

# DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Fajspecifikus húszonosítás  
polimeráz láncreakción alapuló technikákkal

*Jánosi Anna*

Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet  
Budapest  
2006

**A doktori iskola**

**megnevezése:** Élelmiszertudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Élelmiszertudományok

**vezetője:** Dr. Fekete András  
egyetemi tanár, DSc  
BCE, Élelmiszertudományi Kar,  
Fizika-Automatika Tanszék

**Témavezető:** Dr. Hajós Gyöngyi  
osztályvezető, egyetemi magántanár, DSc  
Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet  
Élelmiszerbiztonsági főosztály, Táplálkozástudományi Osztály

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.



Dr. Fekete András  
iskolavezető



Dr. Hajós Gyöngyi  
témavezető

**A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanács 2006. február 21-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:**

**BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:**

**Elnöke: Farkas József, MHAS Budapesti Corvinus Egyetem**

**Tagjai:**

**Pótelnöke: Deák Tibor, DSc,  
Budapesti Corvinus Egyetem**

**Horváth Erika, PhD,  
Campden & Chorleywood Élelmiszeripari Fejlesztő Intézet**

**Szarka András, PhD,  
Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem**

**Titkár: Pomázi Andrea, CSc,  
Budapesti Corvinus Egyetem**

**Póttagjai: Hoschke Ágoston, CSc,  
Budapesti Corvinus Egyetem**

**Korány Kornél, CSc,  
Budapesti Corvinus Egyetem**

**Opponensek: Maráz Anna, CSc  
Budapesti Corvinus Egyetem**

**Kiss Erzsébet, CSc,  
Szent István Egyetem**

**Pótopponens: Vadáné Kovács Mária, PhD,  
Országos Húsipari Kutatóintézet Kht**

# TARTALOMJEGYZÉK

|                                                                                         | Oldalszám |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. BEVEZETÉS.....                                                                       | 1         |
| 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....                                                            | 3         |
| 2.1. A húsok fajspecifikus azonosításának biokémiai háttere.....                        | 3         |
| 2.1.1. Az izomszövet fehérje-összetétele, jellemzése.....                               | 3         |
| 2.1.2. A fajspecifikus meghatározásokban szerepet játszó DNS szakaszok.....             | 5         |
| 2.2. Faj-specifikus kimutatási módszerek.....                                           | 6         |
| 2.2.1 Fehérje meghatározáson alapuló technikák.....                                     | 6         |
| 2.2.1.1. SDS poliakrilamid gélelektroforézis .....                                      | 6         |
| 2.2.1.2. Izoelektromos fókuszálás.....                                                  | 6         |
| 2.2.1.3. Immunológiai módszerek.....                                                    | 8         |
| 2.2.2. A dezoxiribonukleinsav kimutatásán alapuló módszerek.....                        | 10        |
| 2.2.2.1 Southern féle lenyomat (blotting) .....                                         | 11        |
| 2.2.2.2. Polimeráz láncreakción alapuló technikák (PCR).....                            | 12        |
| 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....                                                           | 26        |
| 3.1. Minták.....                                                                        | 26        |
| 3.1.1. Egy és többkomponensű modell minták előállítása.....                             | 26        |
| 3.1.1.1. Nyers hús-hús keverékek előállítása.....                                       | 26        |
| 3.1.1.2. Hőkezelt, vörösáru típusú modellek<br>(hús, sertésszalonna, szójafehérje)..... | 27        |
| 3.1.1.3. Sterilezett, konzerv modellek (hús, szójafehérje) előállítása.....             | 27        |
| 3.2. Polimeráz láncreakción alapuló technika (PCR).....                                 | 27        |
| 3.2.1. DNS izolálási módszerek.....                                                     | 28        |
| 3.2.2. A tisztított DNS oldat jellemzése.....                                           | 30        |
| 3.2.3. DNS sokszorozás .....                                                            | 30        |
| 3.2.4. Termékanalízis.....                                                              | 33        |
| 4. KUTATÁSI EREDMÉNYEK .....                                                            | 34        |
| 4.1. Marha, sertés és csirke-eredetű komponensek kimutatása modellekben.....            | 34        |
| 4.1.1. Friss, hőkezelt és sterilezett modellkeverékek DNS izolálási<br>eredményei.....  | 34        |
| 4.1.2. Primer-specifititás vizsgálatok.....                                             | 41        |

|                                                                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.1.3. A láncreakció érzékenységeinek kimutatása tisztított DNS oldat sorozattal.....                                                   | 44  |
| 4.1.4. Modellkeverékek vizsgálata.....                                                                                                  | 46  |
| 4.2. Élelmiszervizsgálatok.....                                                                                                         | 51  |
| 4.2.1. Hústermék csoportok DNS extrahálási eredményei.....                                                                              | 51  |
| 4.2.2. Sertés-eredetű komponensek kimutatása.....                                                                                       | 54  |
| 4.2.3. Marha-eredetű komponensek kimutatása.....                                                                                        | 57  |
| 4.2.4. Baromfi-eredetű komponensek kimutatása.....                                                                                      | 60  |
| 4.3. Vadhúsok egymás melletti meghatározása.....                                                                                        | 66  |
| 4.3.1. DNS kinyerés és tisztítás vadhúsokból.....                                                                                       | 66  |
| 4.3.2. Polimeráz láncreakción (PCR) és a láncreakciót követő enzimes hasítási vizsgálatok (PCR RFLP) vadhús mintákból .....             | 66  |
| 4.4. Új eredmények.....                                                                                                                 | 76  |
| 5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....                                                                                                   | 77  |
| 6. ÖSSZEFOGLALÁS.....                                                                                                                   | 78  |
| 7. SUMMARY.....                                                                                                                         | 83  |
| 8. MELLÉKLETEK.....                                                                                                                     | 87  |
| M1 Irodalomjegyzék.....                                                                                                                 | 87  |
| M2 Hústermék összetétellel és jelöléssel, valamint ezzel összefüggésben a fogyasztóvédelemmel kapcsolatos szabályozási információk..... | 94  |
| KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....                                                                                                                | 101 |

**Rövidítések jegyzéke:**

|            |                                                                                     |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| bp         | Bázispár, base pair                                                                 |
| BSA        | marha szérum albumin; bovine serum albumin                                          |
| CTAB       | hexadecil-trimetil-ammónium-bromid                                                  |
| DNS        | dezoxiribonukleinsav                                                                |
| EDTA       | etilén-diamin-tetra-ecetsav                                                         |
| ELISA      | enzimmel jelölt immunológiai módszer;<br>enzyme linked immunosorbent assay          |
| EU         | Európai Unió, European Union                                                        |
| PAGE       | poliakrilamid-gélelektroforézis;<br>polyacrialmide gel electrophoresis              |
| PCR        | polimeráz láncreakció; polimerase chain reaction                                    |
| Q-PCR      | valós idejű PCR,<br>real-time PCR                                                   |
| RAPD       | random amplifikált polimorf DNS;<br>random amplified polimorphic DNA                |
| RFLP       | restrikciós fragmenthossz polimorfizmus;<br>restriction fragment length polimorfism |
| SDS        | nátrium-lauril-szulfát                                                              |
| TEMED      | N,N,N'N' tetrametilén-diamin                                                        |
| TBE puffer | TRIS-bórsav- EDTA puffer                                                            |

# 1. BEVEZETÉS

A húsok és hústermékek faj-specifikus azonosítása napjainkban egyre fontosabbá váló feladat, mivel az élelmiszeriparban is meghatározóvá válik a fogyasztóvédelem és a minőségbiztosítás. Emellett a téma széles körben érdeklődésre tarthat számot, beleértve az állatvédelmi és a bűnügyi vonatkozásokat is.

Ezért a faj-specifikus eredet azonosításnak a következő, szélesebb tématerületeken van jelentősége:

- termékhamisítás bizonyításában, pl. minőségi húsok helyettesítése esetén olcsó húsokkal;
- egészségvédelemben, pl. húsok faj-specifikus azonosításánál a patogén kórokozók kizárása céljából (sertéshús kizárása nyers darált marhahúsokból; vadhúsból készült termékek azonosítása az eltérő mikrobiológiai és parazitológiai állapot miatt); speciális táplálkozási célú élelmiszereket előállító üzemeknél az allergén mentesség feltüntetése céljából;
- export - import termékek ellenőrzésénél, minőségbiztosítás céljából;
- vallási fogyasztási tabuknál információ céljából, pl. mohamedánok tiltott sertéshús fogyasztása;
- állatvédelemmel kapcsolatos bűnügyek felderítésénél, pl. nagy értékű haszonállat és vadállomány eltulajdonításának bizonyításánál faji és egyedi szinten.

Ismert szekvenciájú DNS-szakaszok felsokszorozása polimeráz láncreakcióval napjainkban rutin feladatnak számít. Élelmiszervizsgálatok esetén azonban kevésbé tanulmányozott folyamat a különböző termékcsoportokat jellemző komplex mátrix hatás vizsgálata a DNS kinyerésre, ezáltal a polimeráz láncreakció érzékenységeinek változására.

A különböző földrajzi térségből származó populációk esetleges genetikai eltérései miatt, érdeklődésre tarthat számot a hazai vad fajok húsmintáinak egymás melletti, faj-specifikus azonosítása és a haszonállatok mintáitól való elkülönítése. A vadhús faj-specifikus kimutatásán túl is, összetett feladatnak számít az azonos családba tartozó fajok megkülönböztetése (*Cervidae* - szarvasfélék, *Suidae* - disznó félék).

## Célkitűzések

A fentiek ismeretében céloom volt:

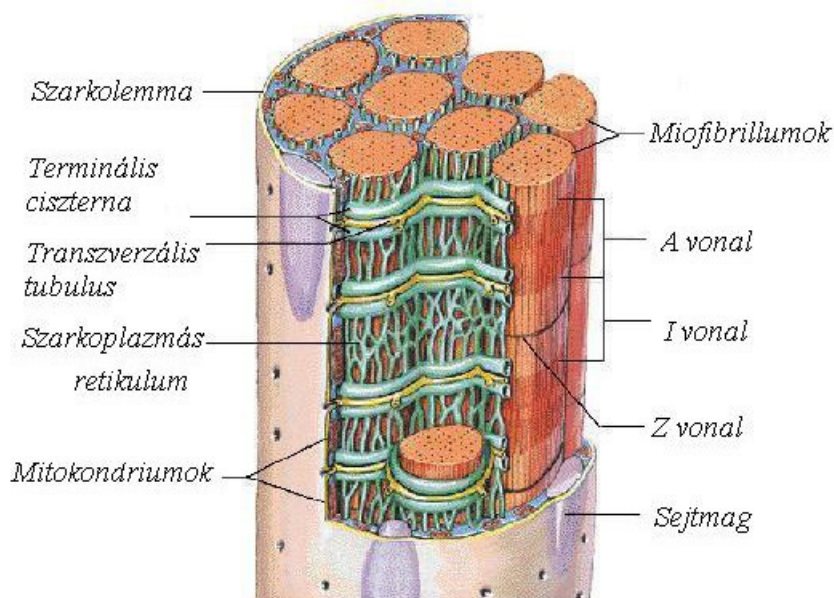
- DNS-re alapozott, polimeráz láncreakción (PCR) alapuló analitikai eljárások kifejlesztése, haszonállatok (marha, sertés, csirke) húsmintáinak szelektív elkülönítésére.
- Egyszerű-PCR, valamint restrikciós fragmenthossz polimorfizmust detektáló PCR-módszerek fejlesztése nagyvad fajok (vaddisznó, szarvas, őz, muflon) húsmintáinak haszonállatok húsmintáitól való elkülönítésére, illetve az egyes nagyvad fajok meghatározására.
- Modell vizsgálati módszer kidolgozása a DNS-kivonás hatékonyságának és a polimeráz láncreakción alapuló technikák (egyszerű-PCR, PCR-RFLP) kimutatási határértékének meghatározására.
- Haszonállatok húsának (marha, sertés, csirke) faj-specifikus kimutatására alkalmazott egyszerű-PCR és PCR-RFLP technika vizsgálata vörösáru típusú modellek alapján.
- Haszonállatok húsának (marha, sertés, csirke) faj-specifikus kimutatására felhasznált egyszerű-PCR és PCR-RFLP módszerek vizsgálata konzerv típusú modellek alapján.
- Kereskedelmi forgalomból származó hústermékek véletlenszerű szűrése faj-specifikus húseredet kimutatás céljából.



## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. A húsok faj-specifikus azonosításának biokémiai háttere

Az élelmiszeripari értelemben vett hús izomszövetből, zsírszövetből és kötőszövetből épül fel, mely tartalmazza a szöveteket ellátó idegeket és véredényeket. Az izomszövetek kötőszöveti hárttyakkal elhatárolt izomnyalábokból épülnek fel, mely nyalábok további izomrostokból állnak. A rostokban található miofibrillumokat azok a szerkezeti fehérjék építik fel, melyek az izommozgásban játszanak szerepet. Az ezek közötti tereket tölti ki a szarkoplazma, melyek fehérjéi az energiatermelő folyamatokban, a metabolitok és az oxigén szállításában játszanak szerepet (1. ábra).



(Forrás: [people.eku.edu/ritchison/g301notes3.html](http://people.eku.edu/ritchison/g301notes3.html))

**1. ábra** Az izomrostok felépítése

#### 2.1.1. Az izomszövet fehérje-összetétele, jellemzése

A hús táplálkozás-élettani szempontból kedvező aminosav-összetételű, magas biológiai értékű fehérjéket és emellett hasznos ásványi anyag komponenseket, mikroelemeket és vitaminokat is tartalmaz (Hajós, 2000). A szűkebb értelemben vett izomszövet 15 - 25%-a fehérje, mely a vágóállatok faja, fajtája, takarmányozása, életkora és neme függvényében változik (Lásztity, 1980), s ez megnehezíti a mennyiségi élelmiszeranalitikai mérések kidolgozását.

A húsfehérjék oldékonyságuk szerint három csoportba sorolhatók:

- miofibrilláris fehérjék - magasabb sókoncentrációjú oldatokban oldható aktin, miozin, tropomiozin, troponin és  $\alpha$ -,  $\beta$ -aktinin, melyeknek az izom mozgásában van szerepe elsősorban;
- szarkoplazma fehérjék - albuminok, mioglobin, globuláris fehérjék, miogén, mitokondriális fehérjék, lizoszómák, liposzómák, szarkoplazmás retikulum hálózat, melyek vízben és gyengébb sóoldatokban oldhatók.
- kötőszöveti fehérjék - kollagén, elasztin, retikulin, melyek vízben és sóoldatokban oldhatatlan frakciót képeznek.

A fent említett csoportok közül faj-specifikus meghatározásra elsősorban a szarkoplazmás-eredetű albuminok, globulinok, valamint a mioglobin használhatóak. A miofibrilláris fehérje csoportban is találhatunk a szarkoplazma fehérjéknél nagyobb hőstabilitással rendelkező, troponin csoportba tartozó fehérjét. Az azonosítási módszerek kidolgozása során azonban figyelembe kell venni a húsfehérjék hőkezeléssel, illetve érleléssel egyidejűleg meginduló változásait. A fehérjék denaturálódnak, oldhatóságuk csökken, megváltozik az immunreaktív felszíni csoportok száma. A szarkoplazma fehérjék 40-60 °C körül kezdenek aggregálódni (Hamm, 1977; Davis et al., 1985, McCormic et al., 1988; Okayama et al., 1991), de a kevésbé faj-specifikus miofibrilláris és kötőszöveti fehérjék denaturálódása is megkezdődik 53-63 °C között (Martens et al., 1982; Morita & Yasui, 1991). A húsok porhanyósságát, főzési és sütési veszteségeit javító érlelés során a miofibrilláris fehérjék proteáz enzimes degradációja következik be (Penni 1980; Quali, 1990). Ez a degradáció kimutatható a nagy molekulatömegű tartományban lévő fehérjéknél (titin, nebulin) és a troponin komplexet alkotó fehérje csoportban, a troponin-t fehérjénél (Huff-Lonergan et al., 1995).

### 2.1.2. A faj-specifikus meghatározásokban szerepet játszó DNS-szakaszok

Míg a fehérjék egy része specifikusan csak az izmokban fordul elő, addig a genetikai kódolásukat megvalósító DNS-molekulák minden sejtben megtalálhatóak. Az örökítő anyag kimutatásán alapuló faj-specifikus meghatározások elsősorban nem az izomszövet fehérjéit kódoló génszakaszok alapján valósulnak meg. Ennek oka egyrészt abban keresendő, hogy a rendszertani kutatások alapját képező mitokondriális gének feltérképezése korábban megvalósult, másrészt a haszonállatok termelékenységét javító gének esetében nem azok faj-specifikus eredete, hanem az állatok már említett paramétereinek javítása volt a fő kutatási szempont.

A mitokondrium néhány mikrométer nagyságú, kettős membránrendszerű sejtszervecske, mely egyike a legrégebben felismert sejtkepleteknek. Kívülről egy sima membrán borítja, a belsejében egy összegyűrődött membránrendszer található, melyet folyékony gyűrű alakú DNS-molekulákat tartalmazó állomány tölt ki. A mitokondriumok az eukarióta sejtekben energiatermelő központ szerepét töltik be és egy, de akár több ezer kópiában is előfordulhatnak egy sejtben. A mitokondriumok nagy kópiaszáma és anyai ágú öröklésmenete és ez által fajon belüli kisebb variabilitása teszi alkalmassá faj-specifikus DNS vizsgálatokra (Bálint, 2000). Az állati-eredetű, mitokondriális DNS, 15-50 kilóbázis hosszúságú teljesen kódoló régiókból áll, ritka benne a nem kódoló rész. Ez utóbbiak általában 37 gént tartalmaznak, melyek 22 tRNS-t, 2 rRNS-t és 13 mRNS-t kódolnak, valamint egy kontrol régiót tartalmaznak (Gardner & Snustad, 1984).

A DNS alapú módszerek más csoportjai genomiális eredetű DNS szekvenciák felsokszorozásán alapulnak. Ilyen típusúak a növekedési hormont vagy az rRNS-eket kódoló gének. Ezek a gének többnyire egy kópiában vannak jelen a sejtekben, ami élelmiszervizsgálati szempontból kevésbé optimális, a későbbiekben ismertetett mátrixhatás és DNS-töredezettség miatt. Ismeretesek olyan kutatási eredmények, amelyek a minden lokuszban véletlen módon ismétlődő mikroszatelit régiókat sokszorozzák fel, mellyel faj alatti szinten fajták vagy egyedi állatok is beazonosíthatók.

## **2.2. Faj-specifikus kimutatási módszerek**

### **2.2.1. Fehérje kimutatáson alapuló technikák**

A faj-specifikus húseredet azonosítására nyers és hőkezelt élelmiszerekben egyaránt meghatározó szerepe van a fehérje elválasztáson, illetve kimutatáson alapuló, elektroforetikus és immunanalitikai módszereknek. E módszerek előnye, hogy viszonylag egyszerű laboratóriumi műszeres háttér mellett megvalósíthatóak, alkalmazhatóságukat azonban a már említett élelmiszeripari tartósítási eljárások, elsősorban a hőkezelés erősen korlátozhatják (Hernandez et al., 1994).

#### **2.2.1.1. SDS poliakrilamid gélelektroforézis /SDS-PAGE/**

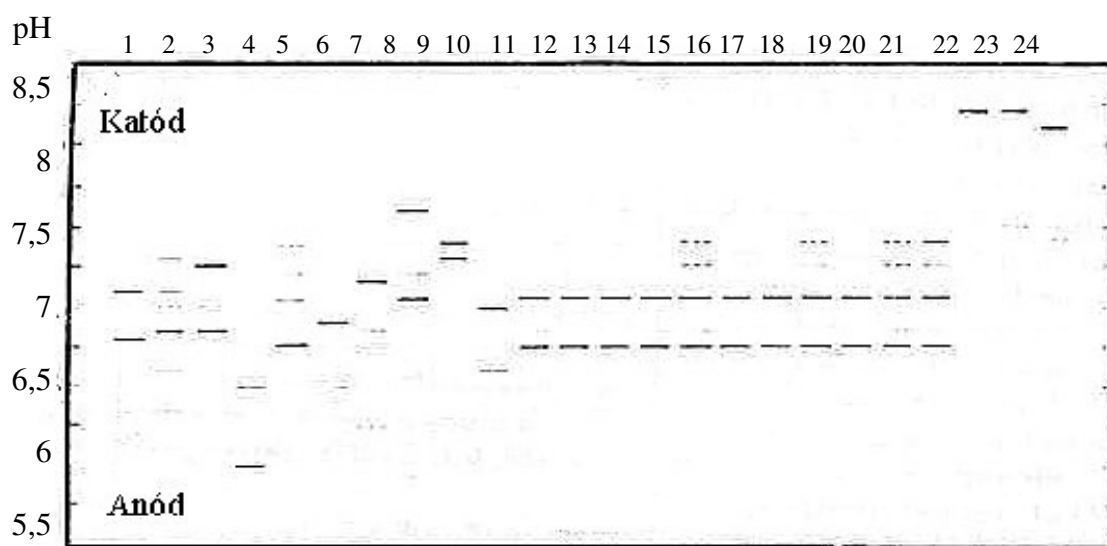
Amennyiben a fehérjéket nátrium-dodecil-szulfát (SDS) tartalmú gélben futtatjuk, az elválasztás a fehérje molekulatömege szerint megy végbe, mivel az SDS "elfedi" a fehérjék töltéseit. A futtatás során keletkező sávok élesek, jól pozícionálhatók. Hofmann (1973) marha, sertés, ló és szarvas húsok préslevének elválasztása után specifikus mintázatú és különböző intenzitású sávokat kapott ennek a technikának a felhasználásával. Azonban az nem volt egyértelműen bizonyítható, hogy ezeket a mintázatokat valóban a specifikus fehérjék jelenléte, vagy pedig az állatok életkorából, illetve tápláltságából eredő eltérések okozzák. Fischer et al. (1978) kutatási eredményeikkel rámutattak arra, hogy a faj-specifikus szarkoplazma fehérjék oldhatóságát és az elektroforetikus mintázatát a húsok érésekor végbemenő nem kívánatos változások (PSE-jelleg kialakulása) jelentősen befolyásolhatják, ezért ismeretlen minták esetén, azonosításra a módszer nem alkalmas.

