

DNS meghatározásán alapuló technikák az élelmiszer-minőségellenőrzésben

Szalai Gábor, Tóth Ágnes, Lásztity Radomir és Salgó András*

Budapesti Műszaki Egyetem, Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék, Budapest

Érkezett: 1997. január 17.

Az élelmiszerek minősítése mind alapkutatás, mind ipari szempontból jelentős terület. A mindinkább szigorodó követelmények az élelmiszerek minőségével kapcsolatban megkívánják egyes komponensek egyre kisebb mennyiségének detektálását. Az elmúlt évtizedben a molekuláris genetika alkalmazása számos területen merőben új távlatokat nyitott, ezek közül is kiemelkedő a DNS hibridizáció (Southern-féle blottolás) és a polimeráz láncreakció (PCR) alkalmazhatóságának igen széles lehetősége (Rolfs et al., 1993). Az élelmiszerek minőségi vizsgálatában és minőségbiztosításában is egyre fontosabb szerephez jutnak e módszerek. Tágabb értelemben ide tartoznak a növény-nemesítési és az állattenyésztési programokban használatos DNS technikák is, melyek során bizonyos genotípusra szelektálnak (Szalai et al., 1992). Erre példa a sertések esetén tapasztalható PSE (pale, soft and exudative) húsminőséget okozó allél kiszűrése a populációból. (Otsu et al., 1991). Az élelmiszerek eredetének vizsgálatában is a DNS alapú technikák egyre inkább felváltják a nehézkes immunológiai tesztek, illetve új lehetőségeket nyitnak (Meyer et al., 1995). Ma már néhány csepp borból is meghatározható és azonosítható a felhasznált élesztőpopuláció (Querol et al., 1996). A fentiek mellett az élelmiszerek mikrobiológiai állapotának DNS meghatározással történő vizsgálata jelenti a legjelentősebb változást. Az elemzések nagy specifitása és érzékenysége valamint rövid időigénye (4-8 óra) teszi lehetővé a mikrobiológiai szennyezések eredetének gyors visszakeresését, azonosítását. Fermentált élelmiszerek esetén pedig információt kaphatunk a starterkultúrák tisztaságáról, jelenlétéről.

* 1996-1997 évben Magyar Zoltán ösztöndíjas

A Southern-féle hibridizáció (Southern, 1975) eredményeképpen a vizsgált DNS-re jellemző sávrendszert kapunk. Ehhez először a mintában található DNS-t restriktációs enzimmel hasítják, majd az így kapott különböző méretű DNS darabokat gélelektroforézissel elválasztják. A gélből a DNS-t egy membránra átszívják, így a membránon az elektroforézis lenyomatát kapják. E művelet során lúg hatására a DNS denaturálódik, így az képes hibridizálni egy jelölt DNS próbával, mely a membránon egy sávrendszert hoz létre. Az eljárás specifitását a kiválasztott DNS próba szekvenciája és a hibridizáció körülménye ("stringency") határozza meg. Magasabbrendű élőlények esetén a fenti folyamat igen hosszú és időigényes. Mikroba esetén azonban a DNS kinyerése egy egyszerű lízissel is megoldható, a folyamat automatizálható és kevésbé időigényes (8 óra). A digitális elektroforetikus képek tárolhatóak és egy újabb minta elemzésekor összehasonlításához visszakereshetőek. (Qualicon, RiboPrinter System).

A polimeráz láncreakció egy olyan **in vitro** DNS szaporítási módszer, ahol az általunk kiválasztott két oligonukleotid szekvenciája határozza meg az eljárás specifitását, azaz hogy milyen DNS darabot sokszorosítunk (Saiki et al., 1985). RNS-ek detektálására is mód van abban az esetben, ha az RNS-ről reverz transzkriptáz segítségével készítünk DNS templátot a PCR-hez. Mivel tulajdonképpen exponenciális jelerősítést végzünk, a PCR érzékenysége igen nagy. A PCR ma már teljesen automatizált folyamat, általában 2-4 óra szükséges elvégzéséhez. A reakció végezetével gélelektroforézissel azonosíthatjuk a megfelelő hosszúságú DNS darabokat (kb. 3 óra). A legmodernebb készülékek (Perkin Elmer, PCR 7700) azt is lehetővé teszik, hogy a sokszorosított DNS mennyiségét a reakció során is nyomon követhessük, így az elektroforézis szükségtelenné válik. Egy-egy analízis nem igényel hosszas mintaelőkészítést, pl. tejből vagy borból direkt is elvégezhető a PCR ("drop-in PCR"). Amennyiben a sokszorosított DNS darabon belül található nukleotid-sorrend különbség az allélek között, a PCR utáni restriktációs enzimmel történő vágás ("restriction fragment length polymorphism", RFLP) általában megoldást jelenthet ezek megkülönböztetésére ("PCR-RFLP").

