

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 7: Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní hospodářství

Použití multiplexní qPCR ke kvantifikaci složek masných výrobků

Karolína Grosmanová
Jihomoravský kraj

Brno 2023

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 7: Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní hospodářství

Použití multiplexní qPCR ke kvantifikaci složek masných výrobků

Using multiplex qPCR to quantify components of meat
products

Autoři: Karolína Grosmanová

Škola: Gymnázium Brno, Křenová, příspěvková organizace

Kraj: Jihomoravský kraj

Konzultant: Mgr. Králík Petr, Ph.D.

Brno 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne 29. 1. 2023

Karolína Grosmanová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému konzultantovi Mgr. Petru Králíkovi, PhD., za jeho trpělivost, cenné rady při práci v laboratoři a jeho odborné připomínky. Také mi pomohl porozumět dané problematice a vždy mi vše dopodrobna vysvětlil. Dále bych ráda poděkovala za statistické zpracování výsledků RNDr. Vladimírovi Babákovi. Dále pak mé poděkování patří paní Gabriele Kalinové za poskytnutí vzorků izolované DNA, kterou jsem ve své práci analyzovala. Celá práce byla vypracována v rámci rozsáhlé studie provedené na Ústavu hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie na Veterinární univerzitě v Brně. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za podporu.

Anotace

Tato práce se zabývala problematikou procentuálního zastoupení množství masa v masných výrobcích pomocí multiplexní qPCR. Kvantitativní stanovení jednotlivých složek masových směsí nebo masných výrobků je důležité pro kontrolu kvality potravin a zabránění jejich falšování. Na začátku výzkumu byla izolována samostatná DNA ze tří vzorků masa (kuřecí, vepřové, hovězí) a následně byla smíchána v různých poměrech. Ve stejných poměrech jednotlivých druhů byly připraveny směsi masa a masné výrobky tepelně upravené i neupravené. Zároveň byly vytvořeny i kontrolní vzorky, u kterých bylo předem dané procentuální zastoupení jednotlivých složek. Následně byly všechny vzorky analyzovány metodou multiplexní qPCR při ředění všech vzorků na koncentraci 10 ng/μl a zároveň podrobeny kontrole metodou ddPCR. Při matematickém zpracování analyzovaných výsledků nebyl shledán statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými skupinami odpovídajících vzorků vyšetřených metodou qPCR ani kontrolní metodou ddPCR. Procentuální zastoupení jednotlivých druhů masa zjištěné pomocí metody multiplexní qPCR odpovídá skutečnosti, což umožní jednoduché a rychlé kvantitativní stanovení jednotlivých složek masových směsí a masných výrobků.

Klíčová slova

DNA, falšování potravin, masné výrobky, multiplexní qPCR, PCR

Annotation

This work dealt with the issue of the percentage of meat in meat products using multiplex qPCR. The quantification of individual components of meat mixtures or meat products is important for quality control of food and to prevent adulteration. At the beginning of the research, separate DNA was isolated from three meat samples (chicken, pork, beef) and then mixed in different proportions. Meat mixtures and cooked and uncooked meat products were prepared in equal proportions of each species. At the same time, control samples were also created with predetermined percentages of each ingredient. Subsequently, all the samples were analysed by multiplex qPCR, diluting all the samples to a concentration of 10 ng/μl, and at the same time subjected to the ddPCR control method. The mathematical treatment of the analysed results showed no statistically significant difference between the individual groups of the corresponding samples analysed by the qPCR method or the ddPCR control method. The percentages of the individual meat species determined by the multiplex qPCR method correspond to reality, allowing a simple and rapid quantitative determination of the individual components of the meat mixtures and meat products.

Keywords

DNA, adulteration of food, meat products, multiplex qPCR, PCR

Obsah

Obsah	5
ÚVOD	7
I. TEORETICKÁ ČÁST	9
1. Úvod.....	9
2. Historie.....	9
3. Legislativa.....	9
4. Principy	10
5. Zdravotní rizika.....	11
6. Maso a masné výrobky	11
7. Průkaz falšování.....	13
7.1 Metody založené na analýze DNA.....	13
7.1.1 Kvantitativní PCR.....	15
7.1.2 Multiplexní PCR.....	16
7.2 Imunologické metody	16
7.2.1 Přímý test ELISA	17
7.2.2 Nepřímý test ELISA.....	17
7.2.3 Sendvičový test ELISA.....	18
7.3 Chromatografie	18
7.3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	19
7.3.2 HCLP-MS	19
II. PRAKTICKÁ ČÁST.....	21
1. Cíl.....	21
2. Materiál a metody	21
2.1 Původ masa a příprava vzorků.....	21
2.2 Příprava DNA	23

2.3 qPCR analýza.....	24
2.4 Výpočet procentuálního podílu při použití qPCR.....	25
2.5 Statistická analýza.....	26
3. Výsledky	26
3.1 Vliv metody výpočtu na interpretaci dat qPCR	26
3.2 Analýza směsí vzorků masa, masných výrobků a směsí DNA pomocí qPCR	28
3.3 Analýza komplementarity získaných dat	29
4. Diskuse.....	29
5. Závěr	30
Literatura.....	31
Seznam obrázků	33
Seznam tabulek	33
Seznam zkratk	34

ÚVOD

Falšování potravin je nejspíše stejně staré jako jejich výroba za účelem obchodu. Metody schopné odhalit přítomnost určitých složek v potravinách jsou zásadním předpokladem pro odhalování falšování potravin (úmyslného nebo neúmyslného). Metody používané k průkazu falšování potravin slouží k odhalování praktik klamání spotřebitele a nezákonného obohacování výrobců potravin. Kromě toho hrají roli i v ochraně spotřebitelů před možným výskytem alergických reakcí nebo konzumací zakázaných potravin u náboženských či sociálních skupin. V současnosti se uplatňuje celá řada metod, které jsou používány k detekci jednotlivých složek potravin založené na chromatografii, spektroskopii, elektroforéze, sledování stabilních izotopů, dále imunologické metody a proteomické metody sloužící ke stanovení sekvence aminokyselin a v neposlední řadě se stále více prosazují metody založené na analýze DNA. Současné detekční metody pro vyšetření masných výrobků jsou většinou založeny na detekci proteinů nebo DNA. Protože je obtížné dokazování bílkovin v tepelně zpracovaných potravinách vzhledem k jejich termolabilitě a denuraci při vyšších teplotách jsou výhodnější metody založené na analýze DNA. Molekula DNA je tepelně stabilnější než molekula proteinu a je možné ji detekovat a amplifikovat i u tepelně opracovaných výrobků. Při analýze vzorku je kromě identifikace jednotlivých složek nezbytná i jejich kvantifikace. Požadavky na kvalitativní a kvantitativní vyšetření splňuje metoda PCR, u které je zaručena vysoká specificita, citlivost a přesnost detekování jednotlivých složek i při velmi malé koncentraci. Kromě základní PCR metody se při důkazu a posouzení jednotlivých složek prosazuje qPCR, která umožní určit zastoupení sledované DNA v průběhu vyšetření na rozdíl od klasické PCR metody, kdy je umožněna analýza až po ukončení celého procesu. Další zjednodušení a zrychlení představuje multiplexní PCR, případně multiplexní qPCR, při které dochází zároveň během jednoho cyklu k amplifikaci několika různých sekvencí DNA. Odhalení sledované složky v potravině je relativně jednoduché (přítomná/nepřítomná), větším problémem je stanovení podílu této složky v celém výrobku. Za ideálních podmínek v laboratorně připraveném produktu, který obsahuje čistou svalovinu nebo směs svalů několika živočišných druhů, lze použít kvantifikaci na základě hmotnostního poměru. V reálných podmínkách však výsledky mohou být ovlivněny úrovní degradace DNA během zpracování, inhibicí PCR, účinností extrakce DNA nebo velikostí genomu. Proto se doporučuje kvantifikace PCR založená na kvantifikaci genom/genom spíše než na hmotnostním poměru, protože ekvivalenty genomu jsou konstantní. Použitím referenčních vzorků se známým množstvím DNA podobné analyzovanému vzorku složením i koncentrací pak dále zlepšíme přesnost metody a multiplexováním několika cílů do jediné reakce lze dosáhnout stejných výsledků jako u pracných single-plex testů v podstatně kratším čase. Masné výrobky kromě masa většinou obsahují celou řadu dalších složek (vnitřnosti, led, koření, obiloviny, sóju), jejichž celkový obsah může být poměrně veliký. Problém těchto složek spočívá v tom, že obsah DNA těchto složek neodpovídá hmotnosti složky v potravině nebo tato složka DNA vůbec neobsahuje. Z těchto důvodů by výsledek PCR analýzy měl odpovídat procentu sledovaného druhu masa z celkového objemu masa a ne z celkovému objemu produktu. Kvantitativní analýza jednotlivých druhů masa v potravinách (tepelně neošetřených, tepelně opracovaných, fermentovaných) je složitý proces, který je poměrně ekonomicky nákladný a náročný na přístrojové vybavení laboratoří. Tyto omezení jsou překážkou rozšíření pravidelných kontrol potravin, což může ovlivnit i frekvenci falšování. Zavedení ekonomicky výhodnějšího a rychlejšího vyšetření, které umožní kvalitativní i kvantitativní rozbor směsí masa a masných výrobků bez ohledu na pokročilost a druh zpracování, umožní celý proces kontroly zjednodušit tak, aby byl validní rozbor proveditelný i v běžných laboratořích. Rozšíření takové metody pomůže sjednotit současnou

nejednotnost ve výpočtu procentuálního zastoupení jednotlivých druhů masa prováděném různými postupy v různých a laboratořích.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1. Úvod

V dnešní době patří znalost složení jednotlivých potravin k modernímu způsobu života, což souvisí nejen s životním stylem, rozvojem bioproduktů, ale i hrozbou geneticky modifikovaných potravin. Důležitá je znalost složení potravin i z hlediska dodržování různých typů diet, v souvislosti s náboženskými omezeními a rozvojem alergií na jednotlivé složky potravin.

2. Historie

Falšování potravin i dalších výrobků začalo již v době, kdy začaly být tyto věci produkovány nejen pro vlastní spotřebu, ale docházelo k jejich výměně buď přímo pomocí barterového obchodu nebo prostřednictvím platidla, které ovšem mohlo být, a také často bylo falšováno. Již v nejstarším dochovaném zákoníku krále Chammurapiho je jeden z paragrafů věnovaný falšování piva (§ 108 Jestliže krčmářka nepřijala obilí k zaplacení piva, avšak přijala peníze podle velké váhy, nebo snížila množství piva ve vztahu k množství obilí, tuto krčmářku usvědčí a hodí do vody). [1] Zmínky a zákazy falšování jsou obsaženy i v Talmudu, Bibli a Koránu. V našich zemích se o falšování potravin zmiňuje Daniel Adam z Veleslavína (1546–1599) a popisuje je i Zikmund Winter v knize Zlatá doba českých měst. [2] Při falšování potravin docházelo k míchání pepře s chlebovou kůrou, znehodnocování šafránu nekvalitními rostlinnými barvivy, mléko se šidilo vodou, mýdlem nebo křídou, do mleté papriky se přidávaly cihly, do mouky sádra. Mezi často falšované potraviny patřilo máslo, do kterého se přidávala voda nebo se míchalo s lojem.