#### **2.2.1.2. Izoelektromos fókuszálás**

Az izoelektromos fókuszálás (IEF) egy olyan elektroforetikus technika, mely során a fehérjék folyamatos pH-gradiensben, izoelektromos pontjuk alapján válnak el. A fókuszálás kiegyenlítő technika, amely nem függ az elválasztás idejétől, néhány órán belül eredményt ad és nagyon jó a felbontása olyan esetekben is, mikor a pI különbség csak 0,02 pH. Az eltérő típusú fehérjék megfestéséhez specifikus festési eljárások használhatóak, pl. glikoproteinek perjódsvas-Schiff festése, lipoproteinek szudánfekete festése (Rigetti et al., 1992).

IEF technikán alapuló faj-specifikus húseredet vizsgálatokat elsőként Thinberg és Olsman (1976) végeztek, mely kutatásokat marha, sertés, ló, csirke és néhány hal húsmintájának szelektív elkülönítését célozták meg. Az eredmények azt mutatták, hogy bár a sávok jól elkülöníthetőek, sok tényező befolyásolja a mérést.

Eltérés mutatkozott az izomcsoportok között, de a fagyasztás és a hús érleltségi állapota úgyszintén megjelent a sávazottságban. Ez negatív eredménynek bizonyult az elkülönítés szempontjából ugyanakkor rámutatott arra, hogy a módszer a fent említett, speciális vizsgálatokra jól alkalmazható. Minőségi analízisre több kutatócsoport dolgozott ki elválasztási technikát *Comassie Blue* festéssel (Bauer, 1981; Grundhöfer, 1982) és a rendkívül érzékeny ezüsfestéssel (Bauer és Hofmann, 1987a). Hofmann (1985) összefoglaló munkájában tanulmányozta az izomcsoport, a mintakezelés és a faj hatását marha és sertés húsból kivont szarkoplazma és miogloblin fehérjékre. Kutatási eredményei azt mutatták, hogy a miogloblin izoelektromos fókuszálással történő elválasztása faj-specifikus eredményeket mutat, és a mintázat nem függ a minta előkezelésétől (friss vagy fagyasztott, illetve tárolt). Bauer és Hofmann (1987b) továbbfejlesztették a módszert, mely során az elválasztott miogloblin sávokat pszeudoperoxidáz festéssel tették láthatóvá. A technika jól alkalmazhatónak bizonyult 100 °C-ig hőkezelt minták vizsgálatának esetében is. Mann és Bauer (1991) azt is kimutatták, hogy a sávok eloszlása a hús hűtőtárolásával sem változik meg, azonban hőkezelt, sózott és füstölt termékeknél a nitrozomiogloblin létrejötte gátolja ezt a típusú meghatározást.



(Forrás: Hofmann & Blüchel, 1986)

**2. ábra** Miogloblin atlasz: Különböző állatfajok miogloblin fehérjéinek elválasztása izoelektromos fókuszálással (pH gradiens 5,5-8,5)

1. marha; 2. bivaly; 3. ló; 4. sertés; 5. birka; 6. kenguru; 7. teve; 8. barnamedve; 9. nyúl; 10. vadnyúl; 11. őz; 12. dámszarvas; 13. gímszarvas; 14. rénszarvas; 15. zerge; 16-21 antilopfajták; 22. kacs; 23. vadkacs; 24. strucc

### 2.2.1.3. Immunológiai módszerek

Az immunkémiai módszerek olyan analitikai technikák, melyek az antigén és ellenanyag nem kovalens kapcsolódásából képzett immunkomplex elsődleges reakcióján vagy az ezt követő másodlagos reakciók mérésén alapulnak. Az első beszámolók az immunanalitika alkalmazásáról az 1959-es évre nyúlnak vissza. Élelmiszerek vizsgálatában terjedése lassabb volt, mint a klinikai diagnosztika területén, a vizsgálatok elterjedését hátráltatta a speciális műszerek beszerzési költsége, a mintakezelés és a radioaktív jelölés nehézkes alkalmazása. A módszerek fejlődésében jelentős ugrás volt tapasztalható az enzimés jelölések alkalmazásának terjedésével. Az első élelmiszerekkel kapcsolatos publikáció 1974-ben, Lugström és munkatársainak kutatásáról jelent meg, amely a vágósertésekben élősködő *Trichinella spiralis* parazita kimutatására irányult.

Antigénként élelmiszeranalitikai vizsgálatokra fehérjéket vagy fehérjekeverékeket használnak elsősorban, melyek közül a legalább 1000 D molekulasúllyal rendelkező fehérjék már jó immunogének. A specifikus ellenanyaggal történő húseredet-meghatározásához a húsfehérjék közül a szarkoplazma, a szérumfehérjék (albuminok, globulinok) és a hőstabil miofibrilláris fehérjék jöhetnek számításba. A kimutatáshoz használt ellenanyagok az előállítási módszertől függően monoklonális vagy poliklonális típusúak lehetnek. A poliklonális ellenanyagok a többszöri, kéthetes periódusban oltott állatok, elsősorban nyúl, kecske és ló vérszérumából nyerhetők. Jellemzőjük, hogy az antigénként használt fehérje több immunreaktív csoportjára termelődött ellenanyagok keverékét tartalmazzák. Alkalmazásuk hátránya, hogy nem specifikusak és keresztreakciókat mutathatnak használatuk során. Ilyen keresztreakciókat adhatnak faj-specifikus meghatározás esetében a sertés és vaddisznó; a marha, szarvas és birka, valamint az eltérő baromfi fajok minták. Ezzel szemben a hibridóma technikával előállított monoklonális ellenanyagok az antigén egy felszíni, szelektív csoportjával, az antigén determinánssal reagálnak. Ennek során az immunizált egér vagy patkány lépsejtjeit tumor sejtekkel hibridizálva, végtelenül osztódó és reprodukálható sejtekből, megfelelő szelekció után fajlagos ellenanyagok nyerhetők. Ez utóbbiak nagy specificitással rendelkeznek, de előállításuk költséges (Gazzaz et al.,1992).

Az ellenanyag alapú módszerek első generációját az ún. precipitációs tesztek képezték, melyek az immunkomplex kialakulását követő másodlagos reakció kimutatásán alapultak. Ezt követően, a technikák fejlődésével lehetővé vált az immunkomplex közvetlen vagy közvetett kimutatása jelölt ellenanyagok (enzim, fluoreszcens festék) segítségével.

Ma az ún. szilárd fázisú enzimjelzéses immunoszorbens (ELISA) technikák a legelterjedtebbek a gyakorlatban alkalmazott módszerek közül. Ennek lényege egy 96 lyukú mikrotiter lemez, ahol a mikroküveták felületére, a mérőrendszerek elrendezési típusától függően ellenanyagot vagy fehérjét (antigén) kötnek. A faj-specifikus analitikai kimutatás legelterjedtebb mérési elrendezéseiről a 3-4. ábra ad áttekintést.



**3. ábra** Az indirekt ELISA lépései



**4. ábra** A direkt szendvics ELISA áttekintő ábrája

Az indirekt ELISA mérőrendszer esetében az antigén és ellenanyag komplexét egy második, jelzett ellenanyag, a konjugátum segítségével színes szubsztrát alkalmazása mellett mutatják ki. A színerősség arányos a fehérje-antigén mennyiségével (3. ábra).

Az ún. szendvics rendszerű ELISA mérések esetén a specifikus ellenanyagot kötik a lemezre, amelyre a keresett fehérjét tartalmazó minta kerül. A következő lépésben egy szintén specifikus, jelölt ellenanyagot, a konjugátumot adják a rendszerbe. A színikialakítás itt is szubsztrát segítségével történik. Ennek a rendszernek az előnye, hogy a lekötött ellenanyag csak a keresett fehérjét köti meg, ezáltal egy érzékenyebb rendszer hozható létre. A kialakult szín erőssége ez esetben is arányos a minta mennyiségével (4. ábra) (ROITT et al., 1998).

A nyers húsok azonosításához elsősorban nagy molekulásúlyú vérszérum fehérjéket, albuminokat, globulinokat használnak. Itt probléma lehet, hogy a húsban a maradék vértartalom erősen függ a vágás minőségétől (Griffith & Bellington, 1984), valamint felmerül a keresztreakció kérdése is, amennyiben a termék vérfehérjét, illetve nem hús-eredetű fehérjét, mint tej- vagy tojásfehérjét tartalmaz (Goodwin, 1992).

A későbbiekben a módszerfejlesztések során igyekeztek felváltani a szérumfehérjéket vízzoldható húsfehérjékkel. A további érzékenység növelésére „szendvics” elrendezésű módszereket fejlesztettek. Emellett a immunszérum-specifitás növelésére a keresztaktivitást fehérje kimerítéssel szüntették meg a mérés előtt. Ezt a technikát alkalmazták Martin és munkatársai (1988a, b c) sertés, ló és csirke húsok kimutatására nyers húskeverékekből.

A hibridóma technika terjedésével, antigénként megtartva az oldható izomfehérjéket a monoklonális ellenanyag előállításának irányába tolódott el a kutatás. Ennek segítségével dolgoztak ki csirke (Martin et al., 1991), sertés (Morales et al., 1994), ló (Garcia, 1994) azonosítására alkalmas mérőrendszereket, melyeket nyers húsok meghatározásához tudtak igen jól felhasználni.

Eközben mind nagyobb igény volt arra, hogy az azonosítás hőkezelt, feldolgozott termékekből is megvalósítható legyen. Hőstabil antigénekre alapuló ELISA rendszerek kidolgozásában Berger et al. (1988) és Sawaya et al. (1990) vettek részt. Sherikar és munkatársai (1993) indirekt ELISA rendszert dolgoztak ki húszazonosítás céljából. Saját fejlesztésű hőstabil fehérjekomponenst használtak specifikus immunszérumok előállítására. A poliklonális szérumban jelenlévő a keresztreakciók kivédésére a keresztreakáló fehérjékkel kimerítették a szérumokat, így téve azokat monospecifikussá.

### **2.2.2. A dezoxiribonukleinsav kimutatásán alapuló módszerek**

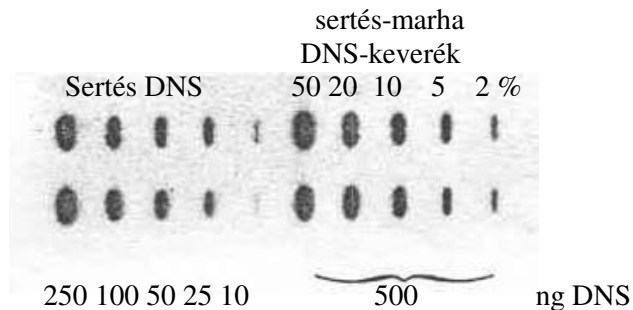
A dezoxiribonukleinsav (DNS) kimutatásán alapuló módszerek élelmiszer analitikai célokra történő alkalmazásának kritikus pontja a már említésre került fragmenstörés, és mátrix effektus hatása a mintából izolálható DNS minőségére (tisztaság, átlagos bázispár méret) és mennyiségére. A mátrixból a megváltozott méretű DNS fragmensek elegendő mennyiségben és minőségben történő kivonása céljából az élelmiszeralkotók közül a fehérjék, zsírok, poliszacharidok, polifenolok (tannin) és más egyéb ingrediensek eltávolítása (pl. csokoládé esetében) az elsődleges feladat, mivel számos esetben irreverzibilis kapcsolatot alakítanak ki a termékben található nukleinsavakkal. Az összetétel okozta DNS-izolálási nehézségek mellett a feldolgozási technológia során bekövetkező átlagos DNS-lánchossz csökkenés jelenségét is figyelembe kell venni a kiválasztott módszerek alkalmazásakor. A frissen vágott húsból izolálható DNS-lánc 20-50 kilobázispár hosszúságú, mely néhány napos érlelés és tárolás során is 15-20 kilobázispárra csökken, és két hét után már a 100-300 bázispár tartomány felé való eltolódás figyelhető meg. Szintén fragmens méret csökkenés tapasztalható a fermentációs úton előállított szalámik és kolbászfélék esetében. A hőkezelés, különösen a 121 °C-on való sterilizálás pedig drasztikus fragmensnagyság csökkenést okoz, és az átlagos bázispár méret 400 bázispár alá esik vissza (Ebbehoj & Thomsen 1991). Emellett az élelmiszer minta bármiféle fizikai vagy kémiai kezelése (pl. pH, hőmérséklet, nyíró erők) a DNS károsodásához, fragmens méretének csökkenéséhez vezet és a különböző helyeken bekövetkező lánc-törések miatt, előfordulhat, hogy a kimutatás lehetetlenné válik.



Vannak olyan élelmiszerek is, melyek előállításuknál vagy természetüknél fogva kevés DNS molekulát tartalmaznak. Ilyenek, pl. az olajok, lecitin, tej, túró vagy tojás.

### 2.2.2.1. Southern-féle lenyomat (blotting) technika

Southern-féle lenyomat (blotting) technika alkalmazása során, a húsból kinyert DNS mintát gélelektroforézissel szeparálják, majd a gél NaOH oldattal kezelik. Ennek hatására a kettős láncok egyszálúvá válnak, melyek szívatással vagy elektroforetikus úton nitrocellulóz membránra vihetők át. A membránon szárítással rögzítik a szálakat, majd erre hibridizáltatják az ismert szekvenciájú ún. próbát, mely *in vitro* szintetizált, biotinnal, foszfor 32-es izotóppal vagy más módon jelölt DNS-szál. Ha a próba homológ szekvenciáját a DNS-minta tartalmazza, színes vagy röntgen filmen látható sávok jelennek meg a membránon (6. ábra). Ilyen vizsgálatokat Wintero et al. (1990), Ebbehøj és Thomsen (1991) végeztek. Ebbehøj és Thomsen (1991) kutatásai során sertés- és marhahúsok 2-100 %-os részarányú keverékeit vizsgálták 80 °C, 100 °C és 120 °C-on kezelt mintában. A félkvantitatív hibridizációs mérés során  $P^{32}$  izotóppal jelölt, genomiális sertés DNS-próbákat használtak fel. Nyers keverékekben a kimutatás határértéke 0,1%, hőkezelt mintában 0,5% volt. A mérés hibája elérte a 20%-100 %-t is, különösen a kis mennyiségű sertéshúst tartalmazó minták esetében.



(Forrás: Ebbehøj & Thomsen, 1991)

**5. ábra** Sertés-specifikus DNS próbával hibridizált membrán autoradiográfiás képe, 121 °C-on 10 percig hőkezelt marha és sertés húskeverék DNS mintáiból

Problémaként felmerült azonban a hibrid hőmérsékleti instabilitása és a keresztreakciók létrejötte. Az sem elhanyagolható szempont, hogy az izotóp jelöléssel az eredmények kiértékelése nem minden laborban megvalósítható, megfelelő technikai háttérrel, a módszer kivitelezése pedig nagy technikai gyakorlatot igényel.

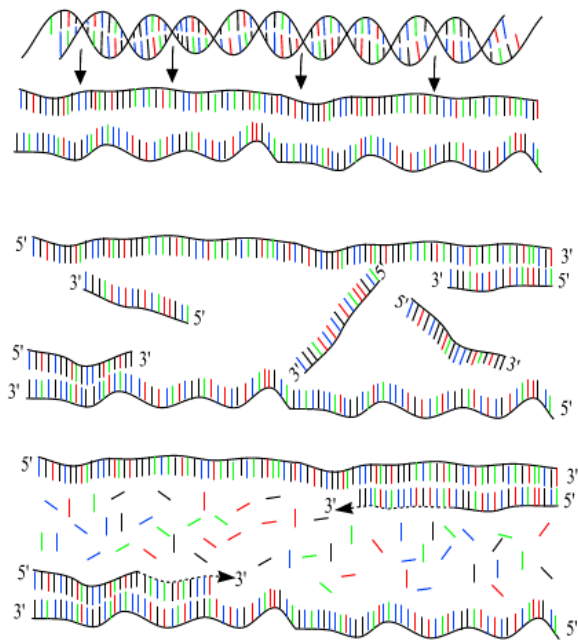
#### 2.2.2.2. Polimeráz láncreakción alapuló technikák (PCR)

A PCR-rendszerek a sejtek genetikai információját meghatározó DNS kimutatásán alapulnak, melynek három alaplépése a megfelelő tisztaságú DNS izolálása, a DNS-szakaszok polimeráz enzimmel történő felsokszorozása, a DNS és a termékek azonosítása. Az 1970-es évek elején Khorana et al. írták le elsőként a DNS oligonukleotidok és DNS polimeráz enzim segítségével történő, *in vitro* megsokszorozását. A módszer során alkalmazott *E. coli* eredetű DNS polimeráz (Klenow fragmentum) hőérzékeny volta és a primerek nehéz hozzáférhetősége miatt, a technika feledésbe merült. Rohamos fejlődés a nyolcvanas évek során, a DNS szintetizáló készülékek kereskedelmi bevezetésével indult meg. A DNS felsokszorozásnak (amplifikáció) láncreakcióvá történő fejlesztését Kary Mullis dolgozta ki és mutattat be egy 1985-ben rendezett konferencián, mely módszer kidolgozásáért, munkásságának elismeréseként 1993-ban Nobel-díjat kapott. A DNS sokszorozáson alapuló PCR-módszer felhasználásával, néhány óra lefutása alatt kis számú molekulából milliárdos kópiaszámú fragmens állítható elő, mely már alkalmas a kimutatásra (Candrian et al., 1991). Elméletileg a reakcióval igen kis mennyiségű, akár 1 kópia DNS is a kimutatható, azonban a bevezetőben ismertetett fragmens törés, mátrix-hatás, technológiai paraméterek, valamint egyes PCR inhibitorok miatt ez az érzékenység jelentősen változhat az élelmiszeranalitikai célú vizsgálatokra beállított módszerek esetében. Ilyen inhibitorok lehetnek az élelmiszer-összetevők, mint pl. a hemfehérjék vagy az izolálás során használt vegyszerek. Az inhibitorok elsődleges kiszűrésére és a kapott DNS-oldat koncentrációjának meghatározására spektrofotométeres mérés alkalmazható, mely során 260 és 280 nm hullámhosszon mért értékek hányadosából képzett R érték ad információt az oldat RNS és fehérje szennyezettségére. Amennyiben az R értéke 1,7 és 2,0 között van, az oldat PCR tisztának tekinthető, 1,7 abszorbancia érték alatt a minta fehérjével, 2,0 érték felett RNS-el szennyezett. (Maniatis et al. 1989) . A további inhibitor hatás vizsgálatára célszerű egy belső kontrol PCR reakció használata a további, oldott inhibitorok hatásainak vizsgálatára. A Rossen et al. (1992) kutatási eredményei azt mutatták, hogy a nátrium-klorid (1mg/100µl reakcióelegy), a szacharóz (10 µg/100µl reakcióelegy), az ovalbumin (25 mg/100µl reakcióelegy) és maga a kivont DNS is (0,4 mg/100µl reakcióelegy felett) gátolhatja a polimeráz láncreakciót. Az extrakció során felhasznált vegyszerek közül az SDS (0,01%), etanol (5%), EDTA (1 mM), guanidin-izotiocianát (100 mM), CTAB (0,01%) szintén ilyen inhibitor hatású lehet. Zimmermann et al. (1998) 9 különböző DNS extrakciós eljárást hasonlított össze szója minták (tofu, szójaliszt, lecitin) elemzése során.

Meghatározták a kivont DNS mennyiségét, minőségét és a kapott PCR jel erősségét. Eredményeik alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a DNS-kötő gyantát felhasználó módszerek, mint a WIZARD, Dneasy, Nucleon Phytopure esetében, valamint a CTAB módszer alkalmazásakor viszonylag alacsony hozamú, de igen jó minőségű DNS nyerhető. Ugyanakkor az egyszerűbb, gyorsabb és olcsóbb eljárások, mint a ROSE, alkáli vagy a Chelex 100 viszonylag nagyobb hozamú, de gyenge minőségű DNS-t eredményeznek. Janssen et al. (1998) egy kisózáson alapuló technikát és a Wizard módszert hasonlították össze a polimeráz láncreakciót követő, hibridizáción és immundetektáláson alapuló technika érzékenységeinek változásával. Azt tapasztalták, hogy a Wizard technika megnövelte a kimutatás határértékét, marha és birka húsok vizsgálatának esetében. Brodman et al. (2003) megfigyelték, hogy a Wizard DNS-izolálási módszerrel csak kis mennyiségű DNS nyerhető sterilizált mintákból, illetve a feldolgozási technikának köszönhetően a zselatinból. Az extrahált DNS mennyiségének becslésére UV-spektroszkópiás abszorbancia mérés, PicoGreen reagens által indukált fluoreszcencia mérés vagy, agaróz gélelektroforézist követő, denzitométeres kiértékelés használható etidium-bromidos vagy fluoreszcens festést követően.

A következő lépésben a polimeráz láncreakció során az extrahált és izolált DNS minta egyes szakaszait dúsítják fel, melynek mechanizmusa hasonlít az élő sejtben végbemenő DNS sokszorozás (amplifikáció) mechanizmusához. Az amplifikáció egy programozható termosztát készülékben, rövid, ismert szekvenciájú egyszálú DNS-láncok (primerek), hőstabil DNS polimeráz enzim és dezoxinukleotid – trifoszfátokkal segítségével, Mg-ionok jelenléte mellett megy végbe. A primerek a komplementer DNS-szállhoz kapcsolódnak, úgy hogy a 3' végeik egymással szembe mutatnak. A hőciklusok első lépése során a templát DNS oldatot 94-95 °C-ra melegítik fel, mely során a kettős hélix molekula egyszálúra válik szét. Az ún. félrekapcsolás kiküszöbölésére gyakran használt az ún. 'forró' start módszer. Ennek lényege az, hogy a Taq polimeráz hozzáadása vagy aktiválása előtt egy hosszabb 1-3 perces elődenaturációs lépést iktatnak be, mely így biztosítja a mintában lévő összes DNS egyszálúvá válását és a hűtési lépésben a primerek komplementer szekvenciájához kötődését. A következő lépés során (50 -65 °C) a reakcióelegyben lévő primerek a komplementer szakaszokhoz hibridizálódnak. Ismételt melegítést követően (72 °C) a hőstabil DNS-polimeráz a primer komplex részből kiindulva 3'-5' irányba új szálát szintetizál az elegyben lévő dNTP molekulákkal (6. ábra). Ezt a szálát a primer szekvenciája határolja és tartalmazza a második primerrel komplementer szekvenciát. Ez azt jelenti, hogy a második ciklus hődenaturációja során az új szál templátja lesz a második primernek. Mivel a szál az első primer szekvenciájával kezdődik, a szintézisben ezen a helyen lánctörés történik. A ciklusok

során a két primer által behatárolt méretű DNS szakasz exponenciálisan megsokszorozódik (Mullis et al., 1987).