Mint a fentiekből kitűnik, ezek az eljárások csak akkor alkalmazhatóak, ha a detektálni kívánt DNS egy jellemző szakaszának végein elhelyezkedő 18-25 nukleotid sorrendje ismert. Egy újabb PCR technika esetén még erre sincs szükség, mert olyan rövid oligonukleotidokat használnak, amelyek a DNS több helyére is kapcsolódnak, így a PCR és elektroforézis után több sávot is kapunk, ez az ún. RAPD ("randomly amplified polymorphic DNA") eljárás (Williams et al., 1990). Az egy-egy mintában található sávok eloszlása jellemző a mintában található DNS-re, így standarddal való összehasonlítás után a DNS eredete azonosítható.

DNS alapján akkor azonosítható valamely élelmiszer-komponens, ha a vizsgált DNS szakasz egyértelműen utal egy ismert törzsre, növény- vagy állatfajra. Az élőlények DNS-ei fejlettségüktől függően tartalmazznak olyan szakaszokat amely jellemző lehet egy törzsre, nemzetségre, családra, fajra vagy akár magára az egyedre is. Ezeket polimorf DNS részeknek nevezik. Növények és állatok esetén a legnagyobb polimorfizmust rövid nukleotid-mintázatok egymás utáni ismétlődésének számában (mikroszatellit DNS) találták. (Rafalski és Tingey, 1993; Haberfeld et al., 1991). Borélesztők esetén a mitokondriális DNS (mtDNS) változatosságát használták azonosításra a DNS restrikciós enzimmel történő hasításával és elektroforézissel (Querol et al., 1996). Bor és sör készítésénél használt **Saccharomyces cerevisiae** törzsek RAPD eljárással is megkülönböztethetőek (Couto et al., 1996). DNS hibridizációval fonalas gombák törzseit azonosították (CT)₈, (GTG)₅, (GACA)₄ oligonukleotid próbák segítségével (Meyer et al., 1991). Mikrobák esetén a 16S rRNS génjében találtak nagy változatosságot, mely PCR után történő denaturáló gradiens gélelektroforézissel detektálható (Muyzer et al., 1993). Tejipari termékekben a flagellin génekre, **flaA** és **flaB**-re specifikus oligonukleotidokkal azonosítottak **Campylobacter jejuni** és **Campylobacter coli** törzseket (Wegmüller et al., 1993).

A DNS analízis egyik előnye a hagyományos immunológiai és tenyésztéses vizsgálatokkal szemben, hogy a DNS viszonylag stabil molekula. Ez tette lehetővé, hogy főtt kolbászból is sikerült **Listeria monocytogenes** szennyeződést kimutatni az alfa és béta haemolysin génre specifikus PCR oligonukleotidokkal (Furrer et al.,

1991). Az élelmiszerek igen komplex mátrixot alkotnak, melynek olyan eleme is lehet, amely gátolja a PCR-ben a DNS polimeráz működését. **Listeria monocytogenes** PCR-rel történő detektálása során ezt a problémát a DNS alkoholos kicsapásával (Makino et al., 1995), illetve a PCR-t megelőző immunomágneses elválasztással (Fluitt et al., 1993) oldották meg.

