimutatására, így alacsonyabb keverési arányokat is beállítottunk, amelyekkel azt teszteltük, hogy a módszer alsó kimutatási határa melyik értéknél található, vagyis a módszer mennyire érzékeny.

A bivaly és szarvasmarha kevert DNS-ével végzett SSCP vizsgálat alsó kimutatási határának 3 v/v%-ot állapítottunk meg, ezt az eredményt szoftveres kvantifikálással is megerősítettük, ahol a szoftver a jelenlévő szarvasmarha specifikus sáv intenzitásértékét 4,85 %-ban határozta meg a teljes oszlop intenzitásértékéhez viszonyítva. Ezt az intenzitásértéket feltüntettük a **14. ábra** 5. oszlopában is.

A juh és szarvasmarha kevert DNS-ével végrehajtott vizsgálat kimutatási határa 5 v/v %-ban volt meghatározható. A 0,1 v/v% - 5 v/v% tartományban nem sikerült szarvasmarha specifikus sávokat detektálnunk a szoftver segítségével, ugyanakkor 5 v/v% - 50 v/v% tartományon belül kimutatható 5 v/v% keverési arány mellett a szarvasmarhára jellemző sáv.

A kecske és szarvasmarha kevert DNS-ének esetében a vizsgálat kimutatási határa, szintén az 5 v/v% - 50 v/v% tartományban végzett poliakrilamid gélelektroforézis eredményei alapján 5 v/v% volt. 0,1 v/v% - 5 v/v% keverési tartomány esetében ennél a mintasorozathoz sem lehetett szoftveresen szarvasmarha-specifikus sávokat detektálni a kevert DNS-t tartalmazó minták esetében.

A módszer érzékenységének, illetve kimutatási határának meghatározása után a PCR-SSCP eljárást kereskedelmi forgalomból származó sajtminák vizsgálatára használtuk fel. A rendelkezésünkre álló sajtminákból DNS-t izoláltunk, amit univerzális primerpárt alkalmazó PCR reakcióban szaporítottunk fel. A poliakrilamid gélelektroforézis eredményeként kapott gélképet és az azon látható sávmintázatokat a 17. ábrán mutatjuk be.



17. ábra: Kereskedelmi forgalomból származó sajtminákból izolált DNS-sel végzett PCR-SSCP vizsgálat elektroforetikus eredménye.

Az **első oszlopban** kecskesajtból származó DNS minta által adott sávok láthatóak. A termék címkézése alapján csak kecskére jellemző sávok megjelenését várjuk, ennek ellenére egyértelműen látszik a szarvasmarhára jellemző mintázat is.

A **második oszlopban** juhsajtból származó DNS minta által adott sávok figyelhetőek meg. A címkézés alapján kizárólag juhra jellemző mintázatot várnánk, azonban a szarvasmarhára jellemző mintázat is megjelenik.

A **harmadik oszlop** esetében csak juhra jellemző mintázat jelenik meg, ami azt bizonyítja, hogy ennek a sajtnak a címkézése nem félrevezető, ugyanis azt állítják, hogy kizárólag juhtej felhasználásával készült, amit az eredmény is alátámaszt.

Az **negyedik oszlopban** erős jelet ad a szarvasmarhára jellemző mintázat, holott a vizsgált sajtot kecskesajtként árusítják, címkéjén kizárólag kecsketejet jelölnek meg összetevőként.

Az **ötödik oszlopban** egy juhsajtból származó DNS minta által adott sávokat láthatjuk, amelyek juhra jellemző mintázatot vesznek fel, ezzel igazolva a termék címkéjén található leírást, miszerint a gyártáshoz juhtejet használtak fel.

A **hatodik oszlopban** egy juh és tehéntejet tartalmazó gomolyából származó DNS által adott sávok láthatóak, a mintázat igazolja a gyártók leírását, ugyanis mind a juhra, mind a szarvasmarhára jellemző mintázat megjelenik.

A **hetedik oszlopban** egy juhtúróból származó DNS által adott sávok figyelhetőek meg, ennek ellenére a juhra jellemző mintázat jelentősen gyengébben jelenik meg, mint a szarvasmarhára jellemző, ami viszont kifejezetten hangsúlyos.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A fogyasztóvédelmi szempontok előtérbe kerülése az elmúlt két évtizedben maga után vonta az élelmiszerek összetevőinek alaposabb vizsgálatát, és az ezekhez a vizsgálatokhoz alkalmas analitikai és molekuláris biológiai módszerek fejlesztését, valamint alkalmazását. A vizsgálataink során alkalmazott PCR-egyszálú DNS konformáció polimorfizmus (PCR-SSCP) eljárás alkalmas arra, hogy egy mintából több faj jelenlétét egyszerre is kimutassuk. A módszer tesztelése során univerzális primerek alkalmazásával szarvasmarha, bivaly, juh és kecske 12S rRNS szekvenciájának meghatározott szakaszait szaporítottuk fel, majd ezeket denaturálás után egyszálú formában poliakrilamid gélelektroforézis során szeparáltuk, aminek eredményeképpen fajspecifikus sávmintázatokat kaptunk. Fajspecifikus sávmintázatok a fajok eltérő szekvenciái miatt alakulnak ki, ugyanis a bennük található eltérések hatására egyedi, fajra jellemző konformációt vesznek fel az egyszálú DNS molekulák, aminek köszönhetően alakulnak ki a fajspecifikus sávmintázatok poliakrilamid gélen.