### 1. lépés

Denaturáció 94 °C-on

### 2. lépés

Primerkapcsolódás  
50 - 64 °C-on

### 3. lépés

Lánchosszabbítás  
72 °C-on

(Forrás: [www.cofc.edu/~deavorj/102/images/nucleic/pcrsteps.gif](http://www.cofc.edu/~deavorj/102/images/nucleic/pcrsteps.gif))

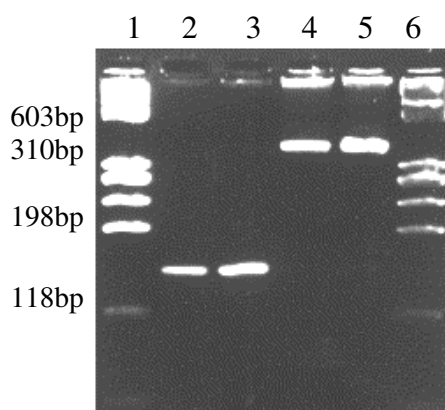
## 6. ábra A polimeráz láncreakció egy termociklusában zajló folyamatok elvi vázlata

A képződött termékek detektálása elektroforetikus elválasztást követő DNS festéssel (etidium-bromid, SYBR Green I, ezüst festés), vagy valós időben a láncreakció során SYBR Green I festékekkel, illetve különböző próbákkal (TaqMan, Molecular beacon, Scorpions) valósítható meg. Az 500-2500 bázispár méretű DNS fragmensek elektroforetikus elválasztására 1 %-os agaróz gélelektroforézis alkalmazható, az 1000 bázispár méretű fragmensnél kisebb termékek szeparálása poliakrilamid-gélelektroforézissel történhet. A kapott sávok festést (etidium-bromid, SYBR Green I) követően UV fényben, illetve ezüsfestésnél fehér fényű megvilágításban láthatók (Ausubel et. al, 1989).

A faj-specifikus húsazonosítás területén a kvalitatív-PCR módszerek közül leggyakrabban az alább felsorolt technikákat használják:

- egyszerű-PCR (Simplex-PCR) technika
- duplex- és multiplex-PCR rendszerek
- polimorf DNS-szakaszok véletlenszerű felerősítése (RAPD-PCR)
- PCR reakciót követő restrikciós fragmenthossz polimorfizmus detektálás (PCR-RFLP)
- real-time PCR valós idejű minőségi analízisre.

Az **egyszerű-PCR** egy primerpár segítségével, egy adott fajra jellemző, specifikus DNS-szakasz sokszorozására épül. Meyer et al. (1994) eredményesen alkalmazták a módszert sertés és marhahúsok azonosítására birka, csirke és pulyka húsok mellett, a növekedési hormont kódoló gén 108 illetve 130 bázispár hosszúságú szakaszának felsokszorozásával. A módszer alkalmas volt az említett fajok húsmintáinak szelektív elkülönítésére. A szerzőcsoport 2-100% részarányú, 121°C-on, 10 percig hőkezelt marhahús-sertéshús keveréket is vizsgált a kialakított PCR-rendszerben és a hőkezelt minták vizsgálatára is alkalmas Cortex ELISA kittel. Az ELISA kittel a hőkezelt minták 20%-os, míg a PCR rendszer 2%-os kimutatási határértéket mutattak. A BSE problémák kirobbanása után népszerűbbé vált emu és strucc húsok azonosítására és hamisításának kizárására Colombo et al. (2000) dolgoztak ki mitokondriális-eredetű citokróm b fehérjét kódoló génszakasz sokszorozására épített egyszerű PCR-módszert. Előzetesen génszekvenciák és primertervező program segítségével kiválasztott 1 primerpár alkalmazása mellett a két faj mintájából eltérő méretű PCR-terméket (strucc DNS esetén 543 bp méretű termék, emu DNS esetén 229 bp méretű termék) kaptak, mely így lehetővé tette a szelektív elkülönítést. Munkájuk során az etidium-bromidnál érzékenyebb ezüst festést alkalmazták az emu DNS-ből képződött gyenge jel erősítésére. Lockley et al. (2002) kutatásuk céljaként csirke és pulyka húsok egymás melletti, szelektív kimutatását célozták meg. Genomiális eredetű, 1 kópiás aktin génszakaszt választottak target szekvenciául. A reakció optimalizálásával 1%-os kimutatási határérték mellett is működő azonosító módszert fejlesztettek ki, mely során a pulyka-DNS minta 159 bp-os, a csirke target szekvencia 372 bp szakasza sokszorozható (7. ábra). A rendszer nem volt alkalmas tojásminták vizsgálatára, de lehetővé tette a baromfi húsok, sertés, birka és marha hústól való szelektív elkülönítését.

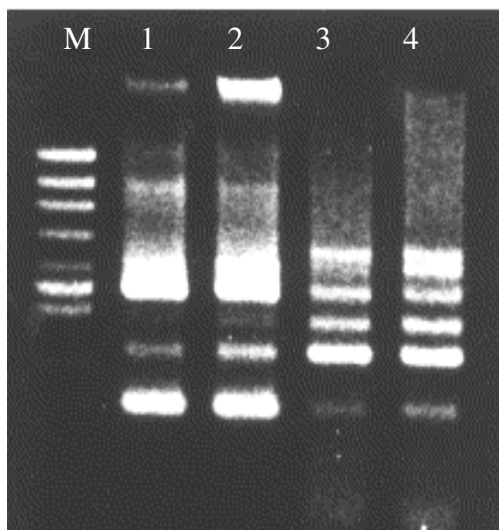


(Forrás: Lockley et al., 2002)

**7. ábra** Aktin fehérjét kódoló génszakaszra épített, pulyka és csirke specifikus egyszerű-PCR termékek elektroforetogramja

1. DNS standard; 2. 3. Pulyka DNS; 4.5. Csirke DNS 6. DNS standard

**Duplex- és multiplex-PCR** lényege hasonló az egyszerű-PCR elvéhez. Ez a módszer szintén az adott faj DNS-mintájának jelenléténél ad pozitív jelet, de lehetővé teszi, egyidejűleg egy reakciócsőben, több primerpár felhasználása mellett, több faj húsmintájának azonosítását.



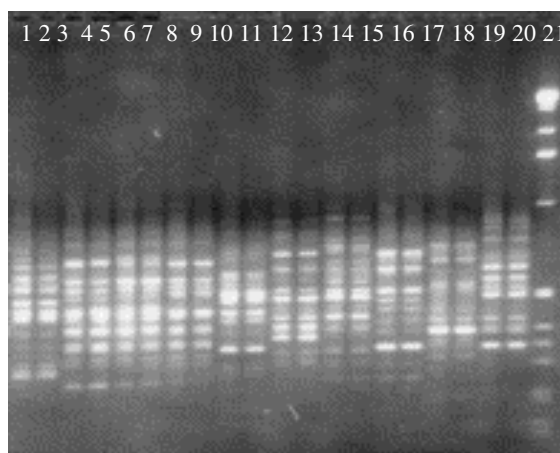
(Forrás: Matsugana et al, 1999)

**8. ábra** Hat állatfaj DNS keverékéből végzett multiplex-PCR analízisének eredménye

1, 12.5 ng; 2, 25 ng; 3, 12.5 ng; 4, 25 ng. DNS minta; Az 1. és 2. zsebben azonos primerkoncentráció, a 3. és 4. zsebben csökkentett primer koncentráció; M. DNS bázispár standard

Matsugana et al. (1999) hat állatfaj (marha, sertés, csirke, birka, kecske és ló) mintázatának egyidejű elkülönítésére fejlesztettek ki multiplex PCR-t, citokróm b fehérjét kódoló génre építve, melyeknél a kapott termékek 157 bp - 439 bp tartományban helyezkedtek el (9. ábra). A reakciókat előzetesen, külön-külön csövekben tesztelték 100 és 120 °C-on kezelt mintákban, ahol azt tapasztalták, hogy a ló-specifikus 439 bp fragmens a 120 °C-os mintában nem kimutatható és a marha specifikus 398 bp méretű jel is gyengén látható volt. Ezután a primereket ugyanazon időben DNS keverékeken tesztelték. A mérések során megállapították, hogy a primerkeverékekben külön szükséges optimalizálni az egyes primerek mennyiségét, illetve az erősen hőkezelt minták esetében a vizsgálandó DNS-szakasz méretét 400 bp alá kell tervezni. Di Pinto et al. (2005) olasz kutatócsoportja 2 primerpárra épített duplex PCR-technikát adaptált, lóhúsból készült nyers kolbászsok sertéshússal történő hamisításának kimutatására. A Matsugana-féle csoport (1999) primepárjait használták fel, mellyel a kereskedelmi mintákban 20%-ban sertéshús-lóhús keveréket detektáltak.

**Polimorf DNS szakaszok véletlenszerű felerősítése (RAPD-PCR).** Az analízisnél egy primerpár alkalmazásával a polimeráz láncreakció során több sávból álló mintázat jön létre, mivel a primerek a DNS-láncban több helyre is képesek bekötődni. Koch et al. (1998) 29 RAPD primerrel végzett analízist vaddisznó, sertés, ló, bölény, marha, szarvas, kutya, macska, nyúl és kenguru húsok DNS mintáiból. Egyes esetekben kaptak eltérő mintázatokat, de volt olyan minta is amellyel jelet egyáltalán nem kaptak a sokszorozás során. A vizsgált primerek közül 1 volt alkalmas a vizsgált fajok összességéből specifikus ún. ujjlenyomat sávokat létrehozására. Összességében arra a megállapításra jutottak, hogy ezzel a technikával a már említett specifikus mintázatok létrehozhatók a húsminták DNS-ből, ugyanakkor a módszer reprodukálhatósága erősen függ a reakció ciklusparamétereitől és a fajokon belüli polimorfizmusoktól. Martinez és Yman (1998) alkalmazták ezt a technikát ló, szamár, marha, birka, kecske, sertés és kenguru húsok elkülönítésére friss és fagyasztott húsmintákból H-12, T-20 és V-07 primerek felhasználásával. A fajok vizsgálata mellett, lóhús minták esetében 6 eltérő fajtajú mintát is elemeztek, ahol a fő sávok mellett specifikus fajtára jellemző mintázat is megjelent. A módszer hátránya az, hogy mint az a 10. ábrán látható, nagyszámú sáv jön létre egyetlen faj DNS mintázatát vizsgálva is, mely esetlegesen fajta szerinti eltérést is mutathat. Összetett keverék mintákban ez a rendszer nehezen lenne értelmezhető, így az állatfaj azonosításban ez az eljárás szélesebb körben nem terjedt el.



(Forrás: Martinez & Yman, 1998)

**9. ábra** Különböző állatfajok DNS mintáinak, V-07 primerrel végzett RAPD-PCR profilja 2%-os agaróz gélben történt elválasztást követően

1., 2. sertés; 3., 4. ló; 5., 6. őszvér ; 7., 8. szamár; 9., 10. rénszarvas; 11., 12. birka; 13., 14. kecske 15., 16. jávorantilop; 17., 18. bivaly; 19., 20. kenguru; 1 kb DNS standard

Ezzel ellentétben a *PCR-restríciós fragmenthossz polimorfizmus (PCR-RFLP)* faj-specifikus azonosításra igen széles körben használt módszer. Alkalmazása annyiban tér el az egyszerű PCR-rendszertől, hogy a primerpárral kapott PCR-terméket egy vagy több restríciós enzimmel hasítják el, mellyel több kisebb méretű fragmens keletkezik. A restríciós enzimek specifikus, 4-8 nukleotid hosszú szekvenciát ismernek fel a DNS-láncban és azt annak meghatározott pontja mentén hasítják azt el. Az ezzel az eljárással nyert DNS-fragmensek mérete és száma lesz fajra jellemző. Állatfajok PCR-RFLP alapú azonosítására leggyakrabban mitokondriális eredetű gének, közülük is a citokróm b fehérjét kódoló gén rövidebb-hosszabb szakaszait sokszorozzák fel. A legtöbb ezirányú kutatás alapja Meyer et al. (1995) kutatócsoportja által publikált citokróm b fehérjét kódoló gén 359 bázispár hosszú szakaszának PCR-RFLP vizsgálata. Kutatásuk során meghatározták a sertés, marha, vaddisznó, bölény, birka, kecske, ló, csirke, pulyka és emberi génszakasz mintegy hat (AluI, RsaI, TaqI, HinfI, HaeIII és MboI) restríciós enzimes hasítás utáni fragmenshossz eloszlását. Munkájuk érdeme volt az is, hogy haszonállatok (sertés, baromfi és birka) húskeverékeit is elemezve, arra a következtetésre jutottak, hogy maximum három fajkeverékből álló minta elemezhető eredményesen a mintázatok összetétele miatt. Matsugana et al. (1998) olyan, szintén a citokróm fehérjét kódoló gén, 194 bp hosszú szakaszának felhasználásával, PCR-RFLP módszert dolgozott ki, mellyel a japán szikaszarvas és a gímszarvas, a marha, sertés és csirke fajoktól elkülöníthető, még 120 °C-on hőkezelt húsmintákból is. Jel csak a szarvas-félékből sokszorozódott, bár a jelerősség ez esetben gyengébb volt. A PCR reakciót követő EcoRI, ScaI vagy BamHI enzimekkel kapott fragmens képpel pedig a két faj DNS mintázata egymástól is elválasztható, mivel a PCR-terméken más-más enzim talál hasítási helyet. A citokróm b génre alapozott PCR-RFLP technika használata során, a kiválasztott DNS-szakasztól függően kettő vagy több gerinces, állati eredetű DNS pozitív jelet ad egy rendszerben. Előfordulhat, hogy egy adott állatfaj DNS-éhez a primer pontosabban illeszkedik és annak DNS-e nagyobb valószínűséggel sokszorozódik. Rüggeberg et al. (1997) rámutatott arra, hogy a Meyer et al. (1995) által publikált, 359 bp-os PCR-RFLP rendszerben a sertés-eredetű DNS nagyobb valószínűséggel sokszorozódik, elnyomva más fajok DNS-mintáinak jelenlétét. Cespedes et al. (1998) 3 halfajta azonosítására használta fel a Cytb1-Cytb2 primerpáros PCR-RFLP rendszert. A PCR termékeket szekvenálás után 3 kiválasztott enzimmel (Nci I, Sau3AI és HinfI) hasította. A nyelvhal és a lepényhal esetében kaptak azonos képet NciI enzimmel hasítva, az érdes lepényhal esetén ez nem volt tapasztalható. A Sau 3AI enzim csak a nyelvhal PCR-termékét hasította el, míg a HinfI enzimmel mindhárom mintánál eltérő mintákat kaptak (nyelvhal: 285 és 74bp, lepényhal 301, 45, 13bp; érdes lepényhal 197,117,45 bp).



Branciaro et al. (2000) olasz kutatók a 359 bp-os mitokondriális, citokróm b génszakaszon belül megválasztott 175 bp-os fragmens sokszorozásával AluI, valamint HinfI restrikciós enzimes hasítását használták fel haszonállatok (sertés, marha, csirke és liba) húsmintáinak azonosítására. A kapott mintázat alkalmas volt konzervek és májpástétomok sertés, marha, csirke és liba-eredetű összetevőinek identifikálására. Partis et al. (2000) ausztrál kutatócsoportja a Mayer-féle citokróm b alapú PCR-RFLP rendszert, mintegy 22 állatfaj mintájának vizsgálatára terjesztette ki, melyek között a haszonállatok (marha, kecske, birka, csirke és pulyka) mintái mellett számos vad faj (kenguru, krokodil, emu) mintája is szerepelt. A HaeIII restrikciós enzimekkel végzett hasítások során a vizsgált 7 egyedből származó szarvas mintában eltérő mintázatokat is találtak. A sertés-DNS maszkírozó hatását úgyszintén tapasztalták marha és sertéshús keverékek elemzésénél. Kutatási eredményükből egy példa a 10. ábrán látható, mely egy RFLP mintázatot mutat, különböző állatfajok mintája esetében.



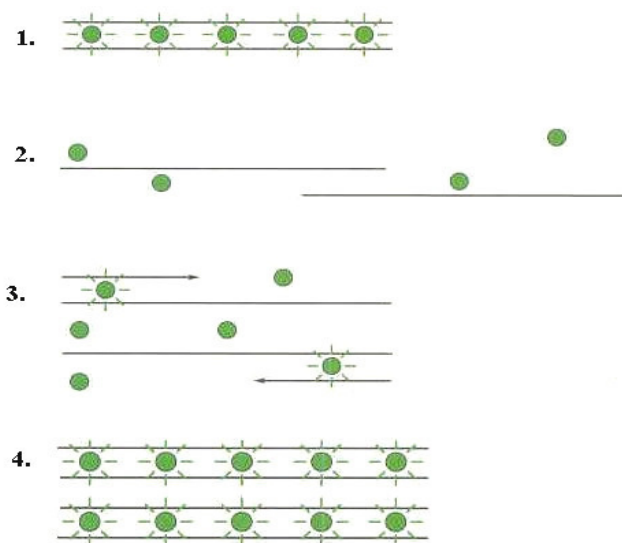
(Forrás: Partis et. al. 2000)

**10. ábra** Nyers húsok DNS-mintáiból végzett, citokróm b génre épített PCR-RFLP reakció képe HaeIII restrikciós enzim felhasználásával

1. DNS standard; 2., 3. kecske; 4. birka; 5. bölény; 6., 7. sertés; 8. marha

Chickuni et al. (1994) munkájukat egy 374 bázispáros ismétlődő szatellit I DNS régióra alapozva 80 °C, 100 °C és 120 °C-ra hevített húsminta vizsgálatával egy lépésben kecskét és a birkát tudtak elkülöníteni sertés, nyúl, szikaszarvas, marha és vízi bivaly húsmintáktól. A két faj egy további, ApaI enzimhasítás után adott faj-specifikus mintázatot, azonban a 120 °C-os mintáknál kecske esetében nem volt detektálható jel.

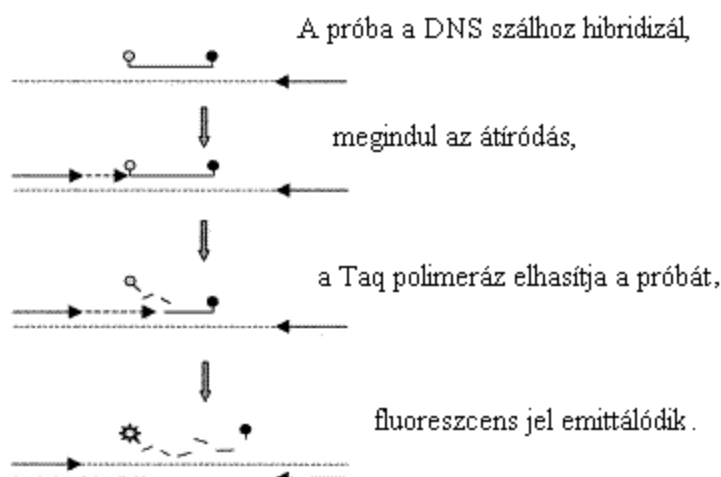
A *real-time PCR (Q-PCR)* analízis alkalmazásának lényeges eltérése az előzőekben felsorolt PCR rendszerektől, hogy a mérés során közvetlenül jön létre az a folyamatosan kimutatható jel, amelynek segítségével az eredmények további termékeltávolítás nélkül is azonosíthatóak, azaz a sokszorozódott DNS-kópiák mennyiségének növekedése valós időben követhető nyomon. A jelgenerálás többféle technikával is megvalósítható. Egyrészt az ún. SYBR Green I festék segítségével, mely a sokszorozódás során kötődik a kétszálú DNS-hez (13. ábra). Itt probléma lehet, ha a reakcióban a primerek esetleg szekvenciájukból adóan primer-dimereket képeznek és ezek hamis eredményt adhatnak.



(Forrás: Applied Biosystem ABI PRISM 7000 ismertető)

**11. ábra** SYBR Green I festékre alapozott detektálás működési elve real-time PCR analízis során

Ennél a technikánál, specifikussága miatt jobban elterjedt az ún. TaqMan próba használata, mely rövid, ismert szekvenciájú, a sokszorozni kívánt DNS-szakaszhoz illeszkedő, fluoreszcenciásan gerjeszthető festékmolekulákat hordozó egyszálú DNS próba (13. ábra).