A PCR eljárás érzékenységét jól tükrözi a botulinum neurotoxin (BoNT) génjének 10 baktérium/g élelmiszer lehetséges kimutatási határa (Fach et al., 1995). E közlemény az eljárás specifitását is jól bemutatja, hiszen a BoNT A, B, E, F és G géneket a szerzők egy PCR segítségével egymás mellett is ki tudták mutatni mesterségesen fertőzött élelmiszerekből. Az élelmiszeranalitika egyik igen fontos, azonban nehézkes feladata volt a **Salmonella** törzsek kimutatása hagyományos tenyésztéses eljárással. Multiplex PCR segítségével, ahol egy reakcióban több oligonukleotidot is használnak, sikerült specifikus PCR eljárást kidolgozni **Salmonella** törzsek kimutatására, egyéb coliform baktériumok mellett olyan komplex mintákból is, mint például a felszíni vizek és talajminták (Way et al., 1993). Ma már **Salmonella** detektálására szolgáló PCR rendszerek a kereskedelmi forgalomban kaphatóak (Perkin Elmer, Qualicon). Southern-féle hibridizációval **Escherichia coli** rRNS génrészei megfelelő próbának bizonyultak egyes mikrobák rRNS géneinek detektálására (Bruce et al., 1995), és az így nyert sávok képe jellemző egy-egy mikroba törzsre (pl. *Listeria monocytogenes*).

Az élelmiszerek eredetének vizsgálata alapvető igény napjainkban. Húskészítmények vizsgálatkor a **citokróm b** gén fajokra jellemző szekvenciáját azonosították PCR-RFLP segítségével (Meyer et al., 1995). Ma már a növények néhány tulajdonságát a termesztők géntechnológiai módszerekkel változtatják. Burgonya esetén sikeresen azonosították a genetikailag módosított növényeket DNS-ük alapján (Schreiber et al., 1995).

A fentiek alapján látható, hogy az elmúlt néhány évben a DNS alapú vizsgálatok az élelmiszerek minőségének elemzésében is egyre nagyobb szerepet kapnak. Ez a kezdeti lendület csak fokozódni fog az egyre szigorodó élelmiszerbiztonsági törvények

nyomására. Mivel azonban igen kevés ismeretünk van az élelmiszerekben előforduló DNS-ekről, a DNS alapú azonosítás mellett a hagyományos vizsgálatokat is el kell végezni mindaddig, amíg a két eljárás között a kívánatos korrelációt el nem érjük. Azaz, ha egy vizsgálat megfelelő kontrollok mellett nem detektálja a vizsgált DNS részt, biztosak lehetünk a negatív eredményben, míg pozitív eredmény esetén célszerű a hagyományos vizsgálatokat is elvégezni.

A ma már rendelkezésre álló lehetséges DNS-alapú eljárások közül egy-egy laboratórium még szabadon választhat, az eljárások még nem szabványosítottak és nemzetközileg még nem elfogadottak. Ezt a folyamatot a készülékeket és reagenseket gyártó cégek a széles piac reményében igyekeznek meggyorsítani. Így pl. a Perkin Elmer cég **Salmonella** vizsgálati rendszere Európában már többé-kevésbé elfogadott. A fentiekben említett DNS technikákat az orvosi diagnosztikában ma már rutinszerűen használják, az egységesítés és szabványosítás ottani tapasztalatai az élelmiszerlaboratóriumokban dolgozó szakemberek segítségére lehetnek.

Irodalom

- Bruce, J.L., Hubner, R.J., Cole, E.M., McDowell, C.I., and Webster, J.A. (1995) Sets of *EcoRI* fragments containing ribosomal RNA sequences are conserved among different starins of *Listeria monocytogenes*. *Proc. Natl. Acad Sci, USA*, **92** (11), 5229-5233.
- Fach, P., Gibert, M., Griffais, R., Guillou, J.P. and Popoff, M.R. (1995) PCR and gene probe identification of Botulinum neurotoxin A-, B-, E-, F-, and G-producing *Clostridium* spp. and evaluation in food samples. *Appl. Env. Microbiol.*, **61**, 389-392.
- Fluitt, A.C., Torensma, R., Visser, M.J.C., Aarsman, C.J.M., Popellier, M.J.J.G., Keller, B.H.I., Klapwijk, P. and Verhoef, J. (1993) Detection of *Listeria monocytogenes* in cheese with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay. *Appl. Env. Microbiol.*, **59**, 1289-1293.
- Furrer, B., Candrian, U., Hoefelein, C. and Luethy, J. (1991) Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by *in vitro* amplification of haemolysin gene fragments. *J. Appl. Bacteriol*, **70**, 372-379.
- Haberfeld, A., Cahaner, A., Yoffe, O., Plotsky, Y. and Hillel, J. (1991) DNA fingerprints in farm animals generated by microsatellite and minisatellite DNA probes. *Anim. Genet.* **22**, 299-305.
- Makino, S.I., Okada, Y. and Maruyama, T. (1995) A new method for direct detection of *Listeria monocytogenes* from foods by PCR. *Appl. Env. Microbiol.*, **61**, 3745-3747.