S rozvojem potravinářského průmyslu docházelo ke stále častějšímu a dokonalejšímu falšování potravin, ale zároveň se rozvíjelo i odhalování těchto podvodů. Za zakladatele kontroly potravin je považován německý chemik působící v Londýně Friedrich Christian Accum (1769–1838), na kterého navázal britský lékař a chemik Arthur Hill Hassall (1817–1894). Ve svých dílech odhalili náhražky a metody používané k falšování potravin a jejich nebezpečí pro život člověka. [3, 4]

3. Legislativa

Vzhledem ke zdravotním rizikům a ekonomickým ztrátám byly státy napříč Evropou nuceny postupně vytvářet zákony o prodeji potravin, které měly ochránit spotřebitele. V Rakousku Uhersku byl v roce 1911 vydán Codex Alimentarius Austriacus [5], který kompletně upravoval problematiku poživatin, tento dokument byl zapracován po roce 1918 i do právního řádu nově vzniklé ČSR. Po roce 1948 byl zákon nahrazen technickými a oborovými normami. Protože však postupně docházelo ke ztrátě kvality, byl v roce 1997 vydán nový Zákon o potravinách a tabákových výrobcích číslo 110/97 Sb.. Po vstupu České republiky do Evropské unie prošlo potravinové právo zásadními změnami, protože bylo nezbytné jej harmonizovat s evropskou potravinovou legislativou. Základním předpisem unijní úpravy potravinového práva je Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) číslo 178/2002, které stanoví obecné zásady a požadavky potravinového práva, zřizuje Evropský úřad pro bezpečnost potravin a stanoví postupy, které se týkají bezpečnosti potravin, včetně systému rychlého varování pro potraviny a krmiva RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed). Na něj pak

navazuje nařízení č. 1169/2011 o poskytování informací o potravinách spotřebitelům, které přineslo nové povinnosti pro výrobce potravin. A přestože tyto zákony pojem „falšovaná potravina“ či „falšování“ neznačí a přímo se zde tyto termíny nevyskytují, další právní předpisy už na tuto oblast pamatují. Oba základní dokumenty zakazují uvádět do oběhu potraviny klamavě označené nebo uvádějící spotřebitele v omyl nejen z hlediska označování potraviny, ale i propagace a obchodní úpravy, jejího tvaru, vzhledu nebo balení, použitých obalových materiálů, způsobu její úpravy a místa vystavení, jakož i z hlediska informací poskytovaných o ní jakýmkoliv médiem. Specifickým případem falšování potravin a klamání spotřebitele je nedodržování požadavků vycházejících ze Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2000/13/ES týkající se označování zdůrazněných složek, které musí být uvedeno na obalu v blízkosti názvu nebo u příslušné složky. Další požadavky na složení jednotlivých druhů potravin jsou upřesněny ve vyhláškách k Zákonu o potravinách číslo 110/97 Sb.. Jedná se například o vyhlášku číslo 157/2003 Sb., která stanoví požadavky pro čerstvé ovoce a čerstvou zeleninu, zpracované ovoce a zpracovanou zeleninu nebo vyhlášku číslo 326/2001 Sb., stanovující požadavky pro maso, masné výrobky, ryby, ostatní vodní živočichy a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich, požadavky na hlavní vybrané masné výrobky a zejména složení definovaných masných výrobků.

Podle Zákonu o Státní zemědělské a potravinářské inspekci (SZPI) číslo 146/2002 Sb., SZPI kontroluje v rámci stanovených kompetencí zemědělské výrobky, potraviny nebo tabákové výrobky, a rovněž předměty a materiály přicházející do styku s potravinami. Od roku 2015 přibyla do kompetencí SZPI také kontrola reklamy a kontrola pokrmů v některých zařízeních společného stravování. Kontrolou při výrobě a prodeji potravin jsou v různých fázích produkce pověřeny kromě SZPI také Státní veterinární správa, Ministerstvo zdravotnictví a Česká obchodní inspekce. [6]

4. Principy

Hlavní principy falšování potravin se v průběhu historie nemění a jejich motivem zůstává především ekonomický zisk. Z tohoto důvodu jsou nejčastěji falšovány buď drahé potraviny (lihoviny, víno, koření) nebo potraviny prodávané ve velkých objemech (masné a mléčné výrobky, tuky, ovocné šťávy). Mezi hlavní způsoby falšování potravin patří:

1. Záměna potraviny za jinou levnější (vydávání levnější odrůdy za dražší, vydávání mořského pstruha za lososa, vydávání jiných rostlinných olejů za olivový).
2. Nastavování potraviny levnější složkou (nedeklarované nebo přílišné křehčení masa, nedodržení požadavků na obsah tzv. glazury u zmražených mas, částečná nebo úplná náhrada rýže Basmati levnějšími druhy, přídavky kravského mléka do buvolího při výrobě pravé mozarely).
3. Přítomnost nedeklarovaných složek (nepovolené nebo nedeklarované použití strojně odděleného masa v masných výrobcích, nedeklarované použití vnitřností v masných výrobcích nebo nedodržení deklarovaného podílu, nedeklarované použití jiných druhů masa v masných výrobcích např. drůbežího, koňského).
4. Nastavení nebo falšování potravin ke zlepšení jejich vlastností (přídavek glycerolu do vína ke zlepšení chuti, nedovolená aromatizace vín, přibarvování, přislazování).

5. Nedodržení deklarovaného technologického postupu (vydávání rozmrazeného masa a ryb za čerstvé, rozpékaného pečiva jako čerstvého, nedeklarované použití gama záření při výrobě, vydávání rekonstituované šťávy z koncentrátu za šťávu čerstvě lisovanou, vydávání syntetické kyseliny octové za kvasný ocet).
6. Uvádění vyššího než skutečného obsahu složky (uvádění vyššího počtu vajec v těstovinách, deklarace podílu svalových bílkovin v masných výrobcích zkreslená přidávkem krevních bílkovin a dalších složek).
7. Nesprávné uvádění geografického původu nebo způsobu produkce (vydávání ryb produkovaných na farmách za divoké, označování obvyklé produkce za bio vydávání dovozových vín za moravská).
8. Zneužití známé značky (falešný prodej výrobku pod dražší obchodní značkou, používání obalů, etiket, názvů připomínajících známou značku) [7].

5. Zdravotní rizika

Ve většině případů falšování potravin vede pouze k neoprávněnému ekonomickému zisku (náhrada hovězího masa koňským v různých typech masných výrobků, doslazované medy, ředěné burčáky), ale v určitých případech může být ohrožené zdraví nebo i život konzumentů (záměna denaturovaného oleje za konzumní Španělsko 1981, přimíchání metanolu do lihovin Česká republika 2012, přidání melaminu do mléčných produktů Čína 2008, doplňky stravy s farmakologicky účinnými látkami – sildenafil, tadalafil nebo anabolické steroidy, manipulace s datem použitelnosti potravin, příměs nedeklarovaných alergenů – arašídů, lepek).

6. Maso a masné výrobky

Složení masa se výrazně liší podle toho, ze kterého živočišném druhu a ze které anatomické části těla zvířete pochází. Mezi základní složku masa patří bílkoviny, které tvoří 15 %–23 % z celkové hmoty. Převažují myofibrilární bílkoviny (aktin, myosin), méně jsou zastoupeny sarkoplasmatické bílkoviny (enzymy, myoglobin, hemoglobin) a minoritní složkou jsou pak strukturní bílkoviny (kolagen, elastin). Pro rychlé hodnocení složení masa a obsahu bílkovin v mase se používá tzv. Federovo číslo, které vyjadřuje poměr obsahu vody a bílkovin a nabývá hodnot kolem 3,5 (70:20). Tuk je zastoupen v mase v 1 %–30 %, je zde vysoký podíl kyseliny palmitové a dalších nasycených mastných kyselin. Sacharidy jsou zastoupeny především glykogenem (1 %) a volnou glukózou (0,1 %), maso je i zdrojem minerálů (vápník, fosfor, železo) a vitamínů především skupiny B.

K základním analytickým technikám pro sledování kvality masa patří gravimetrické metody stanovení vody, extrakce pomocí organických rozpouštědel pro stanovení tuku a stanovení bílkovin pomocí Kjeldahlovy metody. Z pokročilých instrumentálních metod se pro účely hodnocení autenticity používají metody PCR (polymerázové řetězové reakce), imunologické a enzymové metody, chromatografie, elektroforéza, spektroskopie, hmotnostní spektrometrie, izotopové metody, histologie, mikroskopie a analýza vzhledu a umístění anatomických částí.

V širším smyslu můžeme za maso považovat všechny požitelné části těl zvířat nejen jatečných, ale i ryb, korýšů, měkkýšů a obojživelníků určených ke konzumaci (tj. svalovinu, krev, sádlo, šlachy, ale i vnitřnosti). V užším smyslu pak za maso považujeme pouze kosterní svalovinu s přirozeně se vyskytující pojivovou a tukovou tkání. K falšování masa může docházet při dodávce poražených zvířat nebo jejich částí nebo při prodeji výsekového masa. K dalšímu falšování pak může docházet ve zpracovatelských provozech včetně gastronomie. Mezi nejčastější způsoby falšování masa patří:

1. Záměna živočišného druhu masa za lépe dostupné nebo levnější. To způsobuje spotřebiteli újmu nejen ekonomickou a finanční, ale i psychickou, tím, že zkonzumuje maso živočišného druhu pro něj z náboženského (vepřové pro muslimy, hovězí pro hinduisty) nebo z etického důvodu (koňské, psí, opičí nebo krysí maso) nepřijatelné. Při kontrole lze živočišné druhy částečně rozlišit pomocí metody identifikace druhově specifických bílkovin (imunochemické metody, kapilární gelová elektroforéza, kapalinová chromatografie) a genetických metod (PCR).