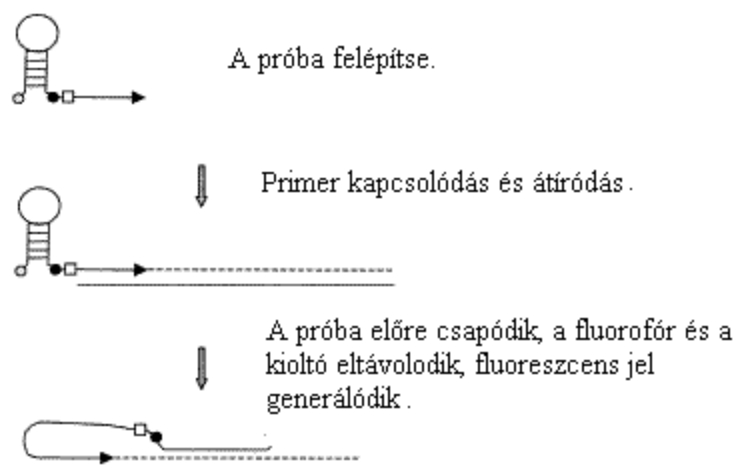


(Forrás: Lockley & Bardsley, 2000 )

## 12. ábra Real-time PCR rendszerben jelgenerálásra használható TaqMan próba működési elve

A két festékmolekula közül az egyik gerjesztési frekvenciája jóval kisebb (quencer/kioltó), mint a másiké (reporter/jelző). A Fröster-féle energiaátadási törvény szerint a besugárzó fotonokból nyert többlet energiát az R festék átadja Q-nak, ugyanakkor R nem ad jelet. A láncreakció során a Taq-polimeráz exonukleáz aktivitásánál fogva felhasítja a próbát. Ekkor már nem érvényesül a Förster-effektus és mindkét festék vagy csak R fluoreszkálni kezd (14. ábra). Az emittált fluoreszcencia megfelelő hullámhosszon mérhető és arányos a reakcióelegyben lévő specifikus target szekvencia aktuális mennyiségével (Holland et al., 1991).

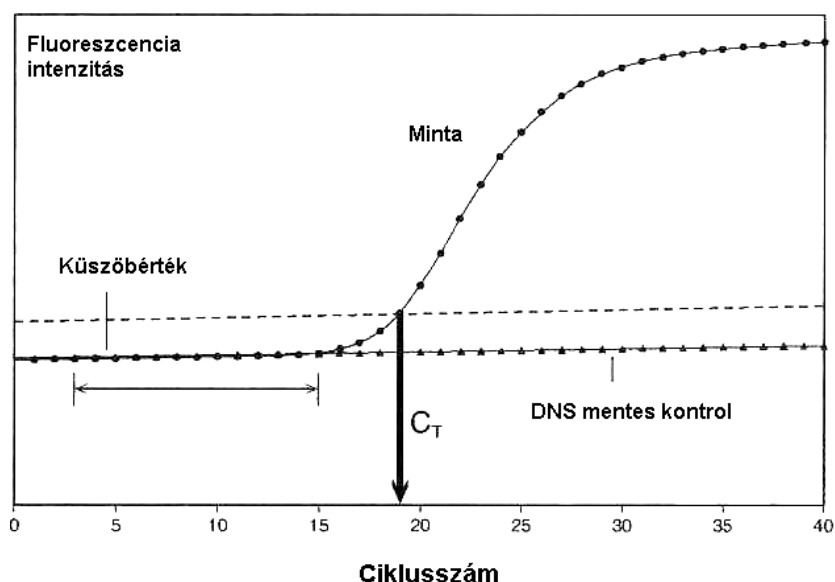
Hasonló elven működik az ún. Scorpion primer próba is. Ez esetben a feltekeredett próba tartalmaz egy primer régiót és egy 5' véget is, melynek működési elvét a 14. ábrán mutatom be.



(Forrás: Lockley & Bardsley, 2000 )

**13. ábra** Real-time PCR rendszerben jelgenerálásra használható Scorpion próba működési elve

A mért fluoreszcens jel, időbeni változása a ciklusszám függvényében a 15. ábrán látható. A mérés szempontjából az ún.  $C_t$  érték a meghatározó, mely az a küszöb ciklusszám, mely esetében a jel szignifikáns eltérést mutat. Minél nagyobb egy minta  $C_t$  értéke, annál kevesebb mennyiségű vizsgált összetevőt tartalmaz.



(Forrás: Applied Biosystem )

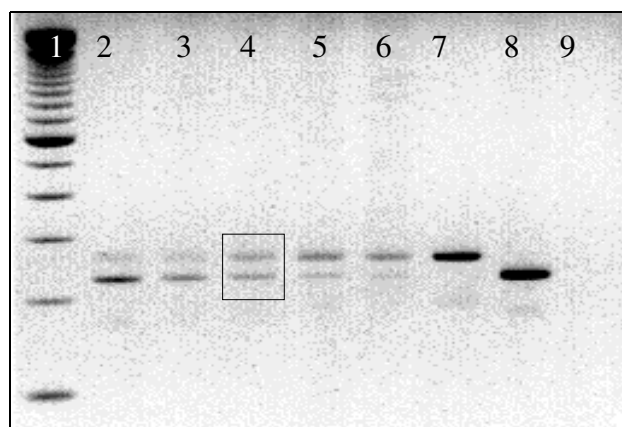
**14. ábra** A real-time polimeráz láncreakció során kapott amplifikációs görbe

Laube et al. (2003) olyan technikát dolgoztak ki, mellyel a sertés és marhahús egyidejűleg, kimutatható genomiális, foszfodiészteráz és rianodin génekre épített specifikus primerek segítségével, real-time kimutatási technikával. Munkájuk során a hús-hús modellek (0,1-100 %) felállítása mellett ismert összetételű feldolgozott mintákat (kolbászok, gulyás 1-80% húskeverékek) is vizsgálatba vontak, melyek fűszereket és adalékanyagokat is tartalmaztak. A mintákból a tisztított DNS-oldatot CTAB módszerrel kombinált szilikagél alapú izolálással nyerték ki. A kidolgozott módszer alkalmas volt a feldolgozott mintakeverékekben az 1%-os keverékek detektálására. Dooley et al. (2004) a citokróm b gén TaqMan (detektálásán alapuló, detektálási rendszert dolgoztak ki marha, sertés, birka, csirke és pulykahúsok kimutatására, nyers hús-hús keverék alapon. Marha, sertés és birkahúsokat emlős-specifikus, a csirke és pulyka húsokat baromfi-specifikus TaqMan próbával jelezték. Kutatásaik során lehetővé vált 0,5% kimutatási határérték melletti faj-specifikus azonosítás húskeverékekben. A real-time PCR technikát Hird et al. (2005) angol munkacsoport kacsahús faji és fajta szintű elválasztására használta fel. A módszer alkalmasnak bizonyult a Mallard és Muscovy fajták specifikus meghatározására, ugyanakkor a primer nem mutatott keresztreakciót a fácán, csirke, liba, pulyka, fürj, valamint a marha, sertés ló, szarvas és libahúsok mintáival. A módszert néhány élelmiszeren és állateledelen tesztelték, annak megállapítására, hogy a töredezett DNS ellenére a jelölt kacsá összetevő kimutatható-e a mintából. A mérés a várakozásoknak megfelelő eredményt hozott, azonban a konzervek és a kutyaekszek esetében a mért Ct érték magasabb volt, valószínűsíthetően a töredezett fragmensek miatt.

A genetikailag módosított növények azonosításával és mennyiségi analízisével a fajspecifikus húszonosításban is terjedni kezdtek a félkvantitatív és kvantitatív PCR módszerek, így a

- kvantitatív-kompetitív PCR (QC-PCR)
- real-time PCR (Q-PCR), kvantitatív analízise.

**Kvantitatív - kompetitív-PCR** analízis esetében 1 primerpár, valamint egy a sokszorozni kívánt szakasz ismertében tervezett, további DNS-szakasz az ún. versengő, belső standard hozzáadásával egy félkvantitatív rendszer állítható össze.



(Forrás: Wolf & Lüthy, 2001)

**15. ábra** 2 %-os detektálási szintre beállított kvantitatív-kompetitív PCR reakció sertéshús kimutatására

1. 100bp DNS létre; 2. 10% sertés; 3. 5% sertés; 4. 2% sertés; 5. 1% sertés; 6. 0,5% sertés 7. 8. sertés pozitív kontrol; 9. DNS mentes vak próba

A polimeráz láncreakcióban két eltérő méretű PCR-jel képződik. Az egyik a versengő DNS-szakaszból, a másik a minta DNS templátjából. Azon a ponton, ahol a mintában található komponens mennyisége közel azonos, a versengőből és a mintából kapott termék intenzitása megegyezik. Wolf és Lüthy (2001) kutatásuk során kidolgoztak egy olyan technikát, mellyel a sertéshús 2-20%-ban pontosan meghatározható volt egy hús-hús keverék összetétele (16. ábra).

**Real-time PCR (Q-PCR), kvantitatív analízisben** történő használata során leggyakrabban relatív mennyiségeket származtatnak, melyet az ismert standardból kapott vonatkoztatási és keresett gén küszöb ciklus értékének (Ct) különbsége alapján az ismeretlen minta Ct érték különbségéből számítanak. A kvantitatív analízishez azonban a minta összetételének és előállítási technológiájának megfelelő standard referencia anyagok, illetve ismert kópiaszámú, fajon belül kevésbé variálódó szekvenciára, mint vonatkoztatási génszakaszokra van szükség. A módszert Sawyer et al. (2003) eredményesen adaptálták marhahús mennyiségi kimutatására birkahús mellett (0,1%-100% nyershús keverékekben). Munkájuk során a viszonyítási alap egy univerzális, emlősökre specifikus primerpárral sokszorozott jel volt, ehhez hasonlították a marha-specifikus primerekkel kapott jeleket. Mindkét génszakasz mitokondriális eredetű volt, a detektáláshoz Scorpions primert és SYBR Green I festést alkalmaztak. A módszer a felhasznált modellrendszerben megfelelően működött, de a szerzők a későbbiekben szükségesnek tartották az összetöredezett DNS-tartalmú minták elemzését, valamint szövetekben és állatfajokban mitokondriális génkópiák eltérőségének vizsgálatát.

Brodmann et al. (2003) kutatócsoport marhahús kimutatására dolgoztak ki félkvantitatív, real-time PCR-rendszert, genomiális növekedési hormont kódoló génekre építve. Figyelembe véve a DNS-degradációt, egy 100 bp alatti mérettartományt választottak ki a mérésekhez. A teszt szelektivitási vizsgálatai során a marhahús-specifikus rendszer keresztreakciókat adott a Cerevidiae csoportba tartozó birka, őz, szarvas és jávorszarvas mintákkal. A módszer linearitása 0,2-100% tartományban DNS hígítási sort alkalmazva megfelelőnek bizonyult. A további vizsgálatokat néhány kereskedelemből származó mintán végezték el, ahol megállapították, hogy a nyers mintákhoz képest a módszer a detektálási határértéke 10-szer kisebb a konzervek és erősen feldolgozott termékek (zselatin) esetében. Az erősen hőkezelt élelmiszerek esetében javasolják új DNS-izolálási módszerek kidolgozását a módszer érzékenységének növelésére.

Rodriguez et al. (2005) kvantitatív PCR módszert fejlesztettek ki sertéshús mennyiségi mérésére marhahús mellett, TaqMan próba alkalmazásával, mitokondriális 12S riboszóma RNS-gének alapján. A módszer regressziós paramétereit, linearitását és érzékenységét vizsgálva a 0,5-5%-os tartományban nyers, sterilizált modellek és plazmidba integrált standard sort használtak és hasonlítottak össze. Mindhárom kalibráció megfelelőnek bizonyult azonban egymástól eltérő paraméterekkel rendelkeztek, így ez az eredmény is megerősíti azt a tényt, hogy az adott hústermék csak az adott technológiának megfelelően felépített kalibráló sor mellett kvantifikálható.

A DNS analitikai munkákkal foglalkozó irodalmak áttekintése azt mutatja, hogy a real-time PCR módszer az, melynek elterjedése várható DNS-alapú élelmiszer-analitikában a közeljövőben. A módszer mennyiségi és minőségi mérési feladatokra egyaránt alkalmas, ezért több helyen az elektroforézissel történő termék elválasztást is felválthatja az alap- és multiplex-PCR rendszerekben. Mennyiségi meghatározásokhoz azonban standard DNS-izolálási módszerek és referenciaanyagok fejlesztése szükséges, eltérő genom méretű fajok (emlősök, madarak, halak) és különböző gyártástechnológiával készült élelmiszerek esetében is. A DNS-összetétel extrakció alatti változása szintén kevésbé tanulmányozott folyamat, valamint az sem elhanyagolható, hogy jel bármely DNS tartalmú szövet (izom, zsír) esetében generálódik.

Az említett módszerek továbbfejlesztésével kidolgozhatóak, olyan szabványosítható analitikai eljárások, melyek segítségével ellenőrizhető az élelmiszerek összetétele. Az élelmiszerek jelölése törvényi szinten a 2003. évi LXXXII. élelmiszer törvényben, rendeleti szinten a 19/2004. (II.26); 90/2005. (X. 13.) és a 167/2004. (XI. 29.) FVM – ESZCSM – GKM együttes rendeletben, valamint a Magyar Élelmiszerkönyvben szabályozott, melynek részletes ismertetése az M2. mellékletben található.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Minták

A vizsgálatokat friss és fagyasztott húsokból, több komponensű modell mintákból és kereskedelemről származó, feldolgozott hústermékekből végeztem el.

A sertés és marha húsokat közvetlenül a vágóhídról, a csirke és pulyka húsokat kereskedelmi forgalomból szereztem be. A vadhúsok a Mavad Rt. Vecsési és az Öreglaki vadfeldolgozóból származtak, a muflon húst a Pilisi Parkerdő Gazdaság biztosította számomra.

- *Haszonállatok húsmintái:* sertés comb, marha felsál, csirkemell és pulykamell.
- *Vadhúsok fagyasztott mintái:* vaddisznó tarja, szarvas lapocka, őz comb, muflon comb.
- *Modellkeverék minták:* nyers hús-hús keverék minták; hőkezelt, vörösáru típusú többkomponensű modellek; sterilizált, összetett konzerv modellek sertéscomb-marhafelsál és sertéscomb - csirkemell keverékekből.
- *Kereskedelmi forgalomból származó hústermékek:* vörösáruk (párizsi, virsli), kenhető húskészítmények (májasok), húskonzervek (májkrémek, aprított jellegű húskonzervek).
- *Növényi-eredetű anyagok:* Supro szójafehérje izolátum, búzaliszt.

##### 3.1.1. Egy és több komponensű modell minták előállítása

Az alapanyagként használt sertés, marha és csirke húsokat íntól, zsírtól megtisztítottam, majd ledaráltam. A modellekben a keverési arányok 0,5-1-5-10-50-100% szerinti megoszlásban szerepelt vizsgálni kívánt fajra húsa.

##### 3.1.1.1. Nyers hús-hús keverékek előállítása

A darált húsokat 10% páclével (1,8% nitrites só, 0,2% tetra-nátrium-pirofoszfát, 8% víz) elkevertem, majd az emulzióval együtt konyhai aprítógéppel három percig homogenizáltam. A húsokat bemérés után konyhai aprítógéppel 4-szer 10 mp-ig kevertem, majd fóliába hegesztettem.



### **3.1.1.2. Hőkezelt, vörösárú típusú modellek (hús, sertésszalonna, szójafehérje) előállítása**

Mintaösszetétel. 30% húskeverék, 4% Supro 500E szójaizolátum, 24% sertésszalonna, 40% víz, 1,8% nitrites sókeverék, 0,2% tetra-nátrium-pirofoszfát tartalmú modell keveréket készítettem.

Minták előállítása. Szójaizolátum, szalonna és víz 1:6:6 arányú keverékéből emulziót készítettem. A darált húsokat 30 % páclével (1,8 % nitrites só, 0,2 % tetra-nátrium-pirofoszfát, 28% víz) elkevertem, majd az emulzióval együtt konyhai aprítógéppel három percig homogenizáltam. A mintákat 135 g-os konzervdobozba töltöttem, kézi zárógéppel zártam, majd 78 °C térhőmérsékleten 45 percig (72 °C maghőmérsékletig) hőkezelttem.

### **3.1.1.3. Sterilezett, konzerv modellek (hús, szójafehérje) előállítása**

Mintaösszetétel. 60% húskeverék; 3% Supro 500E szójaizolátum; 35% víz; 1,8% nitrites sókeverék; 0,2% tetra-nátrium-pirofoszfát tartalmú modell keveréket készítettem.

Minták előállítása. A szójaizolátum és víz 1:6 arányú keverékéből gélrt készítettem. A darált húsokat 20% páclével (1,8 % nitrites só, 0,2% tetra-nátrium-pirofoszfát, 18% víz) elkevertem, majd a gélrttel együtt konyhai aprítógéppel három percig homogenizáltam. A mintákat 135 g-os konzervdobozba töltöttem, kézi zárógéppel zártam, majd autoklávban 121 °C 50 percig (115 °C maghőmérsékletig) hőkezelttem.

## **3.2. Polimeráz láncreakción alapuló technika (PCR)**

A polimeráz láncreakció egy olyan enzimes, nagy érzékenységű *in vitro* módszer, mely lehetővé teszi ismert hosszúságú és szekvenciájú DNS sokszorozását, kis mennyiségű DNS-ről, mint templárról. A folyamat DNS polimeráz enzim segítségével, megfelelő puffer közegben megy végbe a beépíthető nukleotidok jelenlétében. A templát sokszorozásához ún. primerek szükségesek, melyek olyan rövid, általában 15-40 oligonukleotid hosszúságú egyszálú láncok, melyek a sokszorozni kívánt szakaszt szegélyezik és annak ismeretében szintetizálhatóak. A sokszorozást 25-40 ciklusban hajtjuk végre, majd a termékeket elektroforetikus elválasztást követő festéssel tehetjük láthatóvá.

### Oldatok és reagensek a DNS izoláláshoz:

*Wizard DNS izolálás vegyszerei:* Wizard puffer (10 mM TRIS-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % SDS); 5 M Guanidin-hidroklorid oldat; 20 mg ml<sup>-1</sup> proteináz-K enzim oldat; izopropil-alkohol

*CTAB DNS izolálás vegyszerei:* CTAB puffer (50 mM hexadecil-trimetil ammónium-bromid; 100 mM TRIS-HCl (pH 8.0), 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA); Kloroform; 70 %-os etil-alkohol

### Oldatok és reagensek a polimeráz láncreakcióhoz és a termékanalízishez:

*Polimeráz láncreakció reagensei:* PCR Ready-mix (2,5 U Taq DNS polimeráz 10 mM TRIS-HCl pufferben, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, Brij 35 detergens 0,005 %-ban, 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP és dTTP steril bideszt víz); steril víz

*Restrikciós enzimek:* Alu I (5' .. AG↓CT..3'); RsaI (5' ..GT↓AC ..3'); HinfI (5' ..G↓ANTC..3')

*Elektroforézis reagensek:* mintaoldó puffer (20 % szacharóz, 0,1 M Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,0, 1 % Na-dodecil szulfát, 0,25 % brómfenolkék); TRIS-Bórsav-EDTA elektroforézis puffer (TBE puffer), pH 8,0 10x törzsoldat (108 g TRIS, 55 g bórsav, 40 ml 0,5M Na<sub>2</sub>EDTA); 2%-os agarózgél oldat TBE pufferben DNS fragmensanalízishez; "Mini" gél oldat a PCR termékek analíziséhez (2,65 ml akrilamid-bisakrilamid (29:1) oldat, 1,0 ml TBE puffer, 10x törzsoldat, 6,36 ml desztillált víz, 8 µl TEMED, 80 µl 10%-os ammónium-perszulfát oldat); gélfestő oldat (1 µg/ml etidium-bromid desztillált vízben)

### **3.2.1. DNS izolálási módszerek**

Enzimes előkezelés. A mintát steril szikével felaprítottam és kb. 300 mg-ot steril 1,5 ml-es Eppendorf csőbe mértem. A bemért mintához 430 µl extraháló puffert, 50 µl 5 mólos guanidin-hidroklorid oldatot és 20 µl 20 mg/ml proteináz-K oldatot adtam, összeráztam, majd 55 °C-on, 3 órát termosztáltam. Az inkubálási idő letelte után a mintát 12400 fordulaton 10 percig centrifugáltam (AB2.14 típusú szögrotor Eppendorf csövekhez, Jouan BR4i centrifuga).

Mintakonzentrálás. A sterilizett minták koncentrálására 1,5 g mintából kiindulva végeztem a DNS izolálást, majd 2 ml felülúszóból Amicon Ultra 4 ml-es koncentrálóval (vágási érték 10000 Dalton  $\approx$  50 bp duplaszálú DNS) elősűrítést végeztem, kétszer 10 percig történő centrifugálással (R20 típusú kilendülő rotor 15 ml csövekhez, Jouan BR4i. centrifuga).

Az így bekoncentrált szűrletet a továbbiakban Wizard gyantával tisztítottam (Millipore Amicon Ultra 4, használati útmutató, 2003).

DNS tisztítás Wizard gyantával. Az enzimesen emésztett mintából 400  $\mu$ l felülúszót, DNS tisztító Wizard DNA Clean up kittel tisztítottam. A felülúszó mintákat 1 ml gyantával 1,5 ml-es, steril Eppendorf csőben összeráztam, majd fecskendő segítségével a mini szűrőoszlopon átnyomtam, így a DNS-t tartalmazó gyanta az oszlopban lévő szűrőn fennmaradt.



A gyantán ezután 2 ml, 80 %-s izopropanol oldatot nyomtam át, fecskendő segítségével, a gyanta gömböcskék tisztítására. A fennmaradt alkoholt centrifugálással távolítottam el. (12400 RPM, 2 perc, AB2.14 szögrotor, Jouan BR4i centrifuga).

A gyantáról a tisztított DNS-t 50  $\mu$ l 65 °C – 75 °C-s TE puffer rápipettázásával, majd centrifugálással nyertem ki (12400 RPM, 1 perc, AB2.14 szögrotor, Jouan BR4i centrifuga). Az izolált DNS oldatok tisztasági és koncentrációs adatait spektrofotometriás analízissel meghatároztam és felhasználásig -20 °C-on tároltam.