A vizsgálataink során kapott eredmények alapján megállapítottuk, hogy az alkalmazott PCR-SSCP eljárás esetén a szarvasmarha DNS kimutatási határa 3, illetve 5 v/v%. Ezek alapján kijelenthetjük, hogy a módszer alkalmazható kereskedelmi forgalomban kapható tej és tejtermékek vizsgálatára, hiszen a módszer megfelelő kimutatási határértékkel rendelkezik, így a hamisítás céljából felhasznált tehéntej jelenlétének detektálására alkalmas.

A módszer gyakorlati tesztelését kereskedelmi forgalomból származó sajtminutákon hajtottuk végre. Az eljárás a kapott eredmények tükrében alkalmas arra, hogy sajtok esetében azonosítsa a termékekben jelenlévő fajokat.

Az általunk felhasznált univerzális primerek alkalmasak voltak négy faj 12S rRNS szekvenciájának a felamplifikálásához, ugyanakkor univerzális voltak miatt valószínűleg használhatóak további fajok vizsgálatához is. Mivel már a primerek tervezésekor több faj szekvenciáját vettük figyelembe, így azokat a továbbiakban egy kibővített fajazonosítási munkában tervezzük felhasználni. A fenti okok miatt feltételezhető, hogy nem csak a BLAST során felhasznált fajok szekvenciái, de további fajok is vizsgálhatóak ezekkel az univerzális primerekkel PCR-SSCP vizsgálat során.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az évezredek óta tenyésztett háziállatok közül a szarvasmarhát, a bivalyt, a juhot és a kecskét élelmezési szempontból nem csak a húruk, de az általuk adott tej miatt is tartják. A négy faj teje és az azokból készülő tejtermékek központi szerepet töltenek be az emberi táplálkozásban. A későbbi korokban kimondottan sokféle tejterméket állított elő az emberiség, ezek némelyike nagyon speciális tulajdonságokkal rendelkezik, ilyen például a francia eredetű roquefort sajt. Előfordulhat, hogy a drágább alapanyagot igénylő termékek előállítása során sokszor az alacsonyabb árú tehéntejet használják fel az előállítási költségek csökkentésére, ugyanakkor a termék címkézésén ezt nem tüntetik fel, így a fogyasztót megtévesztik. Ez a becsületes termelőkkel és a fogyasztókkal szemben elkövetett tisztességtelen kereskedelmi gyakorlat vezetett oda, hogy az Európai Unió tagállamaiban szigorú szabályozás van érvényben az élelmiszeripari termékek előállításának és ezek címkézésének vonatkozásában. A PDO megjelölést olyan védett eredetű termékekre alkalmazzák, amelyek csak meghatározott földrajzi helyen, környezeti körülmények között és módon készülhetnek el.

Számos módszert és technikát dolgoztak ki az élelmiszerek eredetvizsgálatára. Ezek között szerepelnek analitikai és molekuláris biológiai technikák egyformán. Az utóbbiak alkalmazása az elmúlt évtizedben vált egyre hangsúlyosabbá. Elterjedtek az immunológiai, kromatográfiás és elektroforetikus technikák. A fajazonosítás során többfajta megközelítést is alkalmaznak, attól függően, hogy milyen típusú anyagokat szándékoznak vizsgálni, mi alapján akarják detektálni az élelmiszer összetevőit adó fajt/fajokat. A zsírtartalmon és zsírsav-, valamint triglicerid összetételen alapuló eljárások jól alkalmazhatóak a magas zsírtartalommal rendelkező termékek, illetve fajok esetében, de sovány tejtermékek vizsgálatára alkalmatlanok. A fehérjék vizsgálatán alapuló módszerek már sokkal elterjedtebbek, kevesebb korlátozó tényezőjük van, csak úgy, mint a DNS alapú módszereknek. A fehérjék vizsgálatát mind immunológiai (ELISA), mind kromatográfiás (HPLC), mind elektroforetikus (2D-PAGE) módszerekkel végre lehet hajtani. A DNS alapú módszerek közül elterjedten használják a multiplex-PCR reakciókat, a PCR-RFLP és PCR-SSCP eljárásokat. Mindegyik felsorolt fehérje és DNS alapú technikával megfelelő pontossággal lehet meghatározni a jelenlévő fajokat, akár rendkívül kis koncentráció mellett is. Elterjedten végeznek ezekkel a módszerekkel kutatásokat, és fejlesztések folynak ezeknek a módszereknek széleskörű alkalmazására. Plath és munkatársai 1997-es tanulmányukban számoltak be arról, hogy érett sajtokból kivont β -kazein gén szakaszait felszaporítva, 0,5 v/v%-os tehéntej jelenlétét is detektálni tudták. A legtöbb tanulmányban a 0,5 v/v% az a legkisebb érték, ami PCR reakció használatával még kimutatható (Mayer, 2005).