2. Záměna pohlaví, věku (kráva, býk, jalovice, volk), plemene nebo svalové partie. Spotřebitelé většinou dávají přednost z chuťových i bezpečnostních důvodů masu mladého skotu (telecí, býčků a jalovic), toto je pak nahrazeno méně kvalitním a do jisté míry rizikovějším masem starších krav. Pro průkaz pohlaví je možné použít chromatografické a imunochemické metody stanovení pohlavních hormonů v mase (HPLC-MS, ELISA), molekulárně-biologické metody (real-time PCR) založené na přítomnosti XX a XY chromozomu, metoda určující přítomnost SRY (sex-determining region Y) nebo TSPY (testis-specific protein Y), což jsou markery specifické pro samčí hovězí maso. Záměna svalové partie se týká nejčastěji hovězího masa. Rozlišení na jednotlivá steaková masa je z důvodu anatomické podobnosti velmi obtížné. Nezávislé laboratorní metody pro tyto účely nejsou k dispozici.

3. Nepravdivá deklarace zeměpisného původu masa, u kterého musí být uvedeno kde bylo zvíře chováno, a kde bylo poraženo. Jedná se o vepřové, drůbeží, skopové a kozí maso čerstvé, chlazené nebo zmrazené a hovězí maso a výrobky z hovězího masa. Kromě kontroly povinné dokumentace se pro průkaz původu používají nejvíce instrumentální metody analýzy minoritních minerálních látek a poměru izotopů, které jsou ovlivněny přijímaným krmivem, vodou, znečištěním a složení půdy.

4. Záměna způsobu produkce a zpracování masa (bio/konvenční, chované na farmách/divoké, čerstvé/zmrazené/rozmrazené, mleté maso/masný polotovar/strojně oddělené maso). Maso, které pochází z ekologických chovů, je obvykle prodáváno za násobně vyšší cenu než konvenční produkce. Vzhledem ke stejnému složení je velmi obtížné spolehlivě identifikovat individuální markery typické pro tento způsob chovu. Proto jsou kontrolní postupy v této oblasti založené především na kontrole technologických postupů u producentů, zpracovatelů a distributorů. Lze však prokázat přítomnost cizorodých látek v bioproduktech. K průkazu přítomnosti veterinárních léčiv a růstových hormonů lze použít chromatografické metody, ke stanovení metylesterů polynenasycených mastných kyselin v tuku (kontaminovaná krmiva) slouží plynová chromatografie. K záměně zmrazeného masa za čerstvé dochází nejčastěji u ryb, které jsou po zmrazení, skladování a následném rozmrazení vydávány za čerstvé. Zmrazování masa má opodstatnění v řadě případů. Zajistí prodloužení jeho zpracovatelnosti, uchování po dlouhou dobu a usmrcení případných parazitů (toxoplasma, svalovec). Na druhou stranu dochází k změně barvy a struktury, uvolňování vody a v ní rozpuštěných nutričně a sensoricky významných složek. Metody detekce zmrazení vycházejí nejčastěji ze stanovení chemických a fyzikálních vlastností exsudátu.

5. Nedeklarované nebo nepovolené použití přidaných látek (přidavek vody, barviv, koření, konzervantů), které slouží ke zlepšení smyslových vlastností nebo prodloužení trvanlivosti masa. Mezi nejčastěji používaná patří červená přírodní i syntetická barviva pro zdokonalení barvy (kyselina karmínová, kurkumin, červeň Alura AC, paprikové extrakty), konzervační látky a antioxidanty (dusitany, bakteriociny, kyselina mléčná a askorbová) sloužící k prodloužení trvanlivosti nebo zakrytí nevyhovujících podmínek výroby a skladování. Dále sem patří i látky, které váží vodu a zlepšují texturu (fosfáty, kyselina citronová, algináty, karagenany) a aromata (kouřové, paprikové, citrusové) nahrazující tradiční postup při zpracování potravin. Většinu z uvedených látek lze potvrdit pomocí chromatografických metod. Mezi ekonomicky nejvýhodnější a nejčastěji používanou přidanou látku patří použití vody, a to jak její injektáž přímo do masa (křehčení), tak vytvoření krusty na povrchu (glazurace). Pro identifikaci tohoto druhu falšování lze použít stanovení poměru obsahu vody a bílkovin a jeho porovnání s tabulkovými hodnotami. Indikátorem přídavku vody je i přítomnost látek zvyšujících vaznost vody (organických kyselin, fosfátů).

6. Prodej zdravotně závadného nebo veterinárním pravidlům nevyhovujícího masa (uhynulá zvířata nebo nakažená masa).

7. Masné výrobky obsahují kromě základní suroviny tj. svaloviny jatečných zvířat i velkou část různých aditiv (voda, tuk, kůže, mouka, sója, koření), které jsou pro jejich výrobu tradiční a nezbytné. To s sebou přináší i celou řadu možností falšování náhradou dražší suroviny za levnější, záměny určitého podílu masa v masných výrobcích za jiné suroviny (tuk, kůže, mouka, voda, sójová bílkovina), nedodržení receptury a zakrytí stop přidáním barviv, koření, emulgátorů nebo konzervačních látek. Ve většině případů pak dochází ke kombinaci několika druhů falšování. Nejčastějším problémem je výměna vykostěného masa za maso separované, a to především za drůbeží separát. Dalším velkým problémem je také nesprávné uvádění složení výrobku na etiketách. [6, 8]

7. Průkaz falšování

Princip odhalování falšování vychází z předpokladu, že určité složky mají být ve výrobku zastoupeny v určitém poměru, který odpovídá deklarovanému složení nebo nemají být ve vzorku zastoupeny vůbec. Je také možné prokazovat látku, která při falšování vzniká nebo se přidává, aby toto falšování kryla (prokazování strojně odděleného masa na zjištění přítomnosti úlomků kostí a obsahu vápníku, průkaz křehčení masa na základě vyššího podílu vody a vyššího obsahu polyfosfátů). Druhou možností je analýza více složek, kdy získané výsledky jsou pak analyzovány statistickými metodami v závislosti na technologii zpracování (určení podílu sušiny vnesené rajčaty důkazem obsahu draslíku, kyseliny jablečné a kyseliny pyrrolidonkarboxylové, samotná hladina draslíku klesá při konzervaci zeleniny).

7.1 Metody založené na analýze DNA

Výhodou těchto metod je všudypřítomnost molekuly DNA a její relativní stabilita (především termostabilita), další výhodou je vysoká specifita a citlivost této metody.

V roce 1983 popsal Kary Mullis princip polymerázové řetězové reakce (PCR, polymerase chain reaction) a za tento objev dostal v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii. Pro rozvoj této metody byla

důležitá izolace termostabilní DNA polymerázy z bakterie *Thermus aquaticus* (Taq polymeráza), vyskytující se v horkých pramenech. Bez tohoto enzymu by nebylo možné metodu PCR používat ve větším měřítku. Dalším pokrokem pak bylo zavedení přístroje PCR thermocycler, který umožnil automatizaci a výrazné zrychlení a zlevnění celého procesu.

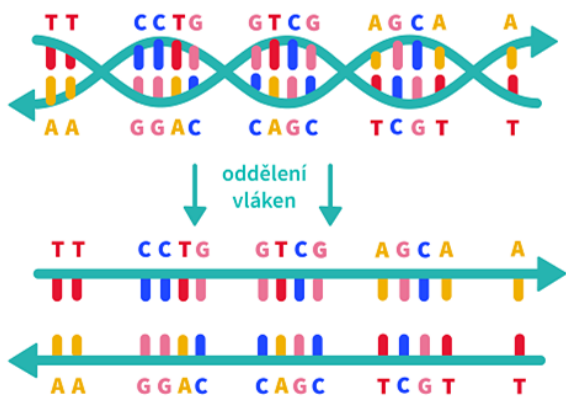
PCR je metoda rychlého a snadného zmnožení úseku DNA založená na replikaci nukleové kyseliny. Definované části DNA, které se mají amplifikovat, musí být ohraničeny dvojicí primerů (oligonukleotid DNA) na 3' konci každého antiparalelně orientovaného řetězce DNA. Každý PCR cyklus je tvořen třemi kroky, po každém cyklu dochází ke zdvojnásobení počtu cílové DNA, celkový počet kopií DNA tak narůstá exponenciální řadou.

1. Příprava vzorku

Během celého procesu odběru vzorku a jeho vyšetřování je nezbytné zabránit kontaminaci cizorodou DNA (rukavice, sterilní materiál, opakovaná dekontaminace během jednotlivých kroků, zabránění tvorby aerosolu při zpracování). Před zahájením samotné PCR je nezbytné ve vzorku DNA izolovat, musí dojít k lýze buněk, rozbití buněčné stěny a uvolnění DNA. Dále je nezbytné odstranění RNA případně i rozštěpení proteinů, pak následuje vyčištění vzorku od detergentů solí a dalších nečistot a posledním krokem je odstranění látek inhibujících polymerázu použitých při izolaci, čištění a zpracovávání DNA (fenol, proteináza K, vyšší koncentrace solí, heparin, kyselina boritá, etanol, EDTA).

2. Denaturace

DNA se zahřívá na teplotu 94 °C–98 °C. Při této teplotě dochází k rozrušení vodíkových můstků v molekule DNA, což vede k rozvolnění dvoušroubovice a vzniká jednovláknová DNA. (Obr. 1)

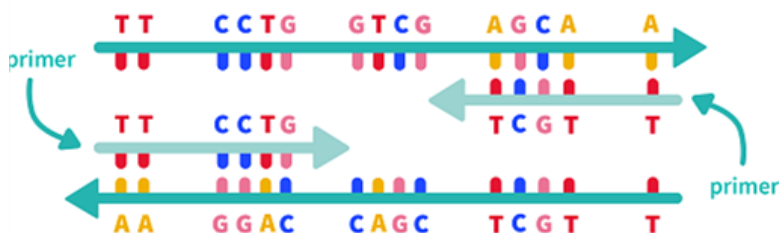


Obrázek 1. Denaturace DNA, přerušení vodíkových můstků a vznik jednovláknové DNA (převzato <http://old.vscht.cz/images/web-hr/Infografika-PCR-test.png>)

3. Hybridizace

Vzhledem k tomu, že dochází ke kopírování pouze určitého přesně definovaného úseku DNA, je nezbytné tuto specifickou sekvenci ohraničit pomocí primerů, které se naváží na dané sekvence po obou stranách cílové oblasti DNA. Pro navázání primerů je nezbytné snížení teploty na 50 °C–65 °C. Při této teplotě dochází k renaturaci DNA, ale při nadbytku primerů (oligonukleotidy) dochází k jejich nasednutí rychleji než k renaturaci. Důležitá je teplota, při příliš nízké teplotě primery nasedají i na

sekvence, které jsou komplementární jen z části, a vytvoří se tak nespecifický produkt, při příliš vysoké teplotě naopak nasedají obtížně a produktu se nevytvoří dostatečné množství. (Obr. 2)

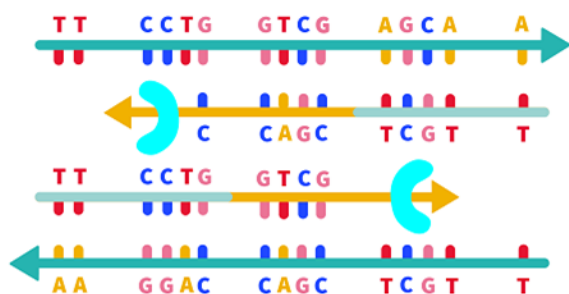


Obrázek 2. Hybridizace (annealing), dosednutí primerů na jednovláknovou DNA (převzato <http://old.vscht.cz/images/web-hr/Infografika-PCR-test.png>)

4. Elongace

Ve třetí fázi reakce se teplota opět zvýší v závislosti na použité DNA polymeráze (Taq polymeráza 75 °C–80 °C). V tomto kroku dochází k samotné syntéze DNA ve směru od 5' konce ke 3' konci. Výsledkem elongace jsou dvě identické kopie originální templátové DNA.