Egylépcsős CTAB technika. 500 mg húsmintát steril 2 ml-es centrifugacsőben 1 ml CTAB pufferrel, 20  $\mu$ l proteináz-K oldattal (20 mg ml<sup>-1</sup>), 60 °C-on, 2 órán át inkubáltam, majd centrifugáltam (12400 RPM, 5 perc, AB2.14 szögrotor, Jouan BR4i centrifuga). A felső fázishoz 20  $\mu$ l RNáz oldatot (10 mg ml<sup>-1</sup>) mértem, 60 °C-on, 5 percig inkubáltam, majd 600  $\mu$ l kloroformot adtam hozzá és 5 percig centrifugáltam (12400 RPM, AB2.14 szögrotor, Jouan BR4i centrifuga) a fehérjeszennyezés eltávolítására. A kapott felső fázis 625  $\mu$ l-hez 500  $\mu$ l izopropanolt adtam, szobahőmérsékleten, 30 percig állni hagytam, ezután a centrifugáltam (12400 RPM, 15 perc, AB2.14 szögrotor, Jouan BR4i centrifuga). A CTAB maradványok eltávolítására a DNS csapadékot tartalmazó csőbe 500  $\mu$ l 70 %-os etanolt adtam majd keverés után 10 percig centrifugáltam (12400 RPM, AB2.14 szögrotor, Juan BR4i centrifuga). Az etanolos oldatot leöntöttem, majd a kivált DNS-t 200  $\mu$ l steril desztillált vízben visszaoldottam, megkevertem és 60 °C-on, 10 percig melegítettem. Az esetlegesen vissza nem oldott részek eltávolítását centrifugálással oldottam meg (12400 RPM, 5 perc, AB2.14 szögrotor, Jouan BR4i centrifuga).

### **3.2.2. A tisztított DNS oldat jellemzése:**

A tiszta DNS oldat jellemzésére spektrofotometriás mérést és agaróz gél-elektroforézist végeztem. A spektrofotometriás méréssel megállapítható az oldat koncentrációja és tisztasága. Amennyiben a minta 260 nm hullámhosszon mért abszorbancia értéke 1,0, az megfeleltethető 50 µg/ml koncentrációjú, duplaszálú DNS oldatának.

Az oldat tisztaságát a 260 nm-en és 280 nm-en mért abszorbancia hányados adja. Ez akkor megfelelő, ha a hányados értéke 1,7-2,0 között van. 1,7 alatti értéknél az oldat fehérjével, 2,0 felettinél pedig a mintaoldat RNS-sel szennyezettnek tekinthető.

A DNS fragmensnagyság változását a különböző modellekben és feldolgozott élelmiszerekben 2 %-s agaróz-gélelektroforézissel követtem nyomon. Az elektroforézist Maniatis et al. (1989) szerint végeztem 120x80x5 mm x géllapon, 100 V állandó feszültség mellett, 45 percig, 12 µl DNS oldat/zseb mintafelvitellel, 1xTBE pufferben LKB Midget Electrophoresis Unit készülékkel. A géleket etidium-bromid oldattal (1µg/ ml) festettem, majd KODAK EDAS 290 rendszerrel detektáltam.

### **3.2.3. DNS sokszorozás**

Kutatási munkám során a polimeráz láncreakció két típusát, az egyszerű-PCR-t és a restrikciós fragmenthossz polimorfizmus detektálásán alapuló PCR-RFLP rendszert alkalmaztam. Az egyszerű-PCR rendszerben csak az adott állatfaj jelenlétének esetében kapunk jelet. Ezzel ellentétben a PCR-RFLP módszer alkalmazása során több fajból is sokszorozódik jel, mely ezután az adott DNS szekvencia helyeken hasító ún. restrikciós enzimek felhasználásával egy faj-specifikus mintázatot ad.

A primereket az irodalomban ismertett szekvencia információk alapján szintetizáltattam. A kiválasztás során figyelembe vettem, hogy a hőkezelés 400 bp alá csökkentheti az átlagos DNS méretet. A szekvenciákat és a vonatkozó referenciákat a 1. táblázatban soroltam fel.

**1. táblázat** A különböző polimeráz láncreakciók során alkalmazott primerpár szekvenciák összefoglalása

| Primer jelölése | Primer szekvenciája                        | Referencia              | Célgének                                             |
|-----------------|--------------------------------------------|-------------------------|------------------------------------------------------|
| SW01            | 5'-TCAGTTTACACTCACCTGATAGCATCT-3'          | Meyer et al., 1994      | 108 bp hosszú sertés-spec. sejtmag DNS szakasz       |
| SW02            | 5'-GGGTGGTGGAGAGGGGTGAATT-3'               |                         |                                                      |
| CA03            | 5'-CTC CCG AGG GAT GCG TCC TAG G-3'        | Meyer et al., 1995      | 130 bp hosszú marha-spec. sejtmag DNS szakasz        |
| CA04            | 5'-TTC TGC TCC CCT AAC CAC ATC CC-3'       |                         |                                                      |
| Cytb1           | 5'- CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-3'  | Meyer et al., 1995      | 359 bp hosszú állat-spec. mitokondriális DNS szakasz |
| Cytb2           | 5'- GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA-3'  |                         |                                                      |
| Scytb1          | 5'-TAT TCC TAG CCA TGC ACT ACA CA-3'       | Branciarri et al., 2000 | 175 bp hosszú állat-spec. mitokondriális DNS szakasz |
| Scytb2          | 5'-TAT GAT CCG TAA TAT AGG CCT CG-3'       |                         |                                                      |
| RD1             | 5'- TCA TCG CAG CAC TCG CTA TAG TAC ACT-3' | Matsugana et al., 1998  | 194 bp hosszú vad-spec. mitokondriális DNS szakasz   |
| RD2             | 5'- ATC TCC AAG TAG GTC TGG TGC GAA TAA-3' |                         |                                                      |

Haszonállatok vizsgálatának esetén a sokszorozódó DNS fragmens a sertés-specifikus kimutatás során a genomiális, sertés növekedési hormont kódoló gén 108 bázispár hosszúságú szakasza (SW01/SW02 primerpár), míg marha-specifikus meghatározásoknál a marha növekedési hormont kódoló gén 130 bázispár hosszú szakasza (CA03/CA04 primerpár). A csirke-eredetű összetevők meghatározása egy a citokróm b fehérjét kódoló mitokondriális gén 359 bp-os szakaszának PCR-RFLP (Cytb1/Cytb2 primerpár, RsaI enzim) detektálásán alapul. A vadhúsok haszonállat húsmintáktól való elkülönítését a citokróm b fehérjét meghatározó, mitokondriális-eredetű gén egyszerű PCR (RD1/RD2 primerpár; 194 bp-os termék), valamint 359 és 175 bp-os, szakaszainak AluI és HinfI enzimekkel végzett PCR-RFLP módszereit használtam fel.

A DNS sokszorozást 50 µl végtérfogatban, vékony falú PCR csövekben végeztem el PDR-91 készülékben, 250 ng templát DNS bevitele mellett. Negatív kontrollként DNS-t nem tartalmazó vak próbát alkalmaztam. Az élelmiszervizsgálatok esetében pozitív kontrollként az adott vizsgálatnak megfelelő húsból izolált DNS oldatot használtam.

A reakciót minden esetben forró indítással (94 °C, 3 perc) kezdtem, mellyel csökkenthető a nem specifikus termékek képződése. A további ciklusparaméterek adatait az 2. táblázatban foglaltam össze. A láncreakciót minden esetben hűtéssel állítottam le (4 °C).

**2. táblázat** A kísérletekhez alkalmazott polimeráz láncreakciók hőmérsékletprofiljának lefutása

| Azonosítandó szakasz                                      | A kettős szálú DNS szétválása           | Primer kapcsolódás | DNS sokszorozás | Extenziós szakasz | Ciklusszám |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------|-----------------|-------------------|------------|
| 108 bp hosszú sertés-specifikus sejtmag DNS szakasz       | 94 °C, 3 perc-hot start + 94 °C, 5 mp.  | 60 °C, 30 mp.      | 72 °C, 40 mp.   | 72 °C, 3 perc     | 35         |
| 130 bp hosszú marha-specifikus sejtmag DNS szakasz        | 94 °C, 3 perc-hot start + 94 °C, 5 mp.  | 64 °C, 30 mp.      | 72 °C, 40 mp.   | 72 °C, 3 perc     | 35         |
| 359 bp hosszú állat-specifikus mitokondriális DNS szakasz | 94 °C, 3 perc-hot start + 94 °C, 5 mp.  | 50/52 °C, 30 mp.   | 72 °C, 40 mp.   | 72 °C, 3 perc     | 35         |
| 194 bp hosszú vad-specifikus mitokondriális DNS szakasz   | 94 °C, 3 perc-hot start + 92 °C, 1 perc | 62 °C, 30 mp       | 72 °C, 30 mp.   | 72 °C, 2 perc     | 30         |
| 175 bp hosszú állat-specifikus mitokondriális DNS szakasz | 94 °C, 3 perc-hot start + 92 °C, 1 perc | 50 °C, 1 perc      | 72 °C, 1 perc   | 72 °C, 2 perc     | 30         |

A sterilizett minták vizsgálatánál a reakció érzékenységének növelésére megnöveltem a bevitt DNS mennyiségét 500 ng-ra, a ciklusszámot 30-ról 35-re és 35-38-ra.

#### **3.2.4. Termékanalízis**

A mitokondriális DNS kimutatáson alapuló mérőrendszereket használtam fel a PCR-RFLP reakciókhoz. Ezesetben 8 µl PCR terméket 10 U restrikciós enzimmel hasítottam 37 °C - on, két órát termosztálva. A termékanalízist 8- és 10%-s, 150x80x1 mm mini gélben végeztem el. A mintákat mintaoldó pufferrel 5:1 arányban hígítottam, majd zsebenként 10-10 µl-t vittem fel a gélre. Az elektroforézist 200 V állandó feszültségen, 1 órán át LKB Midget Electrophoresis Unit készülékkel végeztem. A futtatás után a gél az üveglapról leválasztottam és 15 percig etidium-bromiddal (1µg/ ml) festettem, majd 15 percig desztillált vízzel differenciáltam. A gél UV transzilluminátor alatt vizsgáltam, majd KODAK EDAS 290 rendszerrel fotóztam és értékeltem.

## 4. KUTATÁSI EREDMÉNYEK

### 4.1. Marha, sertés és csirke-eredetű komponensek kimutatása modellekben

#### 4.1.1. Friss, vörösáru és konzerv típusú modellkeverékek DNS izolálási eredményei

A kutatás során, elsőként friss húsminták DNS izolálását végeztem el, a CTAB és Wizard extrakciós technikák vizsgálatához. A CTAB módszer a cetil-trimetil-ammónium-bromid DNS kötésén alapul. A módszer alkalmazása során kloroformos tisztítást követően, alkoholos kicsapással nyerhető ki a minta DNS tartalma. Wizard módszernél az enzimesen feltárt mintát egy DNS kötő gyantán eresztjük át, melyről a DNS-t meleg pufferrel lehet lemosni.

#### 3. táblázat DNS tisztítási technikák összehasonlítása friss húsokból

| Minta        | Wizard tisztítás<br>n=4                      |                                    | CTAB tisztítás<br>n=4                        |                                    |
|--------------|----------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------|
|              | DNS mennyisége,<br>μg/100 mg,<br>nyers minta | R érték<br>(A <sub>260/280</sub> ) | DNS mennyisége,<br>μg/100 mg,<br>nyers minta | R érték<br>(A <sub>260/280</sub> ) |
| Marha felsál | 9,25±0,35                                    | 1,80±0,03                          | 4,80±0,51                                    | 1,44±0,06                          |
| Sertés comb  | 8,17±0,05                                    | 1,77±0,03                          | 3,98±0,53                                    | 1,53±0,12                          |
| Csirkemell   | 9,78±0,87                                    | 1,80±0,03                          | 4,53±0,68                                    | 1,50±0,09                          |
| Pulykamell   | 7,18±0,21                                    | 1,79±0,02                          | 11,34±1,12                                   | 1,68±0,08                          |

A két módszer összehasonlítása során a DNS oldat tisztaságában és koncentrációjában, valamint a mintakezelés összetettségében is adódtak különbségek (3. táblázat). A Wizard izolálással minden esetben elértem a szükséges DNS tisztasági fokot ( $R > 1,7$ ), 7-9 μg/ 100 mg minta kinyerhető DNS tartalom mellett. A CTAB módszer alkalmazása során azt tapasztaltam, hogy a DNS tisztasága nem érte el a szükséges mértéket ( $R < 1,7$ ). Emellett a CTAB nyomok eltávolítására alkalmazott 70%-s etanolos mosás után oldhatatlan csapadék is visszamarad az oldatban, melynek eltávolítása csak újabb centrifugálással volt megoldható. A módszer költsége ugyan kevesebb, de a mintakezelés nehézségei miatt a továbbiakban a Wizard módszer alkalmazása mellett döntöttem.

A következőkben ezeket a mintákat használtam fel a láncreakcióhoz felhasznált primerpárok specificitásának vizsgálatára.



A nyers, egyedi minták elemzése után modell keverékeket készítettem sertés-marha és sertés-csirke összetételben páclé hozzáadásával, majd elvégeztem ezeknek a mintáknak a DNS extrahálását. Az izolált minták tisztaságára és mennyiségére vonatkozó értékeket a 4-6. táblázatban foglaltam össze. A minták tisztasága minden esetben elérte a PCR vizsgálatokhoz szükséges 1,7 értéket. A kinyerhető DNS mennyisége jelentős eltérést nem mutatott a nyers szín mintákhoz képest, értékük a 19-24 µg DNS/ 300 mg minta tartományba esett.

**4. táblázat** Nyers marha felsál -páclé modellkeverékekből izolálható DNS oldatok jellemzői (marha felsál - sertés comb)

| <b>Hústartalom<br/>Összetétele</b> | <b>Wizard tisztítás<br/>n=4</b>                        |                                    |
|------------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------|
|                                    | A mintából kinyerhető<br>DNS mennyisége,<br>µg/ 300 mg | R érték<br>(A <sub>260/280</sub> ) |
| 100 % marhahús - 0 % sertéshús     | 24,86±1,71                                             | 1,81±0,04                          |
| 50 % marhahús - 50 % sertéshús     | 21,43±0,93                                             | 1,79±0,01                          |
| 10 % marhahús - 90 % sertéshús     | 23,36±0,25                                             | 1,80±0,02                          |
| 5 % marhahús - 95 % sertéshús      | 22,07±0,89                                             | 1,79±0,02                          |
| 1 % marhahús - 99 % sertéshús      | 19,39±2,25                                             | 1,77±0,02                          |
| 0,5 % marhahús - 99,5 % sertéshús  | 23,14±2,57                                             | 1,78±0,03                          |

**5. táblázat** Nyers sertés comb-páclé modellkeverékekből izolálható DNS oldatok jellemzői (sertés comb - marha felsál)

| <b>Hústartalom<br/>Összetétele</b> | <b>Wizard tisztítás<br/>n=4</b>                        |                                    |
|------------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------|
|                                    | A mintából kinyerhető<br>DNS mennyisége,<br>µg/ 300 mg | R érték<br>(A <sub>260/280</sub> ) |
| 100 % sertéshús - 0 % marhahús     | 19,43±0,57                                             | 1,82±0,03                          |
| 50 % sertéshús - 50 % marhahús     | 21,43±0,93                                             | 1,79±0,01                          |
| 10 % sertéshús - 90 % marhahús     | 20,66±1,86                                             | 1,83±0,03                          |
| 5 % sertéshús - 95 % marhahús      | 24,18±0,89                                             | 1,86±0,04                          |
| 1 % sertéshús - 99 % marhahús      | 19,61±1,54                                             | 1,78±0,02                          |
| 0,5 % sertéshús - 99,5 % marhahús  | 20,50±1,86                                             | 1,81±0,01                          |

**6. táblázat** Nyers csirkehús-páclé modellkeverékekből izolálható DNS oldatok jellemzői (csirke mell - sertés comb )

| <b>Hústartalom<br/>Összetétele</b> | <b>Wizard tisztítás<br/>n=4</b>                        |                                    |
|------------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------|
|                                    | A mintából kinyerhető<br>DNS mennyisége,<br>µg/ 300 mg | R érték<br>(A <sub>260/280</sub> ) |
| 100 % csirkehús - 0 % sertéshús    | 22,36±1,65                                             | 1,71±0,01                          |
| 50 % csirkehús - 50 % sertéshús    | 23,14±2,30                                             | 1,86±0,02                          |
| 10 % csirkehús - 90 % sertéshús    | 19,52±0,72                                             | 1,84±0,04                          |
| 5 % csirkehús - 95 % sertéshús     | 19,93±1,11                                             | 1,82±0,03                          |
| 1 % csirkehús - 99 % sertéshús     | 22,71±0,45                                             | 1,79±0,01                          |
| 0,5 % csirkehús - 99,5 % sertéshús | 20,43±0,25                                             | 1,78±0,03                          |

A szakirodalmi hivatkozásokban a láncreakció kimutatási határértékének meghatározására sertéshús-marhahús modellkeverékeket használnak (Meyer et al., 1994; Wolf & Lüthy, 2000; Dooly et al., 2004). Ez azonban nem fedi le azt az összetett rendszert, melyet egy hústermék képvisel. A termék tartósítási módja (hőkezelés, érlelés, szárítás) mellett, a szalonna, páccsók, növényi eredetű DNS hordozók (pl. szójaizolátum, búzaliszt), stb. befolyásolják a kinyerhető teljes DNS tartalmat. Ennek ismeretében két jellemző hőkezelési eljárással tartósított modellrendszert állítottam össze. Az egyik, a vörösárukat jellemző húspéppel, hozzáadott szalonnával, páccsóval és szójafehérje izolátummal készített, 78 °C-on hőkezelt termék. A másik, egy szintén húst valamint szójafehérje izolátumot és vizet tartalmazó konzerv típusú készítmény, melyet 121 °C-on hőkezelttem.

A vörösáru modellminták DNS kinyerési eredményeit a 7-9. táblázatban foglaltam össze, keveréktípusonként csoportosítva. Mint, az előzetesen várható volt, a hőkezelés és a hústartalom csökkenése, valamint a modell komplex összetétele által nehezített kinyerés (mátrix effektus) együttesen lecsökkentették a minta kinyerhető összes DNS tartalmát.

**7. táblázat** Vörösáru típusú, összetett modellkeverékekből izolálható DNS oldatok jellemzői (marha felsál- sertés comb)

| <b>Húsösszetétel megoszlása a<br/>30 % összhús tartalom belül</b> | <b>Wizard tisztítás<br/>n=4</b>                           |                                    |
|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------|
|                                                                   | A mintából<br>kinyerhető DNS<br>mennyisége,<br>µg/ 300 mg | R érték<br>(A <sub>260/280</sub> ) |
| 100 % marhahús - 0% sertéshús                                     | 13,95±0,65                                                | 1,74±0,02                          |
| 50 % marhahús - 50 % sertéshús                                    | 15,20±1,70                                                | 1,78±0,05                          |
| 10 % marhahús - 90 % sertéshús                                    | 14,95±0,25                                                | 1,79±0,02                          |
| 5 % marhahús - 95 % sertéshús                                     | 13,85±0,65                                                | 1,77±0,02                          |
| 1 % marhahús - 99 % sertéshús                                     | 15,70±3,20                                                | 1,76±0,01                          |
| 0,5 % marhahús - 99,5 % sertéshús                                 | 17,35±1,05                                                | 1,78±0,03                          |

**8. táblázat** Vörösáru típusú, összetett modellkeverékekből izolálható DNS oldatok jellemzői (sertés comb - marha felsál keverék)

| <b>Húsösszetétel megoszlása a<br/>30 %-s összhús tartalom belül</b> | <b>Wizard tisztítás<br/>n=4</b>                           |                                    |
|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------|
|                                                                     | A mintából<br>kinyerhető DNS<br>mennyisége,<br>µg/ 300 mg | R érték<br>(A <sub>260/280</sub> ) |
| 100 % sertéshús - 0 % marhahús                                      | 12,70± 2,5                                                | 1,81±0,03                          |
| 50 % sertéshús - 50 % marhahús                                      | 15,20±1,70                                                | 1,78±0,05                          |
| 10 % sertéshús - 90 % marhahús                                      | 15,85±1,35                                                | 1,73±0,01                          |
| 5 % sertéshús - 95 % marhahús                                       | 17,20±2,20                                                | 1,78±0,03                          |
| 1 % sertéshús - 99 % marhahús                                       | 18,20±0,90                                                | 1,76±0,01                          |
| 0,5 % sertéshús - 99,5 % marhahús                                   | 18,15±0,65                                                | 1,77±0,03                          |

**9. táblázat** Vörösáru típusú, modellkeverékekből izolálható DNS oldatok jellemzői (csirke mell - sertés comb )

| <b>Húsösszetétel megoszlása a 30 %-s összhús tartalomon belül</b> | <b>Wizard tisztítás</b><br>n=4                                    |                           |
|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|---------------------------|
|                                                                   | A mintából kinyerhető DNS mennyisége, $\mu\text{g}/300\text{ mg}$ | R érték ( $A_{260/280}$ ) |
| 100 % csirkehús - 0% sertéshús                                    | 21,35 $\pm$ 0,35                                                  | 1,79 $\pm$ 0,01           |
| 50 % csirkehús - 50 % sertéshús                                   | 19,64 $\pm$ 1,28                                                  | 1,76 $\pm$ 0,04           |
| 10 % csirkehús - 90 % sertéshús                                   | 14,05 $\pm$ 0,05                                                  | 1,71 $\pm$ 0,01           |
| 5 % csirkehús - 95 % sertéshús                                    | 16,00 $\pm$ 2,20                                                  | 1,73 $\pm$ 0,01           |
| 1 % csirkehús - 99 % sertéshús                                    | 15,05 $\pm$ 1,65                                                  | 1,74 $\pm$ 0,02           |
| 0,5 % csirkehús - 99,5 % sertéshús                                | 16,30 $\pm$ 1,20                                                  | 1,79 $\pm$ 0,01           |

A hőkezelt csirkehús mintákból 14-21  $\mu\text{g}$  DNS-t izoláltam mintánként. A párhuzamos minták közötti eltérés nem haladta meg a 15%-ot, a tisztaságra vonatkozó eltérés az 5 %-ot és minden minta elérte a szükséges 1,7-es R értéket.

A hőkezelt minták után a sterilizett minták elemzését végeztem el. Mivel az alapként 300 mg mintából indított DNS kinyerés alacsony koncentrációt eredményezett, egy nagyobb mintamennyiségből is elvégeztem az izolálást, 50 bp vágási értékű Amicon ultra szűrővel történt bekonzentrálással (10-12. táblázat).