A munkánk során laboratóriumi körülmények között összeállított különböző fajösszetételű DNS keverékekkel, valamint kereskedelmi forgalomból származó sajtokból kivont DNS-sel dolgoztunk. Célunk volt, hogy egy kellőképpen érzékeny, de ugyanakkor költséghatékony módszert fejlesszünk a szarvasmarha, bivaly, juh és kecske fajok kimutatására tejből, illetve tejtermékekből. A felhasznált primereket a 12S rRNS mitokondriális gén szekvenciájára terveztük, úgy hogy a felszaporított szakaszban a fajok között több nukleotid eltérés legyen. Ezeket a szakaszokat SSCP vizsgálathoz egyszálúsítottuk, majd az így a fajok közötti szekvenciaeltérések miatt egyedi konformációt felvevő DNS szálakat poliakrilamid gélen szeparáltuk egymástól, fajspecifikus sávmintázatot kapva eredményül. A kapott sávmintázatok intenzitásértékeit Uvipro Platinum (Uvitec) képelemző szoftver felhasználásával határoztuk meg. A kapott intenzitásértékek alapján megállapítottuk, hogy a kevert DNS minták esetében, ahol a keverési tartomány 0,1 és 50 v/v% között volt, a bivaly és szarvasmarha kevert DNS-ével végzett vizsgálatban 3 v/v%, míg a juh, valamint a kecske DNS-ével kevert szarvasmarha DNS-t 5 v/v%-os értéknél lehet kimutatni. A sajtmintákból származó DNS-sel végzett PCR-SSCP vizsgálat során 7 kereskedelmi forgalomban kapható sajtot vizsgáltunk meg. Ebből a hét sajtból három esetében egyezett meg a kimutatott faj, valamint a címkén megnevezett faj, négy esetben egyértelműen hamisítás mutatható ki.

Az általunk tervezett primerek megnyithatják továbbá az utat más fajok vizsgálatához is, hiszen a 12S rRNS gén szekvenciájának egy konzervatív szakaszára vannak tervezve. Amennyiben további vizsgálatok igazolják, hogy nem csak a négy faj esetében alkalmasak ezek a primerek a PCR-SSCP alapú fajazonosításhoz, akkor lehetőség nyílik egy kis műszerigényű, költséghatékony, fajazonosításra alkalmas molekuláris biológiai módszer fejlesztésére.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A következőkben szeretnék köszönetet mondani azoknak, akik lehetővé tették munkám megvalósulását, valamint segítséget nyújtottak annak kivitelezésében.

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Czeglédi Leventének**, témavezetőmnek, az Állattenyésztési Tanszék egyetemi adjunktusának, hogy hasznos tanácsaival, magyarázataival, valamint laboratóriumi munkámban nyújtott segítségével lehetővé tette a dolgozatom elkészülését.

Továbbá köszönetemet szeretném kifejezni **Dr. Jávor András** intézetvezetőnek, egyetemi tanárnak, amiért munkámat az **Állatgenetikai Laboratóriumban** elvégezhettem.

Valamint köszönettel tartozom **Gulyás Gabriella** PhD hallgatónak a molekuláris biológiai módszerek kivitelezésében nyújtott segítségével és magyarázataiért.

Szeretnék továbbá köszönetet mondani az **Állatgenetikai Laboratórium minden tagjának**, hogy munkám során bármilyen szakmai jellegű kérdéssel fordulhattam hozzájuk.