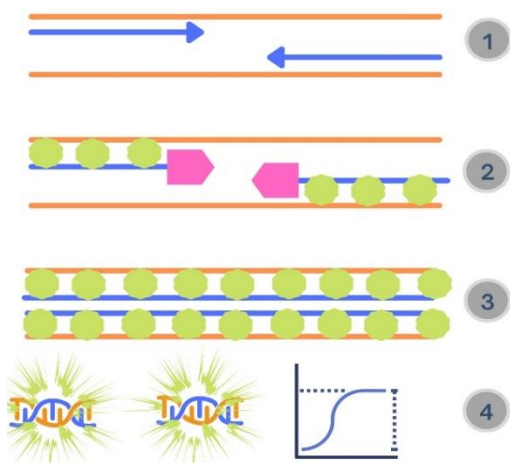
Po vytvoření dvou kopií DNA se celý cyklus opakuje, tentokrát s použitím nové, duplikované DNA. (Obr. 3) Pro amplifikaci se používá 30–35 cyklů. Po 30 cyklech je teoreticky v PCR zvýšeno množství cílové DNA o 9 řádů ($2^{30} \approx 10^9$ amplikonů). [9, 10]



Obrázek 3. Elongace, syntéza DNA podle vzoru templátové DNA. (převzato <http://old.vscht.cz/images/web-hr/Infografika-PCR-test.png>)

7.1.1 Kvantitativní PCR (RT PCR, Real-Time PCR, qPCR, quantitative PCR)

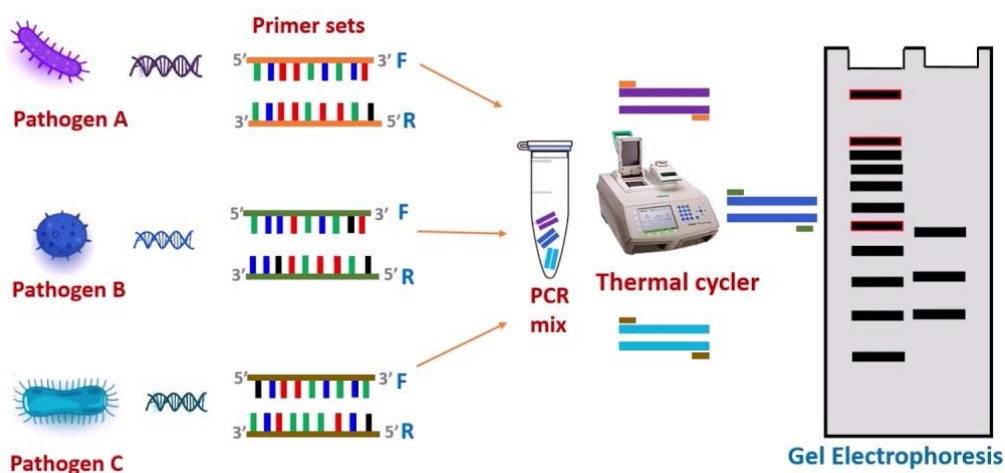
Je založena na klasické PCR metodě, umožňuje však sledovat amplifikaci specifického úseku DNA v reálném čase. Sledování amplifikace je založeno na přidání specifické fluorescenční značky, intenzita fluorescence pak odpovídá okamžitému množství amplifikované DNA ve vzorku. Následně lze z amplifikačních křivek identifikovat okamžik, kdy dojde k exponenciálnímu nárůstu fluorescence. (Obr. 4) Tento okamžik (cyklus, kdy k němu dojde) odpovídá počátečnímu množství DNA ve vzorku. Na základě kalibrační křivky vytvořené ze vzorků se známým množstvím DNA lze následně určit množství amplifikované DNA v neznámém vzorku. [10]



Obrázek 4. RT PCR, 1. denaturace DNA, 2. syntéza DNA se značenými nukleotidy, 3. detekce fluorescence, 4. amplifikační křivka (fluorescence roste s počtem syntetizované DNA). (Převzato <https://goldbio.com/articles/article/How-To-RT-qPCR>)

7.1.2 Multiplexní PCR

Tato metoda využívá v jedné reakci více než jeden pár primerů, které se váží k různým úsekům DNA. Reakce tedy probíhá s více primery najednou, vzniká více různých produktů, které jsou následně analyzovány a zhodnoceny. Můžeme tak sledovat přítomnost více markerů specifických pro odlišné organismy nebo slouží ke sledování vnitřních kontrol izolovaných vzorků. Zároveň je tato metoda ekonomicky výhodnější. (Obr. 5) Kombinací qPCR s multiplexní PCR lze spojit jejich výhody a sledovat několik znaků nebo vnitřních kontrol s přesností rychlostí a ekonomickou výhodností qPCR. [10]



Obrázek 5. Multiplexní PCR, detekce tří patogenů ze vzorku třemi sadami primerů a následné vyhodnocení pomocí elektroforézy (převzato https://www.youtube.com/watch?v=Rc1Y_Ej2xZE)

7.2 Imunologické metody

Tyto metody využívají specifické vazby antigen–protilátka, jejich výhodou je vysoká citlivost, specifičnost a reprodukovatelnost. Slouží především k průkazu toxinů, hormonů, proteinů a případně dalších bioaktivních látek. Kromě metody ELISA se dále využívá RIA (Radioimmunoassay) k detekci radionukleotidů a Western Blot (Enzyme-linked Immuno-electrotransfer Blot Technique), která je přesnější než ELISA.

ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) se řadí mezi imunologické metody pro detekci antigenů nebo protilátek ve vzorku. Tuto metodu je možné rozdělit na několik typů, ale všechny jsou založeny na vzájemné interakci antigenu a protilátky, přičemž na protilátku je navázán enzym, který katalyzuje chemickou přeměnu substrátu, což způsobí změnu barvy, která je následně detekována fotometricky. Jednou z velkých výhod této metody je její snadná dostupnost, časová i finanční nenáročnost a schopnost stanovení relativního množství zachyceného antigenu na základě intenzity chemiluminiscence. Dále je velmi specifická a citlivá a dokáže detekovat i velmi malé antigeny. [11, 12]

7.2.1 Přímý test ELISA

V přímém testu ELISA je detekovaným analytem protilátka nebo antigen. Pokud je detekovaným analytem antigen, musí být na začátku analýzy zachycen na povrchu dna jamky ELISA destičky. Detekce antigenu pak probíhá prostřednictvím vazby protilátky značenou enzymem. (Obr. 6) Pokud je naopak detekována protilátka, specifický antigen, se kterým má interagovat, musí být navázán na dno jamky před započítáním analýzy. V tomto případě pak musí být protilátky v analyzovaném vzorku před započítáním analýzy označeny enzymem. Výhodou přímého testu ELISA je snadný průběh a časová nenáročnost naopak nevýhodou je to, že protilátky musí být spojeny s detekčním enzymem před započítáním analýzy. Detekce navázané protilátky pak probíhá prostřednictvím biochemické reakce enzymu navázaného na protilátku se substrátem, který se přidává do analýzy, a tak dochází ke změně barvy reakční směsi.


● Analyt/Antigen
● Enzym
Konjugovaná primární protilátka

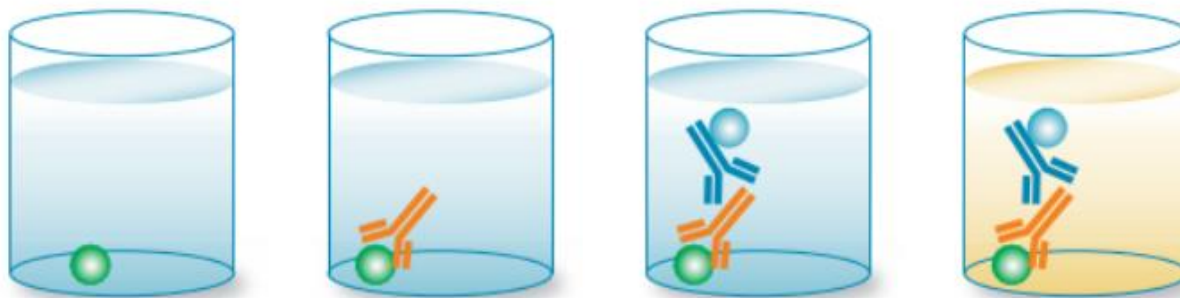


Obrázek 6. Přímá ELISA, do vzorku s antigenem je přidána enzymaticky značená protilátka, a následně substrát, což způsobí změnu barvy. (Převzato <https://www.baria.cz/blog/metoda-elisa-aspekty-jednotlivych-usporadani/>)

7.2.2 Nepřímý test ELISA

Tento test je používán především pro detekci specifických protilátek a skládá se ze dvou fází. Při první dochází k vychytání požadované protilátky prostřednictvím specifického antigenu, ve druhé detekční, dochází k navázání sekundární protilátky značené enzymem na zachycenou protilátku. (Obr. 7) Výhodou nepřímého testování je možnost zesílení signálu, kdy se na primární protilátku může navázat i více protilátek sekundárních. Oproti přímému testování je tento typ delší a náročnější.