**10. táblázat** Sterilizett konzerv modell mintasorozat DNS izolálásának eredményei  
(sertés comb - marha felsál keverék)

| <b>Húsösszetétel<br/>megoszlása a<br/>60 % összhús<br/>tartalom belül</b> | <b>Wizard tisztítás<br/>n=4</b>                          |                                    | <b>Wizard tisztítás<br/>bekoncentrállás után<br/>n=4</b>   |                                    |
|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------|
|                                                                           | A mintából<br>kinyerhető DNS<br>mennyisége,<br>µg/ 300mg | R érték<br>(A <sub>260/280</sub> ) | A mintából<br>kinyerhető DNS<br>mennyisége,<br>µg/ 1500 mg | R érték<br>(A <sub>260/280</sub> ) |
| 100 % sertéshús –<br>0 % marhahús                                         | 9,80± 1,30                                               | 1,88±0,02                          | 30,10±3,98                                                 | 1,82±0,01                          |
| 50 % sertéshús –<br>50 % marhahús                                         | 10,70± 2,5                                               | 1,78±0,03                          | 23,05±2,67                                                 | 1,77±0,05                          |
| 10 % sertéshús –<br>90 % marhahús                                         | 6,30±2,22                                                | 1,68±0,04                          | 21,70±1,95                                                 | 1,82±0,02                          |
| 5 % sertéshús –<br>95 % marhahús                                          | 6,70±1,15                                                | 1,76±0,02                          | 17,80±1,40                                                 | 1,71±0,02                          |
| 1 % sertéshús -<br>99 % marhahús                                          | 6,90± 1,95                                               | 1,68±0,03                          | 29,80±3,05                                                 | 1,77±0,03                          |
| 0,5 % sertéshús -<br>99,5 % marhahús                                      | 6,80± 1,50                                               | 1,62±0,05                          | 25,60±1,40                                                 | 1,77±0,02                          |

**11. táblázat** Sterilizett konzerv modell mintasorozat DNS izolálásának eredményei  
(marha felsál-sertés comb keverék)

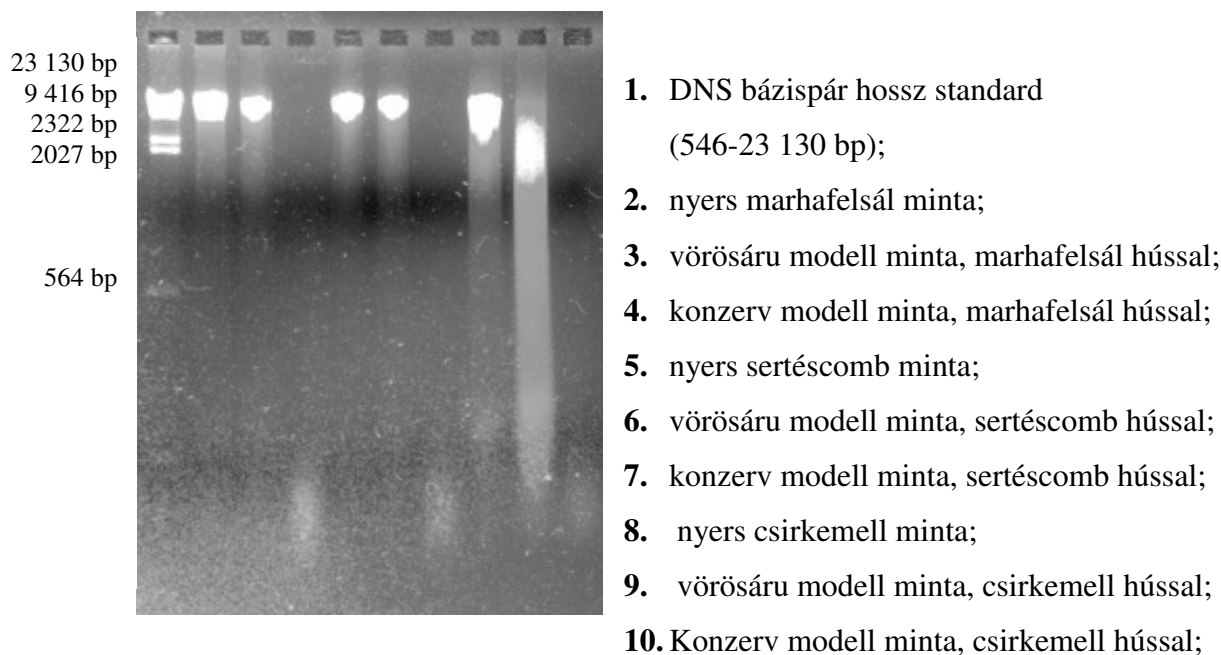
| <b>Húsösszetétel<br/>megoszlása a<br/>60 % összhús<br/>tartalom belül</b> | <b>Wizard tisztítás<br/>n=4</b>                           |                                    | <b>Wizard tisztítás<br/>bekoncentrállás után<br/>n=4</b>   |                                    |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------|
|                                                                           | A mintából<br>kinyerhető DNS<br>mennyisége,<br>µg/ 300 mg | R érték<br>(A <sub>260/280</sub> ) | A mintából<br>kinyerhető DNS<br>mennyisége,<br>µg/ 1500 mg | R érték<br>(A <sub>260/280</sub> ) |
| 100 % marhahús -<br>0% sertéshús                                          | 9,90± 1,82                                                | 1,62±0,06                          | 29,10±3,05                                                 | 1,83±0,02                          |
| 50 % marhahús –<br>50 % sertéshús                                         | 10,70±1,69                                                | 1,78±0,04                          | 23,50± 3,91                                                | 1,77±0,06                          |
| 10 % marhahús -<br>90 % sertéshús                                         | 9,70±2,10                                                 | 1,73±0,03                          | 32,19± 3,5                                                 | 1,82±0,01                          |
| 5 % marhahús –<br>95 % sertéshús                                          | 7,90±1,75                                                 | 1,84±0,01                          | 31,67±2,83                                                 | 1,82±0,05                          |
| 1 % marhahús –<br>99 % sertéshús                                          | 8,00± 2,45                                                | 1,63±0,05                          | 37,40±3,42                                                 | 1,82±0,02                          |
| 0,5 % marhahús -<br>99,5 % sertéshús                                      | 9,50±1,32                                                 | 1,79±0,02                          | 27,50±1,95                                                 | 1,83±0,01                          |

**12. táblázat** Sterilizett konzerv modell mintasorozat DNS izolálásának eredményei  
(csirke mell - sertés comb keverék)

| <b>Húsösszetétel<br/>megoszlása a<br/>60 %-s összhús<br/>tartalom belül</b> | <b>Wizard tisztítás<br/>n=4</b>                           |                                    | <b>Wizard tisztítás<br/>bekoncentráálás után<br/>n=4</b>   |                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------|
|                                                                             | A mintából<br>kinyerhető DNS<br>mennyisége,<br>µg/ 300 mg | R érték<br>(A <sub>260/280</sub> ) | A mintából<br>kinyerhető DNS<br>mennyisége,<br>µg/ 1500 mg | R érték<br>(A <sub>260/280</sub> ) |
| 100 % csirkehús -<br>0% sertéshús                                           | 11,30± 2,21                                               | 1,66±0,06                          | 28,20±3,16                                                 | 1,74±0,07                          |
| 50 % csirkehús -<br>50 % sertéshús                                          | 7,70±1,65                                                 | 1,57±0,04                          | 23,60±1,85                                                 | 1,79±0,06                          |
| 10 % csirkehús -<br>90 % sertéshús                                          | 7,90±1,32                                                 | 1,62±0,05                          | 25,10±2,72                                                 | 1,78±0,01                          |
| 5 % csirkehús -<br>95 % sertéshús                                           | 10,30±1,87                                                | 1,72±0,03                          | 27,60±3,53                                                 | 1,75±0,07                          |
| 1 % csirkehús -<br>99 % sertéshús                                           | 9,30±1,21                                                 | 1,69±0,04                          | 21,60±2,36                                                 | 1,71±0,02                          |
| 0,5 % csirkehús -<br>99,5 % sertéshús                                       | 10,30±2,65                                                | 1,59±0,03                          | 37,00± 4,20                                                | 1,85±0,03                          |

A minta kinyert DNS mennyisége fajlagosan nem lett ötször nagyobb, viszont a koncentráció további lépések nélkül megháromszorozódott. Ennek oka lehet egyrészt a Wizard gyanta kapacitásának telítése, másrészt viszont az erősen összetört 50 bp alatti mérettartományú fragmentek Amicon Ultra szűrőn való eltávozása.

A spektrofotometriás analízis mellett a DNS hőkezelés okozta degradációját is megvizsgáltam. A 16. ábrán látható a nyers és hőkezelt minták DNS mintázata jelentősen nem különbözik egymástól, az átlagos DNS méret 10-23 kilobázispár. Ezzel szemben a sterilizált konzerv mintákból izolálható DNS mérete igen alacsony < 500 bp és kis koncentrációjú az előző mintákhoz képest, mely előzetes irodalmi adatok alapján is várható volt (Ebbehøj & Thomsen, 1991). Ezután, a Wizard technikával izolált mintákat továbbvittem a polimeráz láncreakciókba.

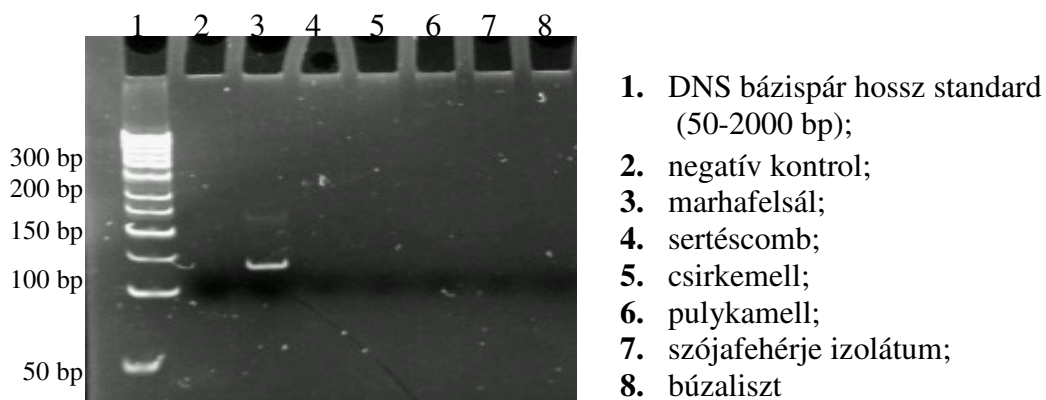


**16. ábra** Nyers húsból, valamint vörösfalu és konzerv típusú modellkeverékekből tisztított DNS minták elválasztása 2 %-os agaróz gélben

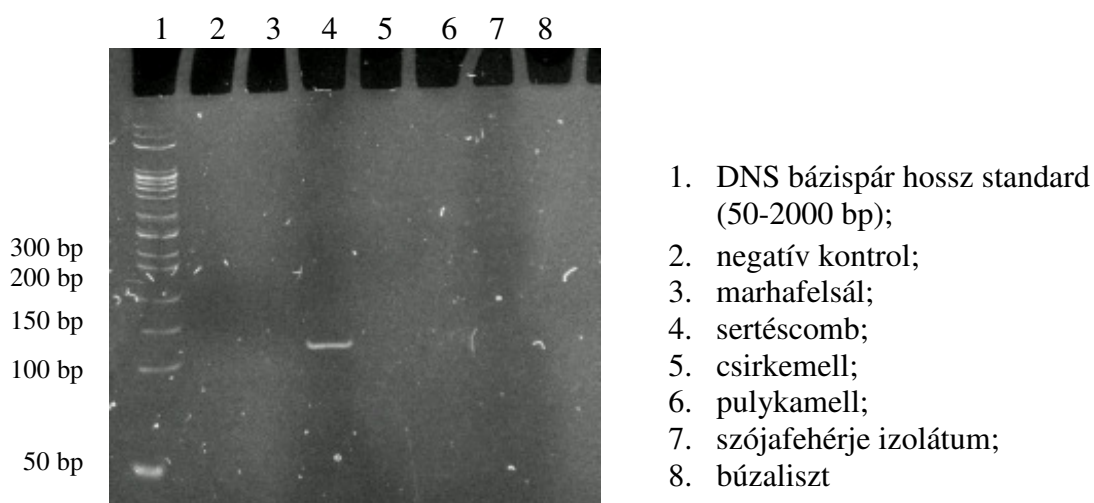
#### 4.1.2. Primer-specifititás vizsgálatok

A láncreakció beállítása során, elsőként meghatároztam a haszonállat fajok vizsgálatában alkalmazott három primerpár (Ca03-Ca04; Sw01-Sw02 és Cytb1-Cytb2) specifitását. Marhahús kimutatására a növekedési hormont kódoló gén 130 bp szakaszát sokszoroztam Ca03-Ca04 primerpárral, sertéshús kimutatására szintén a növekedési hormont kódoló gén 108 bp hosszú szakaszát amplifikáltam SW01-SW02 primerpárok alkalmazásával. A Cytb1-Cytb2 primerekre és a polimeráz láncreakciót követő RsaI enzimes hasításra alapoztam a csirkehús kimutatását.

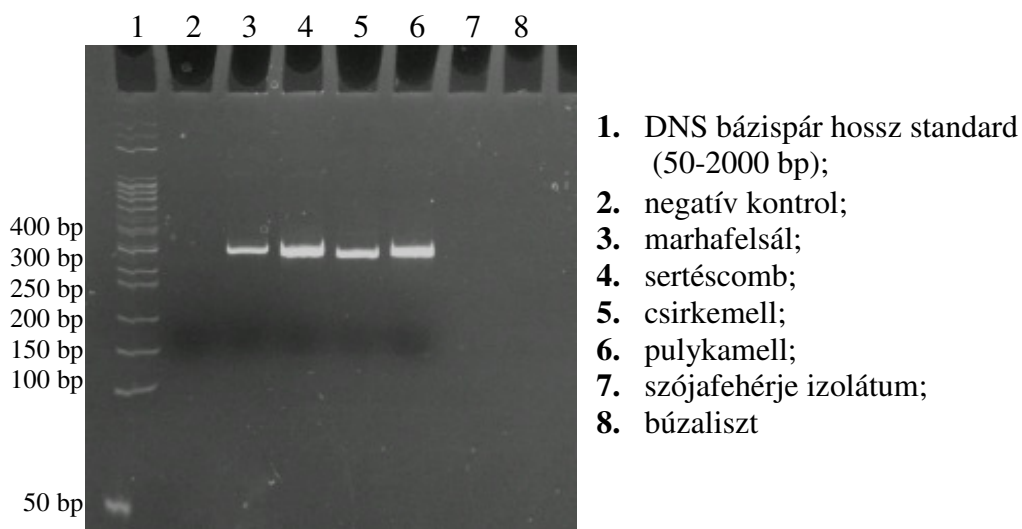
A vizsgálatokhoz 100 ng DNS/ 50µl reakcióelegy koncentrációjú nyers húsból izolált DNS mintát használtam fel. A láncreakciók során megállapítható volt, hogy a Ca03-04 primerpár marha-specifikusan (17. ábra), míg az Sw01-Sw02 primerpár sertés-specifikusan sokszoroz a nyers minták DNS oldataiból (18. ábra). A többi állatfaj esetében nem kaptam jelet sem a sertés-, sem pedig a marha-specifikus reakcióban.



**17. ábra** Nyers húsmintákból származó marha-specifikus PCR termék (Ca03-Ca04) elektroforetogramja



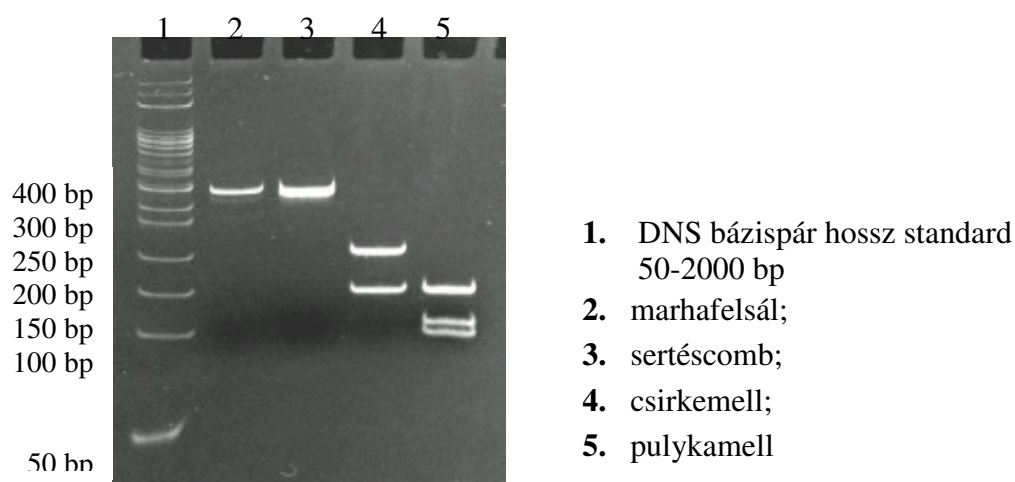
**18. ábra** Nyers húsmintákból származó sertés-specifikus PCR termék (SW01-SW02) elektroforetogramja



**19. ábra** Nyers húsminták elektroforetogramja a mitokondriális génre épített PCR reakció (Cytb1-Cytb2) után

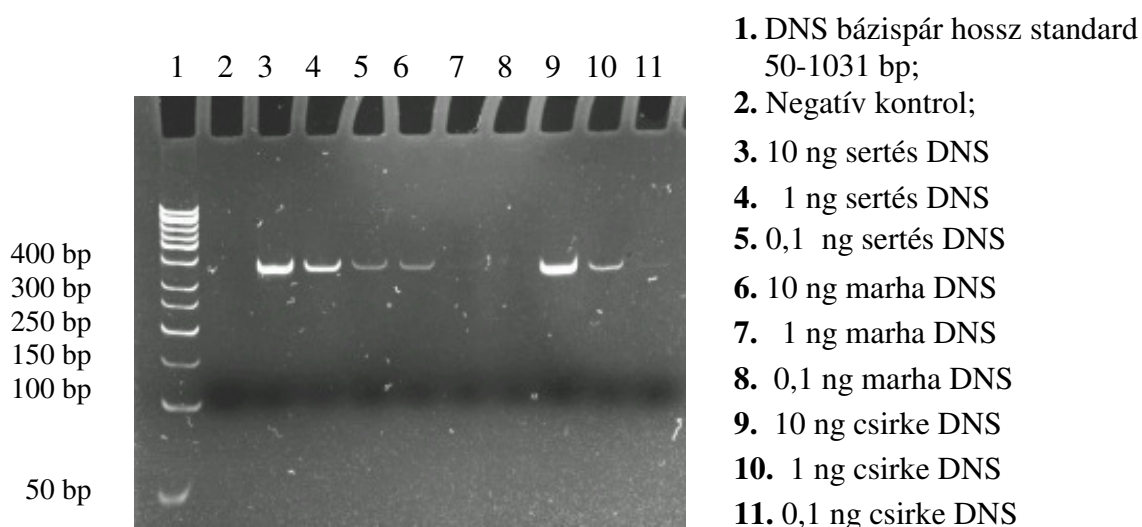


A különböző húsminta-DNS-ből elvégezve a citokróm b fehérjét kódoló, mitokondriális génre specifikus PCR-t, minden vizsgált haszonállat faj esetében egy-egy 359 bp hosszú termék képződik (19. ábra). A csirke kimutatására a reakció egy restrikciós enzimes hasítást követően szintén specifikussá tehető. A PCR terméket RsaI enzimmal hasítva csak a baromfihús mintáknál képződnek kisebb méretű DNS darabok (20. ábra). A csirke DNS PCR termékének hasítása során két fragmens keletkezett, melyek 210 és 149 bázispár hosszúságúak. A pulyka esetében az alacsonyabb bázispár régióban három, 149, 109 és 101 bázispár méretű fragmens keletkezett. Ennek a hasítási képnek az alapján a baromfihús fajták a sertés és marha húsmintáktól jól elkülöníthetőek.



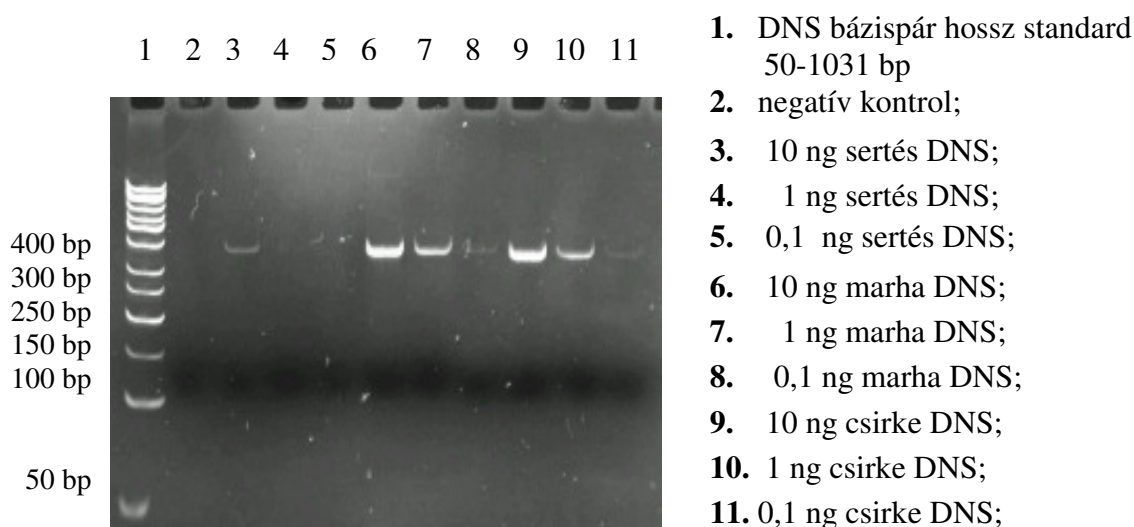
**20. ábra** Nyers marha, sertés és baromfi DNS minták PCR-RFLP elektroforetogramja (Cytb1-Cytb2, RsaI enzim)

A későbbiekben a keverékekben kimutatni kívánt, mindhárom állatfajból (marha, sertés, csirke) kapott termék azonos primerpár felhasználásával sokszorozódik, ezért egy primerkapcsolódási sorvizsgálatot is végeztem a csirke DNS sokszorozódásának kiemelésére.