A dolgozat elkészítését a **TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007** és a **TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024** számú projektek támogatták. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

- Abdel-Rahman, S.M. – Ahmed, M.M.M.** (2007) Rapid and sensitive identification of buffalo's, cattle's and sheep's milk using species-specific PCR and PCR-RFLP techniques. *Food Control*. 18, 1246-1249.
- Addeo, F. – Moio, L. – Chianese, L. – Stingo, C. – Di Luccia, A.** (1990a) Improved procedure for detecting bovine and ovine milk mixtures in cheese by isoelectric focusing of para- κ -casein. *Milchwissenschaft*. 45, 221-224.
- Addeo, F. – Moio, L. – Chianese, L. – Stingo, C. – Resmini, P. – Berner, I.** (1990b) Use of plasmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in ovine and/or caprine cheese by gel isoelectric focusing of γ_2 -caseins. *Milchwissenschaft*. 45, 708-711.
- 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.
- Amills, M. – Francino, O. – Jansa, M. – Sánchez, A.** (1997) Isolation of genomic DNA from milk samples by using Chelex resin. *Journal of Dairy Research*. 64, 231-238.
- 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.
- Bottero, M.T. – Civera, T. – Anastasio, A. – Turi, R.M. – Rosati, S.** (2002) Identification of cow's milk in „buffalo” cheese by duplex polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection*. 65, 362-366.
- 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.
- Calvo, J.H. – Osta, R. – Zaragoza, P.** (2002) Species-specific amplification for detection of bovine, ovine and caprine cheese. *Milchwissenschaft*. 57, 444-446.
- 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.

- Csapó, J. – Csapóné Kiss, Zs.** (2009) A tehéntej táplálkozástudományi szempontból legfontosabb összetevői. I. Fehérjetartalom és aminosavösszetétel, zsírtartalom és zsírsavösszetétel. A tej szerepe a humán táplálkozásban. Bp. Melánia Kiadó Kft. 147-162.
- Csapó, J. – Csapóné Kiss, Zs.** (2009) A tehéntej táplálkozástudományi szempontból legfontosabb összetevői. II. Laktóz-, ásványianyag- és vitamintartalom. A tej szerepe a humán táplálkozásban. Bp. Melánia Kiadó Kft. 167-184.
- 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.
- Foßy, H.** (1981) Analytische Möglichkeiten zur Differenzierung verschiedener ~~Bakterien~~ **Bakterien**. Milchwirtschaftliche Berichte. 68, 173-178.
- García, T. – Martín, R. – Rodríguez, E. – Morales, P. – Hernandez, P.E. – Sanz, B.** (1990) Detection of bovine milk in ovine milk by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. Journal of Dairy Science. 73, 1489-1493.
- 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.
- 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.
- Higgins, D.G. – Bleasby, A.J. – Fuchs, R.** (1992) CLUSTAL W: Improved software for multiple sequence alignment. Computer Applications in the Biosciences. 8, 4420-4449.
- Kenshi Hayashi.** (1999) Recent enhancements in SSCP. Genetic Analysis: Biomolecular Engineering. 14, 193-196.
- Kocher, T.D. – Thomas, W.K. – Mayer, A. – Edwards, S.V. – Pääbo, 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.
- Kukovics, S. – Unger, A. – Bakos, E. – Szakály, S.** (2009) Sajtfeleségek. A tej szerepe a humán táplálkozásban. Bp. Melánia Kiadó Kft. 19-34.

López-Calleja, I. – González Alonso, I. – Fajardo, V. – Rodríguez, M.A. – Hernández, P.E. – García, T. – Martín, R. (2005) PCR detection of cows' milk in water buffalo milk and mozzarella cheese. *International Dairy Journal*. 15, 1122-1129.

Maudet, C. – Taberlet, P. (2001) Detection of cows' milk in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism. *Journal of Dairy Research*. 68, 229-235.

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 κ -caseins. *International Dairy Journal*. 7, 619-628.

Mayer, H.K. (2005) Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. *International Dairy Journal*. 15, 595-604.

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.

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.

Szalayné Kónya, Zs. (2009) Sajt. A tej szerepe a humán táplálkozásban. Bp. Melánia Kiadó Kft. 518-519.

Zsolnai, A. – Orbán, L. (1999) Accelerated separation of random complex DNA patterns in gels: comparing the performance of discontinuous and continuous buffers. *Electrophoresis*. 7, 1462-1468.

Internetes hivatkozások:

- I1** http://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xsadat_eves/i_oma003.html
- I2** http://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xsadat_eves/i_oma002.html
- I3** http://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xsadat_eves/i_oma001a.html
- I4** http://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xsadat_eves/i_oma001b.html
- I5** http://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xsadat_eves/i_int055.html
- I6** http://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xsadat_eves/i_int059.html

- I1** *Letöltés dátuma: 2012.10.03.*
- I2** *Letöltés dátuma: 2012.10.03.*
- I3** *Letöltés dátuma: 2012.10.03.*
- I4** *Letöltés dátuma: 2012.10.03.*
- I5** *Letöltés dátuma: 2012.10.04.*
- I6** *Letöltés dátuma: 2012.10.04.*