● Analyt/Antigen
 ● Enzym
  Konjugovaná sekundární protilátka

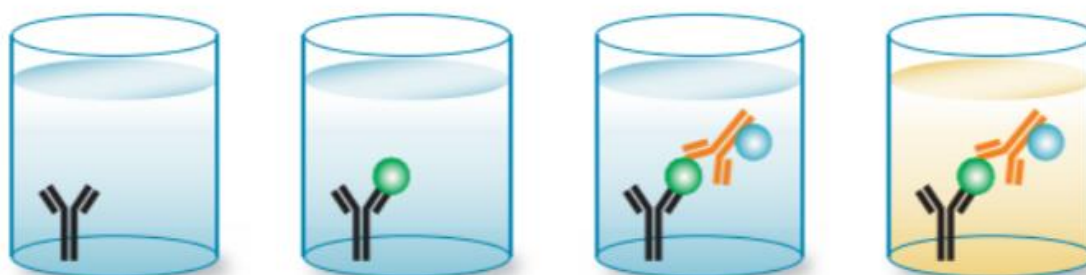


Obrázek 7 Nepřímá ELISA. Antigen je zachycen na povrchu jamky, následuje přidání primární protilátky, a pak enzymaticky značené sekundární protilátky, po přidání substrátu dojde ke změně barvy. (Převzato <https://www.baria.cz/blog/metoda-elisa-aspekty-jednotlivych-usporadani/>)

7.2.3 Sendvičový test ELISA

Tento typ testu můžeme označit také jako sendvičová imunoanalýza a je to nejčastěji používaný typ ELISA metody. Sendvičová se jí říká proto, že antigen je mezi dvěma protilátkami jako plátek masa mezi dvěma houskami v sendviči. Při tomto formátu testování je potřeba dvou protilátek proti různému epitopu antigenu (malá část molekuly antigenu rozpoznávaná imunitními receptory). První protilátka slouží jako záchytná pro snadnější znehybnění antigenu. Druhá protilátka s navázaným enzymem umožňuje detekci antigenu. (Obr. 8) Výhodou sendvičové imunoanalýzy je vysoká citlivost a specifita (dvě protilátky na jeden antigen) a možnost použití přímého i nepřímého testu ELISA. Náročné pro uskutečnění této reakce je nalezení dvou odlišných protilátek pro detekci stejného antigenu.

 Záchytná protilátka
 ● Analyt/Antigen
  Konjugovaná detekční protilátka



Obrázek 8. Přímá sendvičová ELISA. Protilátka je navázána na destičku, na tuto protilátku se váže antigen, na který je navázána enzymaticky značená protilátka, po přidání substrátu dojde ke změně barvy. (Převzato <https://www.baria.cz/blog/metoda-elisa-aspekty-jednotlivych-usporadani/>)

7.3 Chromatografie

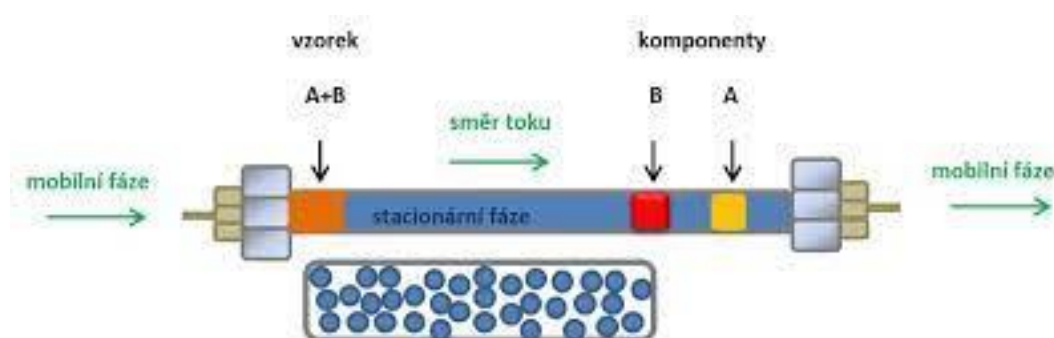
Chromatografie je fyzikálně-chemická metoda, založená na rozdělení složek směsi na dvě fáze, na pohyblivou (mobilní) a nepohyblivou (stacionární) fázi. Fáze se od sebe rozlišují fyzikálně-chemickými vlastnostmi, např. polaritou. Analyty s vyšší adsorbční schopností se pohybují pomaleji

a jsou zadržovány déle než analyty, které se ke stacionární fázi poutají méně. Na základě tohoto principu dochází k rozdělení složek směsi. Objev chromatografie je připisován ruskému biochemikovi Michailovi Semjonoviči Cvětovi, který v roce 1903 jako první dokázal separovat listové pigmenty. Tato metoda je důležitá pro detekci cizorodých látek ve finálních produktech. Za cizorodé látky můžeme považovat antibiotika, pesticidy, alergeny nebo herbicidy, k jejichž detekci používáme různé techniky chemických metod, ale nejčastěji právě metody založené na chromatografii. [13, 14]

7.3.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC, High Performance Liquid Chromatography)

Výhodou této metody je vysoká účinnost a opakovatelnost, slouží k rozdělení kapalných nebo rozpustných pevných látek, kdy dochází k jejich separaci pomocí distribuce mezi stacionární a kapalnou mobilní fází. Stacionární fáze je zakotvená v chromatografické koloně.

Mobilní fáze (eluent) se smíchá s rozpouštědlem, směs pak prochází kolonou separačních vzorků, tj. stacionární fází, která je definována jako fáze, při které dochází k separaci vzorků. Větší molekuly procházejí stacionární fází pomaleji, naopak pohyb malých molekul je rychlejší. Měří se retenční čas, což je doba, kterou molekula potřebuje na průchod stacionární fází. Čas je měřen podle předem určených standardů, které nám umožňují identifikovat molekuly ve vzorku. (Obr. 9) Výstupem je grafický záznam závislosti odezvy detekce na retenčním čase, tj. chromatogram, na němž se hodnotí plocha nebo výška píku. Kvantitativní analýza se provádí na principu odečtení výsledku z kalibrační křivky. Výhodou této reakce je snadná opakovatelnost a vysoká účinnost. Používá se při detekci stanovení organických kyselin, bílkovin, vitamínů, léčiv a metabolitů. [13]



Obrázek 9. HPLC. Analytická kolona slouží k rozdělení vzorku na jednotlivé složky (analyty). K rozdělení dochází na základě rozdílné distribuce mezi mobilní a stacionární fází. Rozdílné analyty mají rozdílnou schopnost slučovat se se stacionární fází a při postupu vzorku kolonou dojdou do detektoru v různých časech. (Převzato http://test.sciencezoom.cz/apps/frov_2/#/18)

7.3.2 HCLP-MS

V současnosti je nejčastěji HPLC kombinována s hmotnostní spektrometrií (MS), která odděluje molekuly podle hmotnosti a náboje. Chromatograf směs rozdělí na jednotlivé složky a hmotnostní spektrometr pak analyzuje jejich strukturu s vysokou specifitou a citlivostí. Vzorek, který přichází z chromatografu je ionizován (neutrální molekuly jsou přeměněny na ionty) a následně přechází do hmotnostního analyzátoru, kde jsou ionty rozděleny v elektromagnetickém poli podle hmotnosti. Následně směřují k detektoru, který měří intenzitu proudu iontů. Částice jsou oddělovány v poměru m/z , kdy m je efektivní hmotnost ionizované částice a z je relativní intenzita. Tato metoda má velmi

široké spektrum využití, nejen v potravinářství, ale i v chemickém a farmaceutickém průmyslu nebo kriminalistice. [13, 14]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

1. Cíl

Cílem studie bylo prozkoumat možnost výpočtu procentuálního zastoupení dominantních druhů masa (hovězí, vepřové a kuřecí) v masných výrobcích pomocí multiplexní qPCR. Pro tento účel byly vytvořeny směsi izolované DNA obsahující různá zastoupení sledovaných druhů. Dalším krokem byla příprava směsi masa (tepelně ošetřené a neošetřené) a masných výrobků (uzeniny, fermentované výrobky a minimálně zpracované výrobky) z jmenovaných druhů. Všechny vzorky byly analyzovány pomocí validované a ověřené multiplexní qPCR. V rámci ověření praktické využitelnosti analýzy byly připraveny a otestovány i vzorky masných výrobků připravených podle klasických receptur. Pro výpočet procentuálního podílu jednotlivých složek každého vzorku z hodnot dosažených analýzou dat qPCR byly použity rovnice založené na absolutní kvantifikaci podle kalibrační křivky a relativní kvantifikaci odvozené z ΔCt metody. Oba postupy výpočtu byly srovnány mezi sebou a také s očekávanými hodnotami.

2. Materiál a metody

2.1 Původ masa a příprava vzorků

Vzorky kuřecího, vepřového a hovězího masa (svaloviny) byly zakoupeny v místních obchodech. Ze svalovin byly vytvořeny různé směsi všech tří vzorků masa vždy o celkové hmotnosti 10 g, dále byla vytvořena i sada vzorků pouze dvou druhů (kuřecí a vepřové) s vysokým rozlišením ve vysokých a nízkých množstvích obou druhů (Tabulka 1). Všechny vzorky byly řádně promíchány, tak aby byla zajištěna homogenita směsi. Vzorky složené ze dvou druhů masa byly rozděleny na polovinu a jedna část (5 g) byla přenesena do samostatné zkumavky a podrobena tepelnému zpracování při 70 °C po dobu 10 minut. Bylo připraveno také 8 vzorků modelových masných výrobků z jednotlivých druhů masa (minimálně tepelně zpracovaných, fermentovaných nebo tepelně upravených) (Tabulka 2). Dále byly vytvořeny směsi DNA extrahované z jednotlivých vzorků masa (kuřecí, vepřové a hovězí) smíchané ve stejném poměru jako jednotlivé směsi masa (Tabulka 1).