**21. ábra** Nyers marha, sertés és baromfi DNS hígítási sorának PCR elektroforetogramja (Cytb1-Cytb2), 50 °C-os primerkapcsolódási hőmérséklet mellett

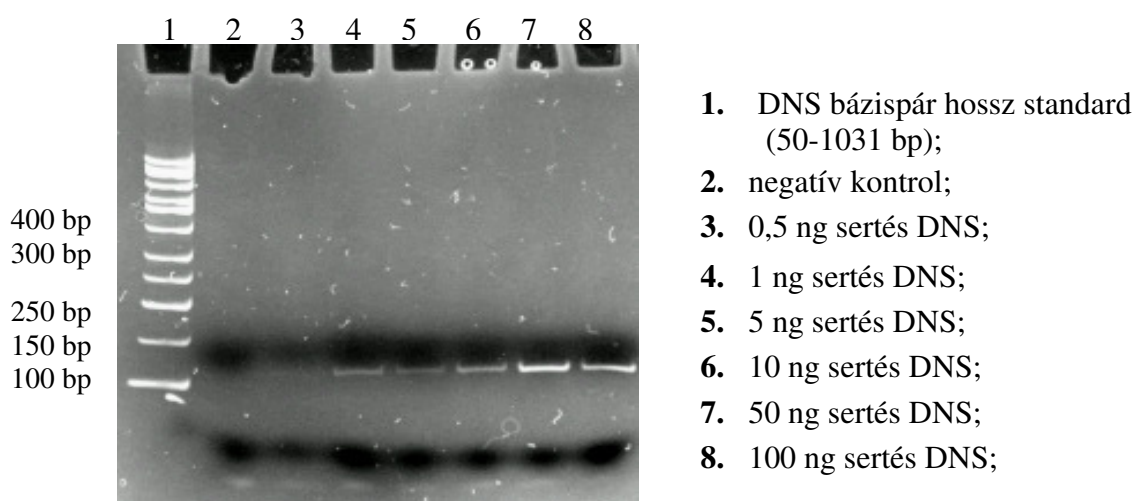
Az eredmények azt mutatták (21-22. ábra), hogy a marha és csirke esetében kedvezőbb az 52 °C, míg sertés vizsgálatoknál az 50 °C paraméterrel beállított primer kapcsolódási lépés.



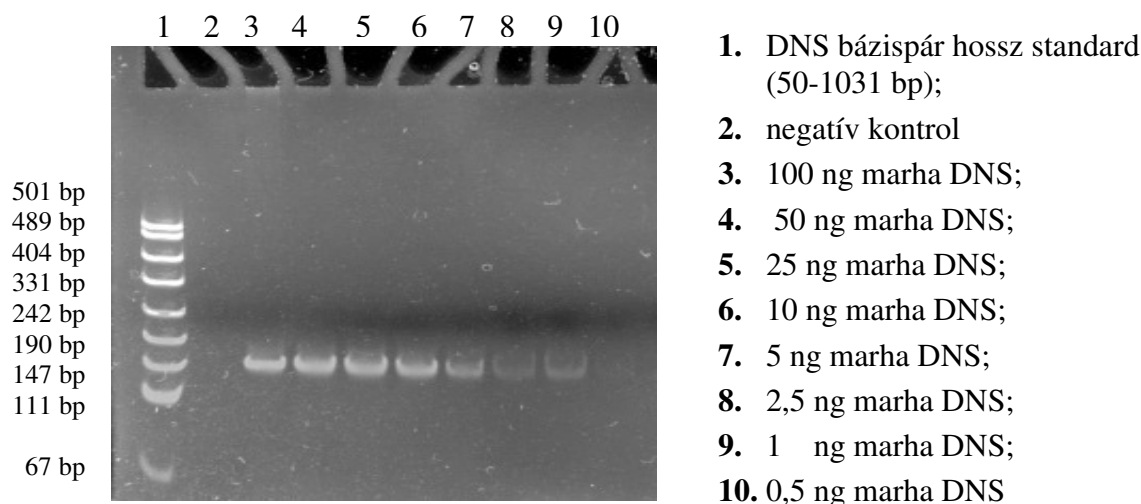
**22. ábra** Nyers marha, sertés és csirke DNS hígítási sorának PCR elektroforetogramja (Cytb1-Cytb2), 52 °C-os primerkapcsolódási hőmérséklet mellett

#### 4.1.3. A láncreakció érzékenységének kimutatása tisztított DNS oldat sorozattal

A primerek specificitásának vizsgálata után egy DNS hígítási sorozat segítségével meghatároztam azt a minimális DNS mennyiséget, melyből még látható jel képződik a PCR reakcióban (23. és 24. ábra). Sertés DNS esetében azt tapasztaltam, hogy a rendszer hígított oldatban 1 ng DNS/50µl reakcióelegy DNS kimutatására alkalmas.

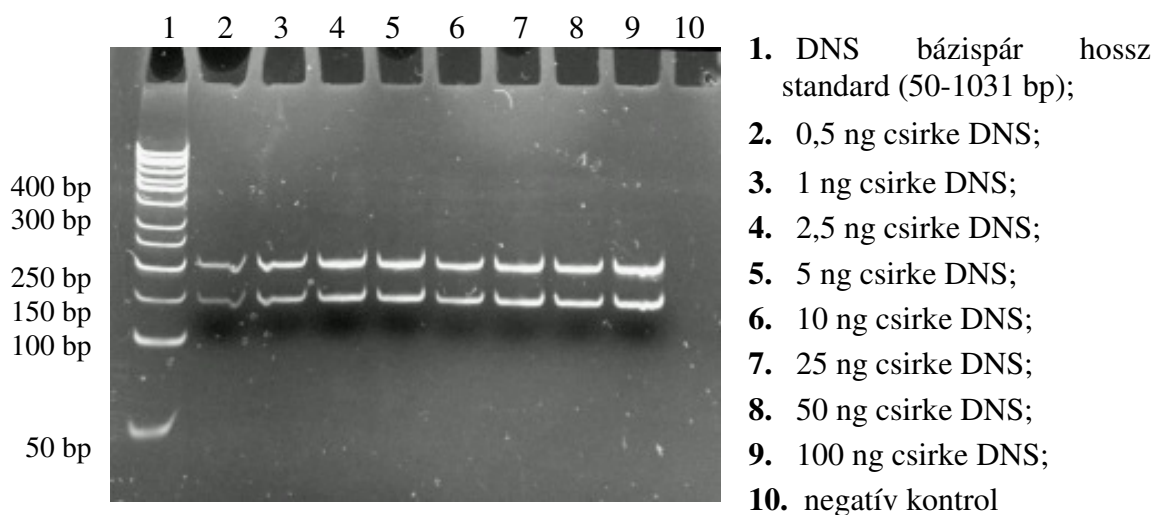


**23. ábra** Sertés-specifikus PCR reakció (SW01-SW02) érzékenységének meghatározása DNS hígítási sorozattal, 60 °C-os primerkötődési hőmérséklet mellett



**24. ábra** Marha-specifikus PCR reakció (Ca03-Ca04) érzékenységének meghatározása DNS hígítási sorozattal, 64°C-os primerkötődési hőmérséklet mellett

A csirkehúsból izolált DNS oldattal az adott reakcióparaméterek mellett 0,5 ng DNS/50 µl volt a kimutatás érzékenysége (25. ábra).

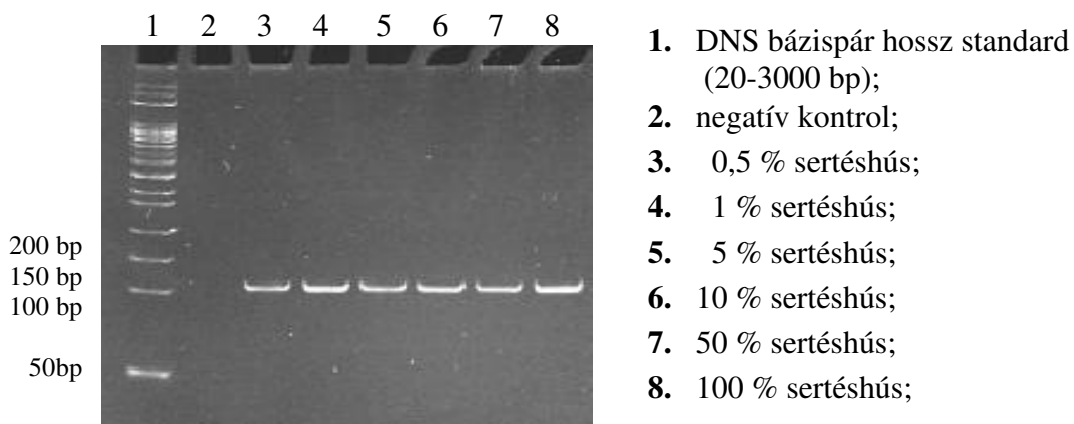


**25. ábra** PCR-RFLP reakció (Cytb1-Cytb2, RsaI) érzékenységének meghatározása DNS hígítási sorozattal, 52°C-os primerkötődési hőmérséklet mellett

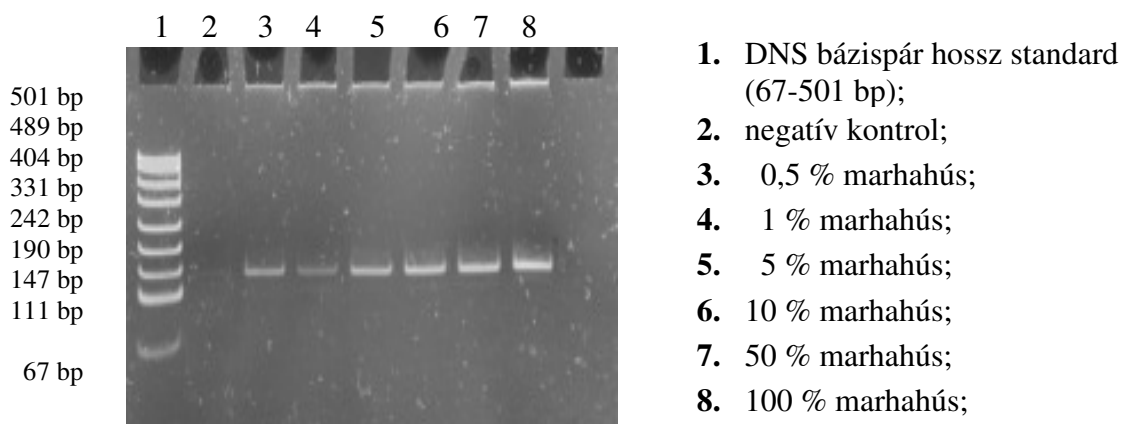
A továbbiakban azt vizsgáltam, hogy a rendszer érzékenysége hogyan változik nyers sertéshús - marhahús és sertéshús -csirkehús rendszerek és több komponensű hőkezelt és sterilizett keverékmátrixok vizsgálatának esetében.

#### 4.1.4. Modellkeverékek vizsgálata

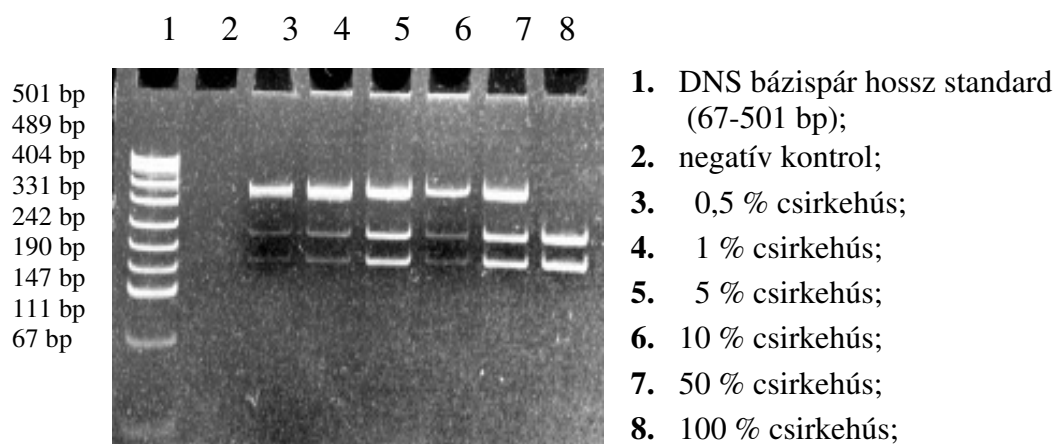
Elsőként, kétkomponensű nyers modelleket vizsgáltam, melynek eredményei a 26. és 27. ábrákon láthatóak. Sertéshús és marhahús keverék kimutatási határértéke 0,5 % volt az adott húsfajtára nézve.



**26. ábra** Sertés-specifikus PCR reakció (SW01-SW02) érzékenységének meghatározása pácsót tartalmazó, nyers sertés comb - marha felsál keverékből



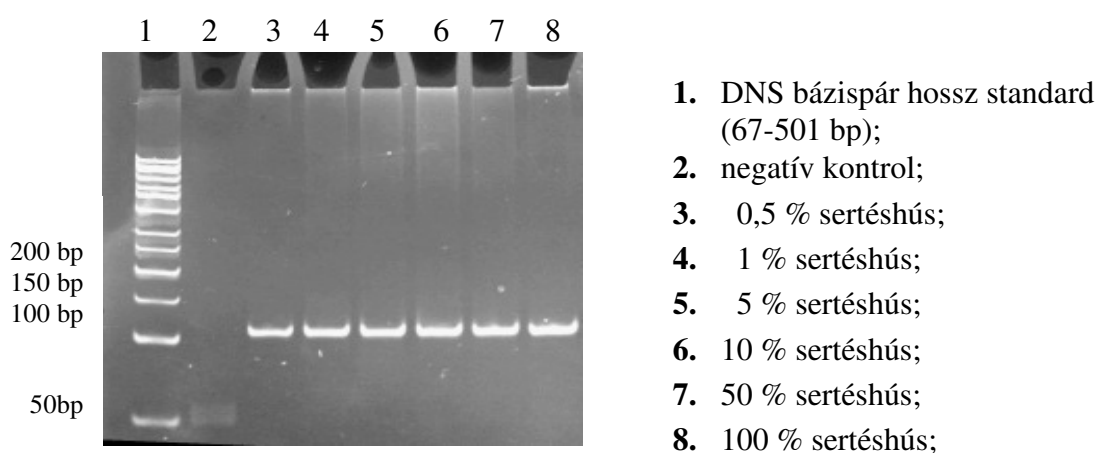
**27. ábra** Marha-specifikus PCR reakció (Ca03-Ca04) érzékenységének meghatározása pácsót tartalmazó, nyers marha felsál - sertés comb keverékből



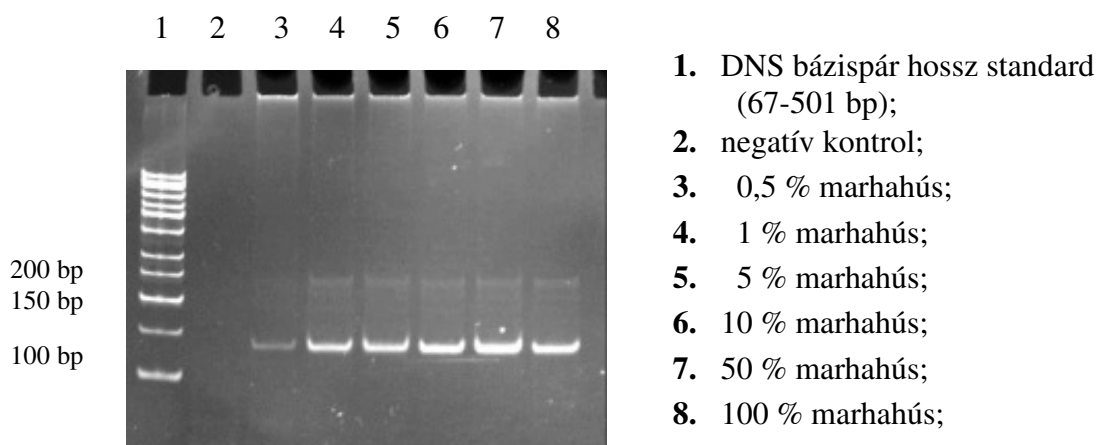
**28. ábra** PCR-RFLP reakció (Cytb1-Cytb2, RsaI) érzékenységének meghatározása pácsót tartalmazó, nyers csirke mell-sertés comb keverékből

Az eredmények a csirkehús-tartalom kimutatható határértékének meghatározása során is hasonlóak voltak. Ebben az esetben szintén 0,5 % csirkehús tartalom is kimutatható volt (28. ábra).

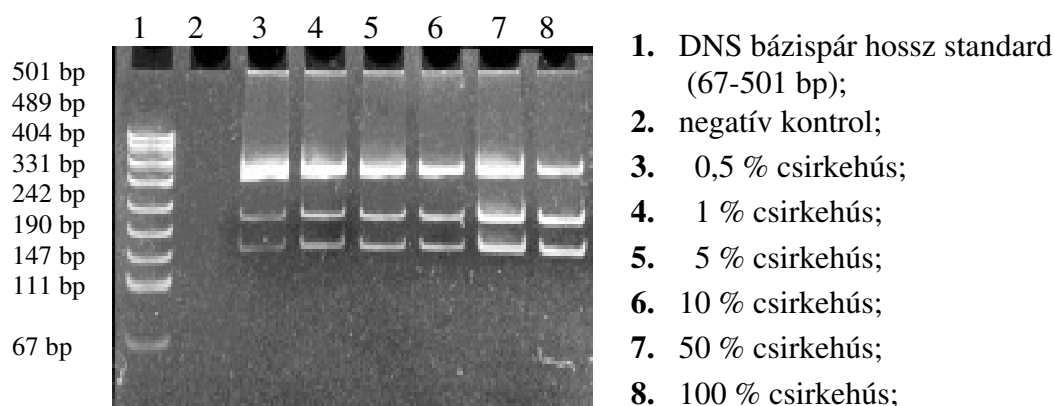
A nyers modellek után áttértem a 72 °C maghőmérsékletig kezelt keverékek vizsgálatára. A modellek ebben az esetben 30%-s összes hústartalomra voltak beállítva. A kapott elektroforetogramok alapján (29-30. ábrán) megállapítható volt, hogy ezekben a modellekben is kimutatható még a 0,5 %-ban kevert sertés- marha- és csirkehús is. Azonban a csirke és marhahús vizsgálata során a 0,5 %-os keverékből kapott jel gyengébb volt, mint a nyers keverékek esetében.



**29. ábra** Sertés-specifikus PCR reakció (SW01-SW02) érzékenységének meghatározása 78°C -on vörösáru típusú (sertés comb-marha felsál) modell-mátrixból



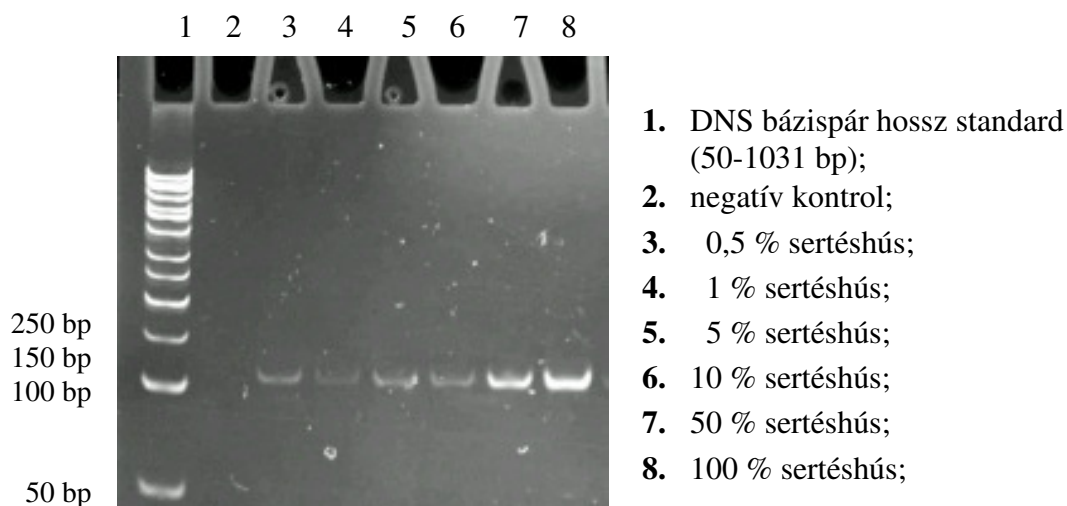
**30. ábra** Marha specifikus PCR reakció (Ca03-Ca04) érzékenységének meghatározása vörösáru típusú (marha felsál - sertés comb) modell-mátrixból



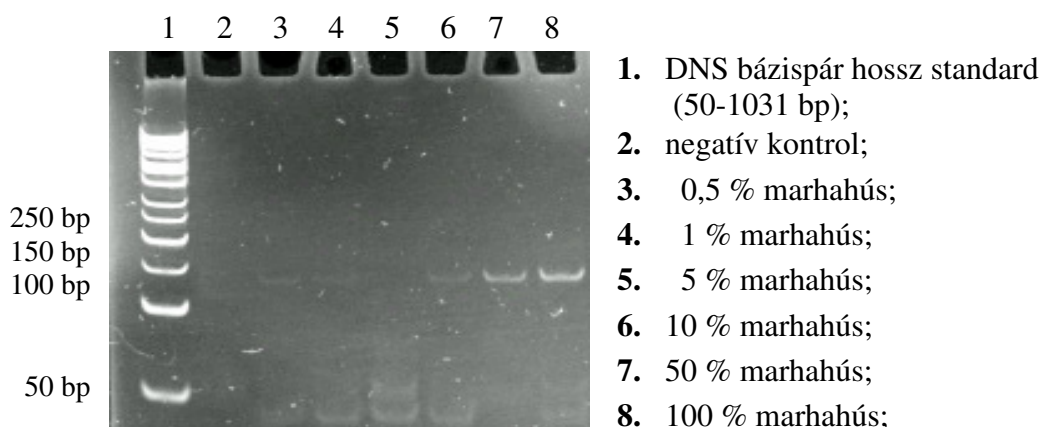
**31. ábra** Csirke-specifikus PCR reakció érzékenységének meghatározása vörösáru típusú (csirke mell-sertés comb) modell mátrixból

A modellek harmadik csoportjában 60%-s összhús tartalmú, 121 °C-on sterilizéssel tartósított mintákkal vizsgáltam a reakció érzékenységét. Ebben az esetben jelentősen csökkent a nyers mintáéval azonos mintatömegből izolálható DNS mennyisége és mérete. Ennek következtében a marhahúsos mintákból nem sikerült kimutatható jelet sokszorozni, még a tiszta marhahús tartalmú modellek esetében sem. A sertéshús-marhahús mintáknál a 100% sertéshúst tartalmazó modellekből igen gyenge, míg a csirkehúsos mintáknál egy erősebb jelet kaptam. Azonban egyik modell esetében sem sikerült az alacsonyabb keveréktartományban jel kimutatása.