- Margarida, M., Couto, B., Eijmsa, B., Hofstra, H., Huis in't Veld, J.H.J. and van der Hossen, J.M.B.M. (1996) Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl. Env. Microbiol.*, **62**, 41-46.
- Meyer, R., Höfelein, C., Lüthy, J. and Candrian, U. (1995) Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *J AOAC Int*, **78**, 1542-1551.
- Meyer, W., Koch, A., Niemann, C., Beyermann, B., Epplen, J.T. and Börner, T. (1991) Differentiation of species and strains among filamentous fungi by DNA fingerprinting. *Curr. Genet.*, **19**, 239-242.
- Muyzer, G., De Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Env. Microbiol.*, **59**, 695-700.
- Otsu, K., Khanna, V.K., Archibald, A.K., and MacLennan, D.H. (1991) Co-segregation of porcine malignant hyperthermia and a probable causal mutation in the skeletal muscle ryanodine receptor gene in backcross families. *Genomics*, **11**, 744-750.
- Querol, A. and Ramón, D. (1996) The application of molecular techniques in wine microbiology. *Trends Food Sci Techn.*, **7**, 73-78.
- Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. (1993) Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genet.*, **9**, 275-280.
- Rolfs, A., Schuller, I., Finckh, U. and Weber-Rolfs, I. *PCR: Clinical diagnostics and research*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1992.
- Saiki, R.K., Scharf, S.J., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.
- Schreiber, G.A., Engel, K.H., Schulzki, G. and Bögl, K.W. (1995) Detection of food modified by the use of genetic engineering. *Proceedings of Euro Food Chem VIII, Vienna, Austria, September 18-20*.
- Southern E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, **98**: 503-17
- Szalai, G., Bailey, E., Gerber, H. and Lazary, S. (1993) DNA sequence analysis of serologically detected ELA class II haplotypes at the equine DQb locus. *Anim Genet*. **24**, 187-190
- Way, J.S., Josephson, K.L., Pillai, S.D., Abbaszadegan, M., Gerba, C.P. and Pepper, I.L. (1993) Specific Detection of *Salmonella spp.* by multiplex polymerase chain reaction. *Appl. Env. Microbiol.*, **59**, 1473-1479.
- Wegmüller, B., Lüthy, J. and Candrian, U. (1993) Direct polymerase chain reaction detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw milk and dairy products. *Appl. Env. Microbiol.*, **59**, 2161-2165.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 6531-6535.

DNS meghatározásán alapuló technikák az élelmiszer minőségellenőrzésben

Szalai G., Tóth Á., Lásztity R. és Salgó A.

A DNS meghatározáson alapuló vizsgálati módszerek élelmiszer minőségellenőrzésben történő alkalmazási lehetőségeit mutatják be a szerzők állati és növényi eredetű nyersanyagokon és élelmiszeripari szempontból jelentős mikroorganizmusok azonosításában, továbbá eredetvizsgálatoknál.

Techniques Based on DNA Determination in Food Quality Control

Szalay, G., Tóth, Á., Lásztity, R. and Salgó, A.

Applicability of methods based on DNA determination in food quality control is presented. Examples shown are the investigation of raw materials of plant or animal origin, the identification of micro-organisms significant in food industry as well as study of origin.

Untersuchungstechniken auf der Basis der DNS-Bestimmung in der Lebensmittelqualitätskontrolle

Szalay, G., Tóth, Á., Lásztity, R. und Salgó A.

Verfasser stellen die Anwendungsmöglichkeiten der auf der Basis der DNS-Bestimmung entwickelten Untersuchungsmethoden in der Lebensmittelqualitätskontrolle vor. Diese Methoden werden an den tierischen und pflanzlichen Rohstoffen sowie bei der Identifizierung von für die Lebensmittelindustrie wichtigen Mikroorganismen und weiterhin bei den Ursprungsuntersuchungen eingesetzt.