Číslo vzorku	Vepřové (%)	Kuřecí (%)	Hovězí (%)
1	100	0	0
2	99.9	0.1	0
3	99.5	0.5	0
4	99	1	0
5	95	5	0
6	90	10	0
7	75	25	0
8	50	50	0
9	25	75	0
10	10	90	0
11	5	95	0
12	1	99	0
13	0.5	99.5	0
14	0.1	99.9	0
15	0	100	0
16	0	0	100
17	33	33	33
18	80	10	10
19	10	80	10
20	10	10	80

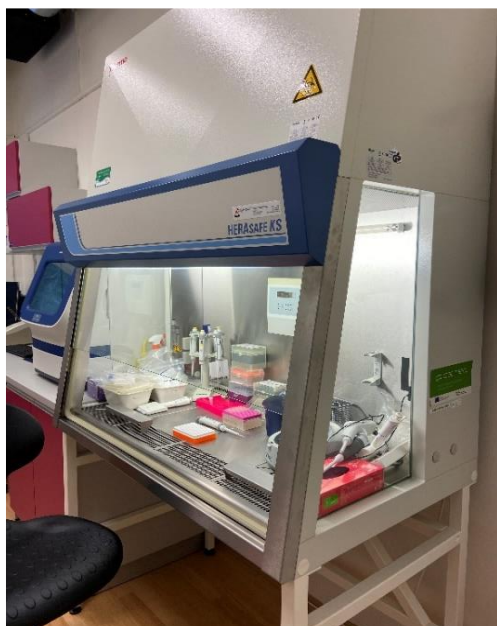
Tabulka 1. Procentuální podíl vepřového, kuřecího a hovězího masa ve vzorcích směsi DNA a ve směsi masa

Druh vzorku	vepřové	sádlo	kuřecí	hovězí	led
Čajový párek 20	20	80	0	0	0
Čajový párek 40	40	60	0	0	0
Párek klasik	48	18	0	12	22
Párek červená	24	8	24	22	22
Párek modrá	9.6	8	38.4	22	22
Párek zlatá	38.4	8	9.6	22	22
Ferment 100	40	30	0	30	0
Ferment 80	32	30	8	30	0

Tabulka 2. Procentuální složení masa u masného výrobku použitého ve studii

2.2 Příprava DNA

Izolace DNA ze všech vzorků masa, masných směsí a masných výrobků byla provedena kitem DNeasy mericon Food Kit (Qiagen, Německo) podle manuálu dodaného výrobcem s drobnými úpravami v biologických triplikátech. Vzorky byly zpracovány v samostatné laboratoři ve vyhrazeném boxu pro PCR (Obr. 10), tak aby se zabránilo kontaminaci vzorku během extrakce DNA. Prvním krokem byla lýza směsi. Vzorek 1g masa nebo masové směsi (masného výrobku) byl smíchán s 10 ml Food Lysis Buffer a 25 μ l roztoku Proteinázy K, dále byl inkubován přes noc za stálého třepání při 60 °C. Po centrifugaci při 2500 g po dobu 5 minut bylo 700 μ l vzorku smícháno ve zkumavce s 500 μ l chloroformu. Zkumavka byla poté centrifugována při 14000 g po dobu 15 minut, následně bylo 350 μ l vodné fáze přeneseno do zkumavky obsahující 350 μ l PB pufru (Obr. 11). Pak byla směs nanášena na izolační kolonku, promyta a vysušena podle doporučení výrobce, následně byla vyeluována do 150 μ l EB pufru a skladována při -20 °C. Čistota všech vzorků DNA byla kontrolována UV absorpčním spektrofotometrem NanoDrop 2000, Thermo Scientific a zároveň pomocí PCR ultračisté vody (Top-Bio, Česká republika) byla koncentrace upravena na 10 ng/ μ l, což byla koncentrace, která byla použita v následujících experimentech. Vzorky DNA izolované ze vzorků vepřového, kuřecího a hovězího masa byly smíchány ve stejném poměru jako vzorky masa v jednotlivých vzorcích, přičemž koncentrace použitá v experimentech byla totožná s koncentrací DNA izolované z mixů mas, tedy 10 ng/ μ l.



Obrázek 10. PCR box (foto autor)



Obrázek 11. Pipetování jednotlivých složek (foto autor)

2.3 qPCR analýza

Všechny vzorky byly analyzovány pomocí quadruplex qPCR pro současnou detekci vepřové (HEX), kuřecí (ATTO425) a hovězí (FAM) DNA, zároveň byla do vyšetření zahrnuta vnitřní amplifikační kontrola (Cy5) založená na plazmidové DNA. Optimalizovaná směs o celkovém objemu 20 μ l byla složena z 10 μ l LightCycler 480 Probes Master (Roche Molecular Diagnostic, Německo), směsi primerů a sond, 0,2 U z Uracil DNA glykosylázy (Merck, Německo) a z 5 μ l DNA. Všechny analýzy byly provedeny na přístroji LightCycler 480 II (Roche Molecular Diagnostic, Německo). (Obr.12, 13) Nejprve došlo k zahřátí vzorku na 95 °C po dobu 7 minut, aby byla aktivována DNA polymeráza, pak následovalo 47 cyklů tvořených zahřátím na teplotu 95 °C po dobu 5 s a ochlazením na 60 °C po dobu 30 s. Kromě qPCR negativní kontroly byly v každém kole cyklu vyšetřovány vzorky DNA jednotlivých druhů masa v koncentraci 10, 1, 0,1 a 0,01 ng/ μ l. Naměřené hodnoty byly použity ke stanovení standardu množství DNA v analyzovaných vzorcích a jako pozitivní kontrola qPCR ve

stejném čase. Všechny qPCR analýzy byly duplikovány (dva nezávislé qPCR testy z každé izolované DNA).



Obrázek 12. LightCycler 480 II (Roche Molecular Diagnostic, Německo) (foto autor)



Obrázek 13 vložení destičky se vzorky do thermocyklu (foto autor)

2.4 Výpočet procentuálního podílu při použití qPCR

Procentuální podíl každé složky ve smíchaných vzorcích masa nebo masných výrobků byl stanoven dvěma základními matematickými kroky. První byl založený na množství DNA, druhý využíval metodu ΔC_t [16]. Při použití dat získaných qPCR byla absolutní hodnota odečtena z kalibrační křivky nebo pomocí hodnoty C_q příslušné složky dělené nebo odečtené od průměrné hodnoty referenčního vzorku se 100% podílem DNA příslušné složky. Matematický výpočet je vyjádřen pomocí dvou vzorců:

$$\frac{\text{absolutní množství DNA dané složky v neznámém vzorku}}{\text{průměr absolutních hodnot DNA ve vzorku se 100% DNA dané složky}} \times 100 \quad (\text{a})$$

$$2^{(\text{průměr } C_q \text{ ve vzorku se 100 \% DNA} - \text{absolutní množství DNA v neznámém vzorku})} \times 100 \quad (\text{b})$$

Na příkladu interpretace dat qPCR se vždy provádělo šest opakování referenčního vzorku se 100 % kuřecí DNA (biologické triplikáty analyzované na technických duplikátech). Absolutní hodnoty odvozené z kalibrační křivky byly 10,58, 11,55, 10,44, 10,09, 11,63 a 11,02 ng/ μ l se střední hodnotou

10,88 ng/μl. Množství DNA v neznámém vzorku bylo stanoveno na 1,63 ng/μl. Konečný procentuální podíl kuřecí DNA v neznámém vzorku podle rovnice (a) byl $1,63/10,88 \times 100 = 14,98 \%$. Podobně byly zpracovány surové hodnoty C_q pro stejné vzorky: 23,66, 23,53, 23,68, 23,73, 23,52, 23,60 s průměrem 23,62 a hodnota pro neznámý vzorek byla 26,43. Podle rovnice (b) byl výpočet procentuálního podílu kuřecí DNA v neznámém vzorku $2^{(23,62-26,43)} \times 100 = 14,26 \%$. Popsané postupy byly aplikovány na všechny neznámé vzorky směsného masa a masných výrobků s příslušnou referencí. Následně byly vypočteny střední a standardní odchylky.

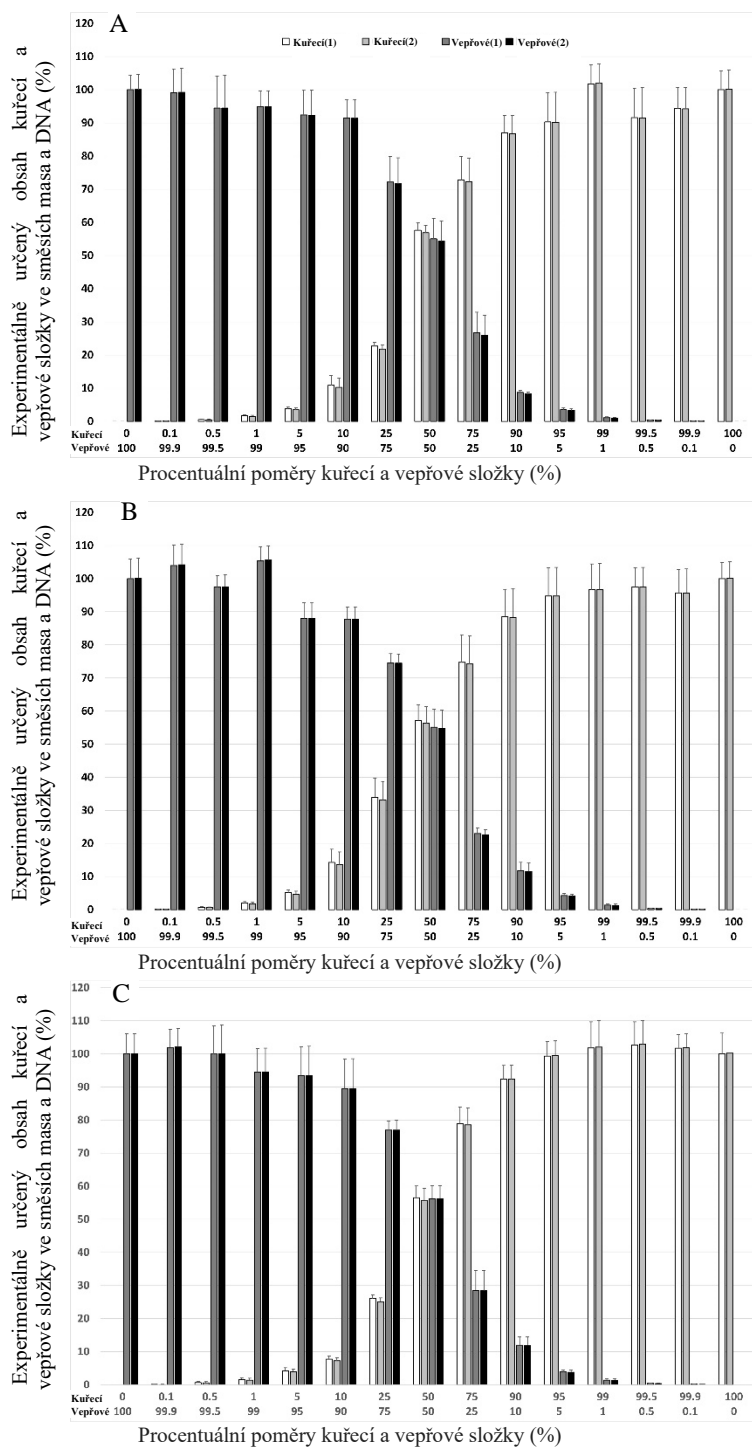
2.5 Statistická analýza

Všechny statistické analýzy byly provedeny pomocí softwaru Statistica 13.0 (StatSoft, Spojené státy). Všechny výsledky byly podrobeny statistické analýze pomocí two-way ANOVA in repeated measures s korekcí P hodnoty podle Geisser-Greenhouse, byla testována statistická významnost rozdílů mezi výsledky procentuálních výpočtů získaných pomocí rovnic (a) a (b) na souborech dat qPCR u tepelně neošetřených a tepelně opracovaných dvou a tří druhových směsí mas a směsí DNA kuřecího a vepřového masa a masných výrobků. Vzájemný vztah mezi očekávanými a experimentálními hodnotami z qPCR byl proveden výpočtem střední kvadratické odchylky (RMSD) odchylek experimentálních dat od teoretických hodnot. Komplementarita (tj. součet procentuálních podílů všech složek v každé směsi DNA a masa nebo v masném výrobku se rovná 100 %) byla vyhodnocena RMSD testem na střední hodnotu relativní odchylky (odečtení sečtených hodnot od 100 %).

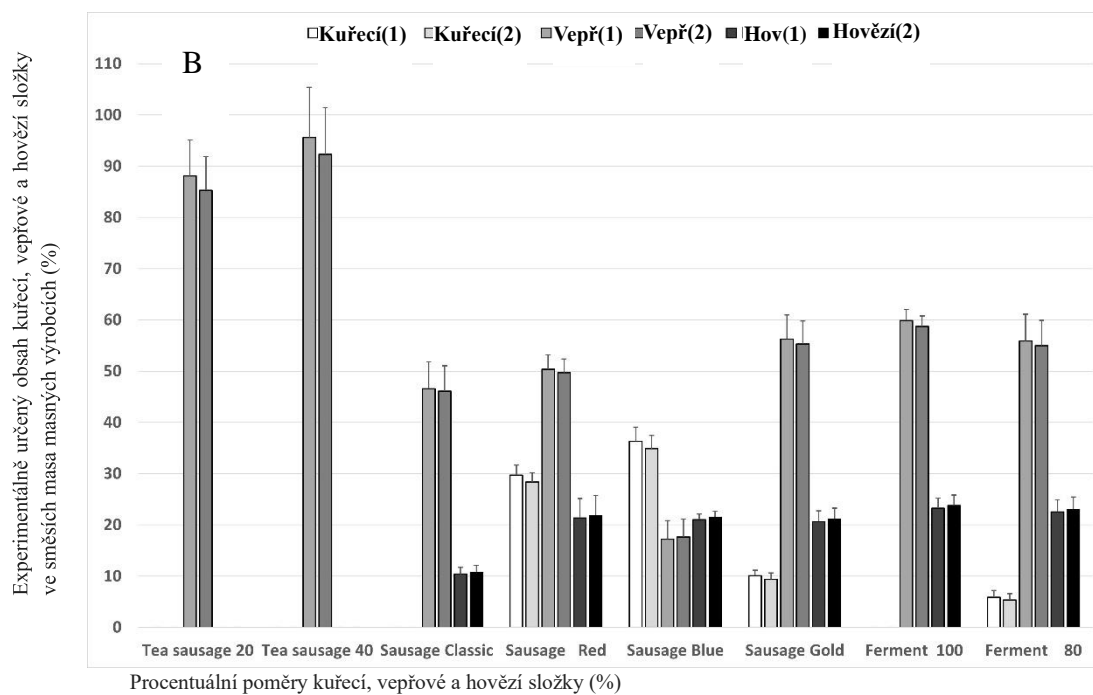
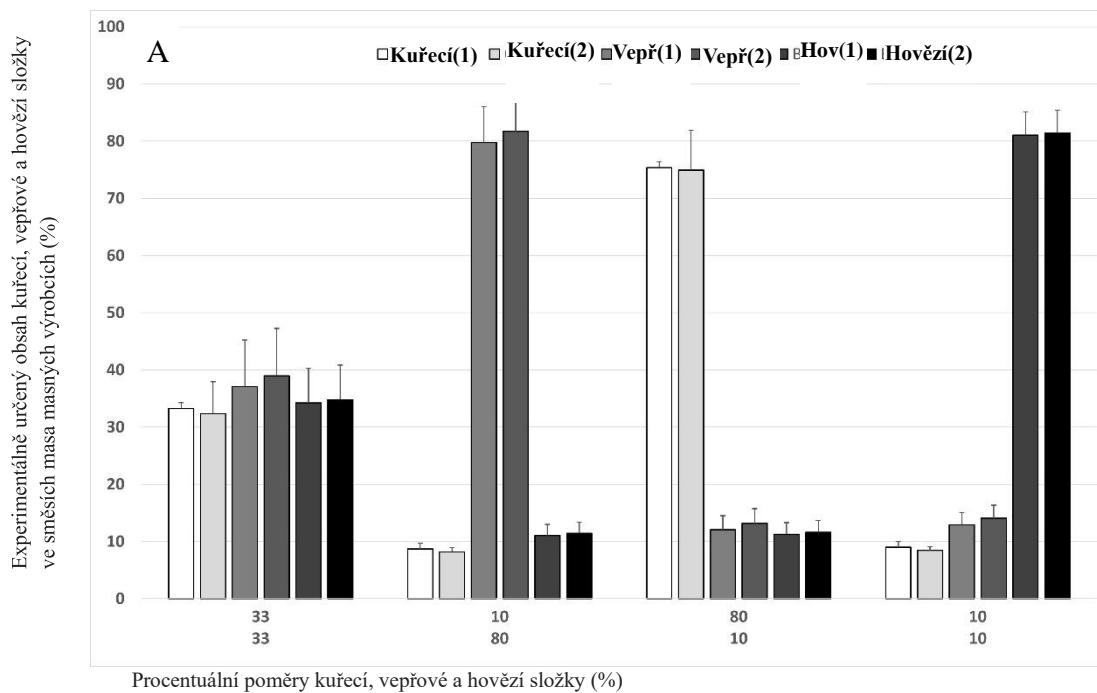
3. Výsledky

3.1 Vliv metody výpočtu na interpretaci dat qPCR

Statistické porovnání výpočtů výsledků qPCR získaných analýzou dvou a tří druhových směsí mas a směsí DNA kuřecího a vepřového masa a masných výrobků vypočtených podle rovnic (a) a (b) neprokázalo žádný významný rozdíl. Výsledky ukázaly, že zařazení kvantifikačního standardu nebylo pro následné vyhodnocení nezbytné, což zjednodušilo celý proces analýzy vzorků. Pro rutinní analýzy je tedy možné použít výpočet podle rovnice (b) protože v tomto případě není nutné použít kvantifikační standard. (Obr. 14 a 15)



Obrázek 14. Procentuální zastoupení jednotlivých druhů ve dvousložkových směsích tepelně neopracovaného (A), tepelně opracovaného (B) masa a směsí DNA (C) určené pomocí qPCR. Chybové úsečky představují směrodatné odchylky. qPCR (1) a qPCR (2) určují procentuální podíl složky vypočtený podle rovnice (a), respektive (b)



Obrázek 15. Procentuální zastoupení jednotlivých druhů ve tříložkových směsích (A) a masných výrobcích (B) určené pomocí qPCR. Chybové úsečky představují směrodatné odchylky. qPCR (1) a qPCR (2) znamenají výpočet procentuálního podílu složky podle rovnice (a), respektive (b)

3.2 Analýza směsí vzorků masa, masných výrobků a směsí DNA pomocí qPCR

Při porovnání experimentálních a očekávaných údajů byla vypočtena odchylka od 100 % a porovnána v rámci všech sledovaných kategorií směsí a masných výrobků pomocí RMSD testu. Statistická analýza směsí kuřecího a vepřového masa (tepelně neopracovaného a tepelně opracovaného při 70 °C po dobu 10 min) a směsí izolované DNA neodhalila statisticky významný rozdíl mezi procentuálními poměry jednotlivých směsí získaných experimentálně a očekávanými hodnotami. (Obr. 14 a 15) Dále

bylo zjištěno, že tepelná úprava neměla významný vliv na amplifikaci DNA pomocí qPCR. Přestože byly pro výpočet procentuálního zastoupení jednotlivých druhů ve vzorku použity tři různé naměřené hodnoty (hmotnost DNA v ng a hodnota Cq), konečné výsledky byly shodné.

3.3 Analýza komplementarity získaných dat

Tato analýza byla provedena za účelem zpětného ověření, zda se součet vypočtených procentních podílů získaných pro kuřecí a vepřové maso ve dvou a tříslložkových směsích a v masných výrobcích rovná 100 %. Podobně jako při porovnání experimentálních a očekávaných údajů byl použit RMSD test. Statisticky významný rozdíl v odchylkách mezi qPCR daty vypočtenými pomocí rovnic (a) a (b) nebyl pozorován u žádné ze sledovaných kategorií směsí mas nebo DNA a masných výrobků.

4. Diskuse

Pro účely kvalitativní (ano/ne) PCR analýzy stačí potvrzení nepřítomnosti určité složky (vepřové maso, alergeny). Základním předpokladem této analýzy je citlivost metody. Při kontrolách falšování potravin je však zásadní určit nejen přítomnost, ale i přesné množství (procentuální zastoupení) masa kontrolovaného druhu. V literatuře jsou uváděny různé způsoby měření koncentrace jednotlivých druhů masa od hmotnosti analyzované matrice až po hodnoty Ct nebo genomové kopie. [15, 17, 18, 19] Porovnávání jednotlivých výsledků je vzhledem k různým hodnotám komplikované. Vzhledem k přítomnosti složek, které nemají DNA nebo obsahují velmi málo DNA (led, sádlo) doporučují někteří autoři používat spíše genomové ekvivalenty než hmotnostní obsah masa. [20] Nicméně taková interpretace dat však nedává jasnou odpověď na nejjednodušší otázku: Odpovídá deklarace výrobce o složení konkrétního produktu skutečnosti?

Proto je nyní největší výzvou najít nejvhodnější a nejpresnější metody pro stanovení procentuálního zastoupení na úrovni DNA, které by mohla sloužit jako měřítko pro odhad procentního podílu určité složky ve výrobku. To se však v současné době jeví jako nemožné, zejména kvůli technologii výroby potravin a krmiv, kdy se složky jako sádlo nebo led přidávají do výrobku v hmotnostních procentech a tato skutečnost se na úrovni DNA neprojeví. Obvykle sádlo obsahuje méně DNA než svalovina o stejné hmotnosti a led neobsahuje DNA vůbec. Současné poznatky v oblasti technik DNA používaných v oblasti bezpečnosti potravin a krmiv umožňují pouze omezené možnosti stanovení procentuálního podílu složek výrobku. Proto je nutné přistoupit k určité formě zjednodušení, pokud chceme stanovovat procentuální složení výrobku pomocí technik DNA. Jedním z možných přístupů je zaměřit se pouze na výrobky s vysokým obsahem svaloviny. Naším cílem bylo zjistit, jak přesná může být kvantifikace určitých složek v masných výrobcích, jak by se měly údaje analyzovat a interpretovat a zda by se taková metoda mohla uvažovat o rutinním použití.

Hlavní aspekt analýzy se zaměřil na určení rozdílů ve výpočtech procentuálního zastoupení jednotlivých složek mezi rovnicemi (a) a (b), které byly navrženy pro hodnocení a interpretaci qPCR. Statistické vyhodnocení ukázalo, že mezi oběma rovnicemi není statistický rozdíl, a že je lze používat nezávisle na sobě. Toto zjištění je obzvláště důležité, protože rovnice (b) umožňuje provést výpočet bez nutnosti sestavit kalibrační křivku, což zjednodušuje a urychluje celý proces analýzy qPCR a zabraňuje možným nepřesnostem spojeným s neúplnou homogenizací jednotlivých ředění v rámci

kalibrační křivky. Další výhodou je, že tento přístup činí metodu přístupnější rutinním laboratorním bez speciálních odborných znalostí v oblasti absolutní kvantifikace.

Při použití tohoto přístupu je však nezbytné každý vzorek před analýzou naředit na 10 ng/μl. Koncentrace 10 ng/μl představuje "referenční hodnotu", která je potřebná pro přesné porovnání neznámého vzorku s referenčním vzorkem. Jako referenční byl používán vzorek obsahující 100 % DNA zkoumaných druhů masa (referenční vzorek musí být také naředěn na referenční koncentraci, tj. 10 ng/μl). Referenční vzorek je zařazen do každého vyšetření (destičku) qPCR alespoň ve třech opakování, aby se zabránilo zkreslení výsledků. Při použití této metody lze vynechat kalibrační křivku, což vede ke zjednodušení a zrychlení celého procesu analýzy qPCR, a zároveň se eliminují možné nepřesnosti spojené s neúplnou homogenizací jednotlivých ředění v rámci kalibrační křivky. V recentních studiích je vzhledem k přesnějším výsledkům preferováno použití metody digitální PCR (dPCR) ve srovnání s qPCR [21, 22]. Digitální PCR není ovšem zatím rozšířena do rutinních laboratoří a stále představuje spíše metodu využívanou ve výzkumu než v rutinní diagnostice. Oproti tomu je qPCR dnes dostupná ve většině laboratoří a ty jsou zvyklé s ní rutinně pracovat. Dosažené výsledky tedy potvrzují platnost a správnost použití metody qPCR při kontrolách kvality potravin prováděných běžnými laboratořemi, které obvykle nejsou vybaveny přístroji dPCR.

Analýza komplementarity tedy toho, zda součet procentních podílů jednotlivých druhů dosáhl očekávaných 100 % ukázalo, že se odchylka od teoretické hodnoty 100 % pohybovala kolem 5 %, výjimečně dosahovala 10 %. Přesto však nebyl použitou statistickou metodou zjištěn významný rozdíl. Lze tedy říci, že určení procentuálního zastoupení dvou anebo dokonce tří složek po sečtení poskytne výsledek, který se statisticky neliší od očekávání. Toto tvrzení platí především pro směsi mas a DNA, ale i obecně pro masné výrobky. Přesto však bylo zjištěno, že v masných výrobcích, které obsahují vysoké množství tuku, nebylo možné stanovení přesného procentuálního podílu vepřové složky. Toto zjištění podporuje předchozí výsledky a bude předmětem dalšího studia.

5. Závěr

Stanovení druhů masa v masných výrobcích lze provést pomocí qPCR jednoduše na základě hodnot C_q bez nutnosti sestavení kalibrační křivky. Jediným požadavkem pro každý běh qPCR je zahrnutí referenčního vzorku (100 % DNA, dle doporučení tepelně upravená) zředěného na referenční koncentraci 10 ng/μl alespoň ve třech opakováních. Tento přístup může zjednodušit celý proces kontrol v rutinních laboratořích a jeho použití může pomoci sjednotit současnou nejednotnost ve výpočtu zastoupení jednotlivých druhů masa, prováděného různými přístupy v různých výzkumných skupinách a laboratořích. Jediným omezením navrhované analytické metody je, že ji lze použít pouze u výrobků s vysokým obsahem svaloviny. Bylo prokázáno, že sádlo a další sloučeniny s nízkým obsahem DNA nebo bez DNA mohou rušit stanovení procentního podílu jednotlivých složek. Tento problém bude dále zkoumán.

Literatura

1. Chamurapiho zákoník [online]. dostupné z URL: http://klimes.mysteria.cz/clanky/psychologie/klima_josef_chamurapiho_zakonnik.htm.
2. Winter, Z.: Zlatá doba měst českých. Odeon, Praha 1991.
3. Accum, F.: A Treatise on Adulterations of Food, and Culinary Poisons: Exhibiting the Fraudulent Sophistications of Bread, Beer, Wine, Spiritous Liquors, Tea, Coffee, Cream, Confectionery, Vinegar, Mustard, Pepper, Cheese, Olive Oil, Pickles, and Other Articles Employed in Domestic Economy and Methods of detecting them. AB`M Small, Philadelphia 1820.
4. Hassall, A. H.: Adulterations detected or Plain instructions for the discovery of frauds in food and medicine. Longman, Brown, Green, Longmans, and Roberts, London 1857.
5. Codex Alimentarius Austriacus. Živa 10, 307–308, Praha 1914.
6. Čížková, H.: Falšování masa a výrobků z masa. Dostupné z URL: <https://www.potravinainfo.cz/33/falsovani-masa-a-vyrobku-z-masa-uniqueidmRRWSbk196FNf8-jVUh4EstVtRjpnQxZiE31Jd1RiIZrJfTGJxQrnQ/>.
7. Čížková, H., Ševčík, R., Rajchl, A., Pivoňka, J., Voldřich, M.: Trendy v autenticitě potravin a v přístupech k detekci falšování, Chem. Listy 106, 903–910, Praha 2012.
8. Obrovská, I., Steinhäuserová, I., Nebola, M., Krkoška, L.: Identifikace druhů masa v masných výrobcích, Veterinářství 2003. Dostupné z URL: <http://vetweb.cz/identifikace-druhu-masa-v-masnych-vyrobcich-2/>.
9. Šmarda, J., Doškař, J.: Metody molekulární biologie. Brno: Masarykova univerzita, 2005.
10. Polymerázová řetězová reakce. Wikiskripta [online]. Dostupné z URL: https://www.wikiskripta.eu/w/Polymer%C3%A1zov%C3%A1_%C5%99et%C4%9Bzov%C3%A1_reakce.
11. Bartůňková, J., Paulík, M.: Vyšetřovací metody v imunologii. Grada, Praha 2005.
12. ELISA. Wikiskripta [online]. Dostupné z URL: <https://www.wikiskripta.eu/w/ELISA>.
13. Nováková, L., Douša, M.: Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. a II., Praha 2013.
14. Chromatografie. Wikiskripta [online]. <https://www.wikiskripta.eu/w/Chromatografie>.
15. Nesvadbova, M., Kralik, P., Dziedzinska, R., Dufkova, M., Borilova, G.: An integrated system of four multiplex qPCR assays for the precise and sensitive identification of animal species in food and feed. Food Control, 135, Article 108781. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108781>.
16. Michael, W., Pfaffl, M. W.: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, Nucleic Acids Res. 2001 May 1; 29(9): e45.

17. Ali, M. E., Hashim, U., Mustafa, S., Man, Y. B. C., Dhahi, T. S., Kashif, M., Uddin, M. K., Abd Hamid, S. B.: Analysis of pork adulteration in commercial meatballs targeting porcine-specific mitochondrial cytochrome b gene by TaqMan probe real-time polymerase chain reaction. *Meat Science*, *91*(4), 454-459. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.02.031>.
18. Druml, B., Kaltenbrunner, M., Hochegger, R., Cichna-Markl, M.: A novel reference real-time PCR assay for the relative quantification of (game) meat species in raw and heat-processed food. *Food Control*, *70*, 392-400. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.055>.
19. Kaltenbrunner, M., Mayer, W., Kerkhoff, K., Epp, R., Rugeberg, H., Hochegger, R., Cichna-Markl, M.: Applicability of a duplex and four singleplex real-time PCR assays for the qualitative and quantitative determination of wild boar and domestic pig meat in processed food products. *Scientific Reports*, *10*(1), Article 17243. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72655-7>.
20. Ballin, N. Z., Vogensen, F. K., Karlsson, A. H.: Species determination – Can we detect and quantify meat adulteration? *Meat Sci*, *83*(2), 165-174. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.06.003>.
21. Huggett, J. F., Foy, C. A., Benes, V., Emslie, K., Garson, J. A., Haynes, R., Hellemans, J., Kubista, M., Mueller, R. D., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., Wittwer, C. T., Bustin, S. A.: The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clin Chem*, *59*(6), 892-902. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.206375>.
22. Sanders, R., Huggett, J. F., Bushell, C. A., Cowen, S., Scott, D. J., Foy, C. A.: Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification. *Anal Chem*, *83*(17), 6474-6484. <https://doi.org/10.1021/ac103230c>.

Seznam obrázků

Obrázek 1 Denaturace DNA	14
Obrázek 2 Hybridizace.....	15
Obrázek 3 Elongace	15
Obrázek 4 RT PCR.....	16
Obrázek 5 Multiplexní PCR.....	16
Obrázek 6 Přímá ELISA	17
Obrázek 7 Nepřímá ELISA.....	18
Obrázek 8 Přímá sendvičová ELISA	18
Obrázek 9 HPLC.....	19
Obrázek 10 PCR box.....	23
Obrázek 11 Pipetování jednotlivých složek.....	24
Obrázek 12 Thermocycler.....	25
Obrázek 13 Vložení destičky	25
Obrázek 14 Procentuální zastoupení jednotlivých druhů ve dvousložkových směsích.....	27
Obrázek 15 Procentuální zastoupení jednotlivých druhů ve tříložkových směsích	27

Seznam tabulek

Tabulka 1. Procentuální podíl vepřového, kuřecího a hovězího masa ve vzorcích směsi DNA a ve směsi masa	22
Tabulka 2. Procentuální složení masa u masného výrobku použitého ve studii	23

Seznam zkratek

ANOVA – statistická analýza rozptylu

ATTO425 – vepřové maso

ČSR – Československá republika

ddPCR – kapičková polymerázová řetězová reakce

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dPCR – digitální polymerázová řetězová reakce

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

ELISA – enzyme-linked immuno sorbent assay

ES – evropská směrnice

FAM – hovězí maso

HEX – kuřecí maso

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

HPLC – MS – High Performance Liquid Chromatography – hmotnostní spektrometrie

MS – hmotnostní spektrometrie

PCR – polymerázová řetězová reakce

qPCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce

RASFF – Rapid Alert System for Food and Feed

RIA – Radioimmunoassay

RT PCR – real-time polymerázová řetězová reakce

Sb. – sbírka

SRY– sex-determining region Y

SZPI – Státní zemědělská a potravinářská inspekce

Taq – *Thermus aquaticus*

TSPY – testis-specific protein Y