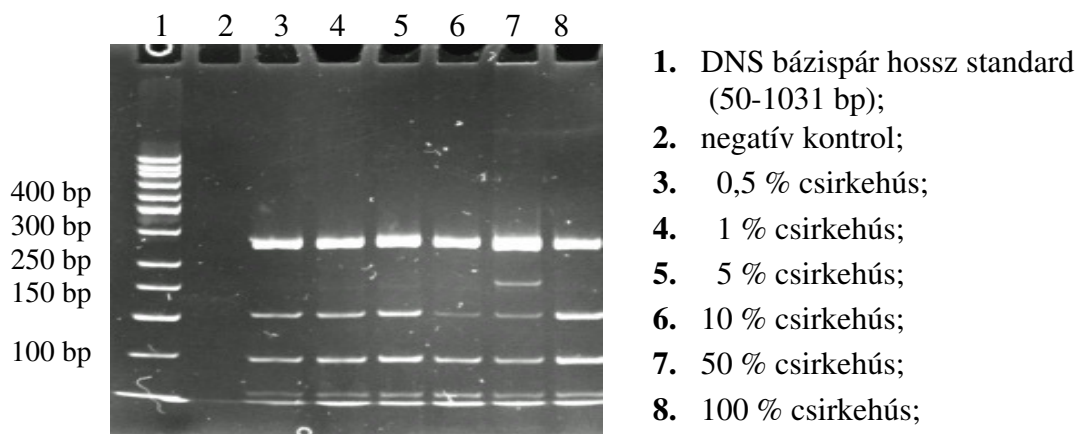
Ezért, a módszer érzékenyítésére egy DNS bekonzentrálással készített mintasort, megemelt DNS bevitelt (250→500 ng) és ciklusszámot (35→38 -ra), valamint egy PCR Jump mixet használtam. Ebben a mixben a hőstabil polimeráz enzim egy specifikus ellenanyaggal gátolt, mely magas hőmérsékleten, a láncreakció indulásánál denaturálódik és a reakció csak ekkor indul be. Ezzel sikerült elérnem, hogy 50% és 100%-os mintasorban erős jel képződjön, azonban a 10 % alatti tartományban a jelerősség gyenge maradt, mind sertés, mind marhahús esetében (32-33. ábra).



**32. ábra** Sertés-specifikus PCR reakció (SW01-SW02) érzékenységeinek meghatározása konzerv típusú (sertés comb-marha felsál) modell-mátrixból



**33. ábra** Marha-specifikus PCR reakció (Ca03-Ca04) érzékenységeinek meghatározása konzerv típusú (sertés comb-marha felsál) modell-mátrixból



**34. ábra** Csirke specifikus PCR reakció (Cytb1-Cytb2) érzékenységének meghatározása konzerv típusú ( csirkemell – sertés comb) modell-mátrixból

A csirkehúsos mintáknál még a 0,5%- os mintában is kaptam jelet, azonban a magasabb DNS bázispár tartományban, 1-2 esetben egy halványabb hasított, nem specifikus termék is keletkezett (34. ábra). A munka összegzéseként megállapítható, hogy a kidolgozott rendszer jól alkalmazható nyers és hőkezelt sertés-, marha- vagy csirkehús alapú termékek vizsgálatára 0,5% kimutatási határérték mellett, Wizard DNS izolálási módszert alkalmazva. Azonban a sterilizett mintáknál további módszer optimalizálás szükséges a rendszerek érzékenyítéséhez. Ennek megoldása lehet kisebb méretű mitokondriális génszakasz sokszorozása, mivel az nagyobb kópiaszámban található a sejtekben.



## 4.2. Élelmiszervizsgálatok

A módszerbeállítás és tesztelés után különböző, az alábbiakban felsorolt termékcsoporthoz tartozó húskészítményeket vizsgáltam meg:

- vörösáruk (párizsi, virsli;
- kenhető húskészítmények (májasok);
- húskonzervek (aprított jellegű húskonzervek, májkrémek)

### 4.2.1 Hústermék csoportok DNS extrahálási eredményei

A két párhuzamos mintából kinyerhető összes DNS mennyiségére és tisztaságára vonatkozó adatokat, valamint a koncentráció és R értékbeli eltéréseket a 13 - 16. táblázatban, termékcsopontonként foglaltam össze.

A párizsi mintákból (13. táblázat) izolálható DNS mennyisége a csoporton belül nagy ingadozást mutatott (16,4-58,5 µg/300 mg minta), mely eltérések oka valószínűleg a termékösszetételben keresendő. A kinyerhető összes DNS tartalom a felhasznált hús mennyisége mellett jelentősen függhet a DNS hordozók, így pl. a fűszerek, szója mennyiségétől. Azonban a tisztaságra vonatkozó értékek, egy esettől eltekintve, elérték az 1,7 értéket.

**13. táblázat** Párizsi mintákból Wizard módszerrel izolálható DNS mennyiségi és tisztasági jellemzői

| Párizsi minták | Wizard tisztítás                               |                                 |
|----------------|------------------------------------------------|---------------------------------|
|                | A mintából kinyerhető DNS mennyisége, µg/300mg | R érték (A <sub>260/280</sub> ) |
| Párizsi 1      | 36,63±2,13                                     | 1,78±0,01                       |
| Párizsi 2      | 32,08±4,17                                     | 1,82±0,03                       |
| Párizsi 3      | 16,42±2,50                                     | 1,66±0,01                       |
| Párizsi 4      | 18,50±0,52                                     | 1,74±0,01                       |
| Párizsi 5      | 58,50±2,17                                     | 1,79±0,01                       |
| Párizsi 6      | 44,25±0,17                                     | 1,78 ±0,01                      |
| Párizsi 7      | 34,33±2,25                                     | 1,77±0,02                       |
| Párizsi 8      | 33,42±0,83                                     | 1,76±0,01                       |
| Párizsi 9      | 39,50±3,92                                     | 1,80±0,02                       |
| Párizsi 10     | 31,21±0,96                                     | 1,71±0,01                       |

A párizsihoz hasonlóan a virslik DNS izolálási eredményeire is jellemző a tág határok közötti ingadozás (16-43 µg/300mg minta ), ugyanakkor a kinyert DNS izolátumok minden esetben megfelelően tisztán voltak kinyerhetőek (14. táblázat).

**14. táblázat** Virsli mintákból Wizard módszerrel izolálható DNS mennyiségi és tisztasági jellemzői

| Virsli minták | Wizard tisztítás                               |                                 |
|---------------|------------------------------------------------|---------------------------------|
|               | A mintából kinyerhető DNS mennyisége, µg/300mg | R érték (A <sub>260/280</sub> ) |
| Virsli 1      | 38,88±3,13                                     | 1,76±0,01                       |
| Virsli 2      | 41,50±3,50                                     | 1,76±0,01                       |
| Virsli 3      | 20,25±3,00                                     | 1,67±0,02                       |
| Virsli 4      | 28,08±0,07                                     | 1,84±0,01                       |
| Virsli 5      | 25,75±1,08                                     | 1,71±0,03                       |
| Virsli 6      | 15,79±2,21                                     | 1,79±0,01                       |
| Virsli 7      | 25,96±0,96                                     | 1,78±0,02                       |
| Virsli 8      | 28,08±3,58                                     | 1,76±0,02                       |
| Virsli 9      | 24,50±3,25                                     | 1,71±0,04                       |
| Virsli 10     | 42,88±1,38                                     | 1,78±0,01                       |

A májas minták esetében a DNS mennyiség mintánkénti ingadozása kisebb volt. A kinyert DNS mennyisége minden esetben meghaladta a 30 µg-ot. Ennek részben az oka az, hogy a hússal azonos tömegű májból nagyobb mennyiségű DNS volt izolálható (15.táblázat).

**15. táblázat** Kenőmájas mintákból Wizard módszerrel izolálható DNS mennyiségi és tisztasági jellemzői

| Kenőmájas minták | Wizard tisztítás                               |                                 |
|------------------|------------------------------------------------|---------------------------------|
|                  | A mintából kinyerhető DNS mennyisége, µg/300mg | R érték (A <sub>260/280</sub> ) |
| Májas 1          | 41,38±0,71                                     | 1,76±0,01                       |
| Májas 2          | 44,67±3,75                                     | 1,68±0,07                       |
| Májas 3          | 43,38±1,96                                     | 1,76±0,05                       |
| Májas 4          | 36,29±3,13                                     | 1,74±0,04                       |
| Májas 5          | 32,13±0,88                                     | 1,70±0,03                       |

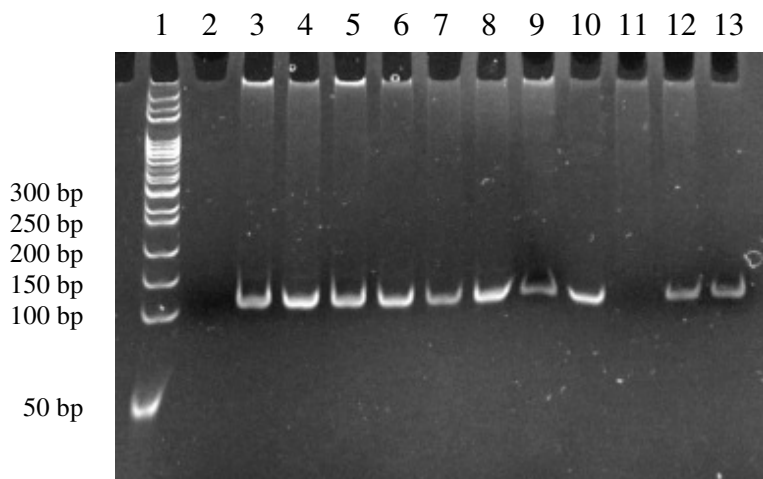
A konzervekből egy bekonzentrálási lépés közbeiktatásával izolált DNS mennyisége minden esetben meghaladta a 120 µg-os értéket, megfelelő DNS tisztasági jellemző mellett (16. táblázat).

**16. táblázat** Májkrém és vagdalthús konzerv mintákból Wizard módszerrel izolálható DNS mennyiségi és tisztasági jellemzői

| Májkrémek és<br>vagdalthús konzerv<br>minták | Wizard tisztítás                                     |                                    |
|----------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------|
|                                              | A mintából kinyerhető<br>DNS mennyisége,<br>µg/300mg | R érték<br>(A <sub>260/280</sub> ) |
| Májkrém 1                                    | 134,80±12,52                                         | 1,76±0,01                          |
| Májkrém 2                                    | 127,80±9,85                                          | 1,86±0,03                          |
| Májkrém 3                                    | 321,50±25,65                                         | 1,71±0,02                          |
| Vagdalthús 1                                 | 122,70±15,06                                         | 1,84±0,02                          |
| Vagdalthús 2                                 | 180,34±20,92                                         | 1,82±0,03                          |
| Vagdalthús 3                                 | 127,07±13,66                                         | 1,84±0,02                          |

#### 4.2.2. Sertés-eredetű összetevők kimutatása

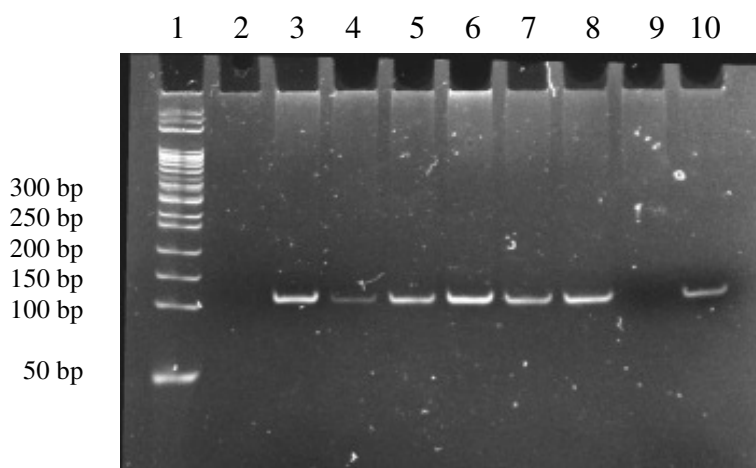
A sertés-eredetű komponensek kimutatását egyszerű-PCR technika segítségével végeztem. Ennek jellemzője, hogy a SW01/SW02 primerpárral sokszorozott, 108 bázispár méretű PCR termék csak az adott állat valamely részének (hús, máj, szalonna, zselatin) jelenléte esetében látható. A PCR elektroforetogramok, termékcsopontonként bemutatva 35-39.. ábrán láthatóak.



**35. ábra** Párizsi termékekből izolált DNS mintákból származó, a sertés növekedési hormont kódoló genomiális génre épített, SW01-SW02 primerekkel sokszorozott egyszerű-PCR reakciótermékek elektroforetogramja

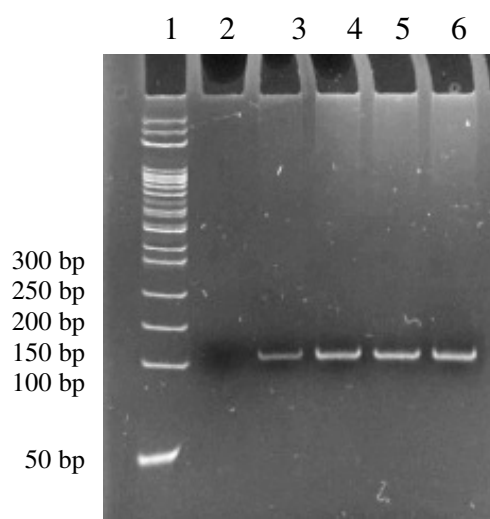
- |                                                 |                                   |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------|
| 1. DNS bázispár hossz<br>standard (50-3000 bp); | 7. Párizsi 5;                     |
| 2. Negatív kontrol;                             | 8. Párizsi 6                      |
| 3. Párizsi 1;                                   | 9. Párizsi 7;                     |
| 4. Párizsi 2;                                   | 10. Párizsi 8;                    |
| 5. Párizsi 3;                                   | 11. Párizsi 9;                    |
| 6. Párizsi 4;                                   | 12. Párizsi 10;                   |
|                                                 | 13. Sertés DNS / pozitív kontrol; |

A párizsi és virsli mintákban (35-37. ábra) egy termék kivételével találtam sertés eredetű komponenseket. Ez várható volt, mivel Magyarországon egyrészt ez a legkedveltebb húsfajta, másrészt a legtöbb termékhez sertésből származó szalonnát használnak fel a gyártás során. A Párizsi minták estén a 7.sz. minta, míg a virsli minták közül a 2.sz. minta nem bizonyult a jelölésnek megfelelőnek, minkét esetben kimutattam sertéshús jelenlétét, mely a címkén nem volt feltüntetve.



**36. ábra** Virsli termékekből izolált DNS mintákból származó, a sertés növekedési hormont kódoló genomiális génre épített, SW01-SW02 primerekkel sokszorozott egyszerű-PCR reakciótermékek elektroforetogramja

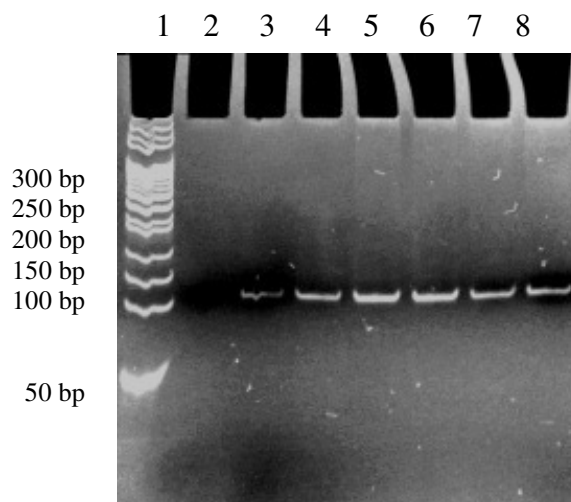
- |                                             |                                  |
|---------------------------------------------|----------------------------------|
| 1. DNS bázispár hossz standard (50-3000bp); | 6. Virsli 7;                     |
| 2. Negatív kontrol;                         | 7. Virsli 8;                     |
| 3. Virsli 4;                                | 8. Virsli 9;                     |
| 4. Virsli 5;                                | 9. Virsli 10;                    |
| 5. Virsli 6;                                | 10. Sertés DNS / pozitív kontrol |



**37. ábra** További virsli termékekből izolált DNS mintákból származó, a sertés növekedési hormont kódoló genomiális génre épített, SW01-SW02 primerekkel sokszorozott egyszerű-PCR reakciótermékek elektroforetogramja

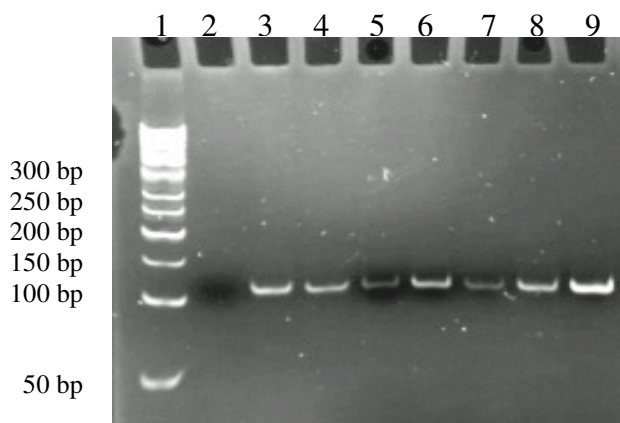
- |                                              |                                 |
|----------------------------------------------|---------------------------------|
| 1. DNS bázispár hossz standard (50-3000 bp); | 4. Virsli 2;                    |
| 2. Negatív kontrol;                          | 5. Virsli 3;                    |
| 3. Virsli 1;                                 | 6. Sertés DNS / pozitív kontrol |

A vizsgált májas minták mindegyike jelölésnek megfelelően pozitív eredményt adott (38. ábra), melyre úgyszintén jellemző a sertésmáj, sertés szalonna felhasználása.



**38. ábra** Májás termékekből izolált DNS mintákból származó, a sertés növekedési hormont kódoló genomiális génre épített, SW01-SW02 primerekkel sokszorozott egyszerű-PCR reakciótermékek elektroforetogramja

- |                                              |                                 |
|----------------------------------------------|---------------------------------|
| 1. DNS bázispár hossz standard (50-3000 bp); | 5. Májás 3;                     |
| 2. Negatív kontrol;                          | 6. Májás 4;                     |
| 3. Májás 1;                                  | 7. Májás 5;                     |
| 4. Májás 2;                                  | 8. Sertés DNS / pozitív kontrol |



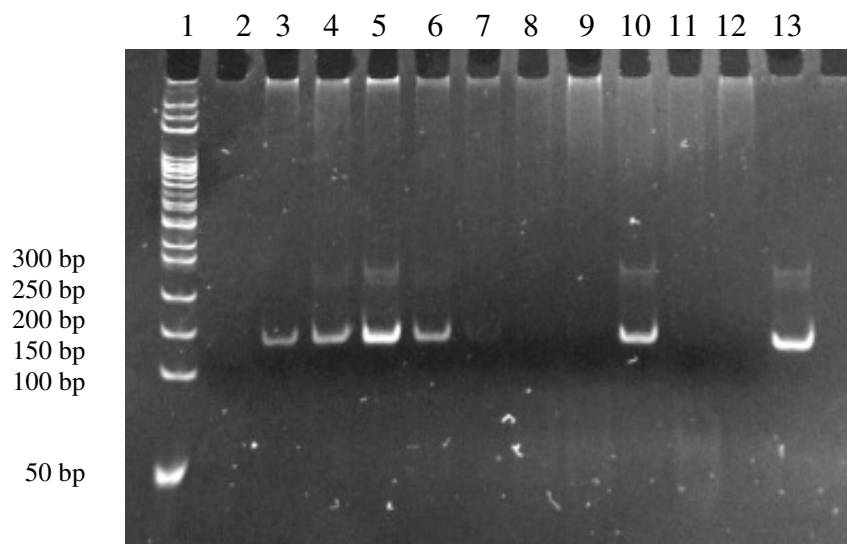
**39. ábra** Májkrém és vagdalthús termékekből izolált DNS mintákból származó, a sertés növekedési hormont kódoló genomiális génre épített, SW01-SW02 primerekkel sokszorozott egyszerű-PCR reakciótermékek elektroforetogramja

- |                                             |                                 |
|---------------------------------------------|---------------------------------|
| 1. DNS bázispár hossz standard (50-1031bp); | 6. Vagdalthús 1                 |
| 2. Negatív kontrol;                         | 7. Vagdalthús 2                 |
| 3. Májkrém 1;                               | 8. Vagdalthús 3                 |
| 4. Májkrém 2                                | 9. Sertés DNS / pozitív kontrol |
| 5. Májkrém 3                                |                                 |

A konzerv májkrémek és vagdaltak minden mintáiban eltérő jelerősséggel, de minden esetben találtam sertés-eredetű alkotót (39. ábra). A vizsgálatok a jelöléssel egyező eredményt hoztak.

#### 4.2.3. Marha-eredetű összetevők kimutatása

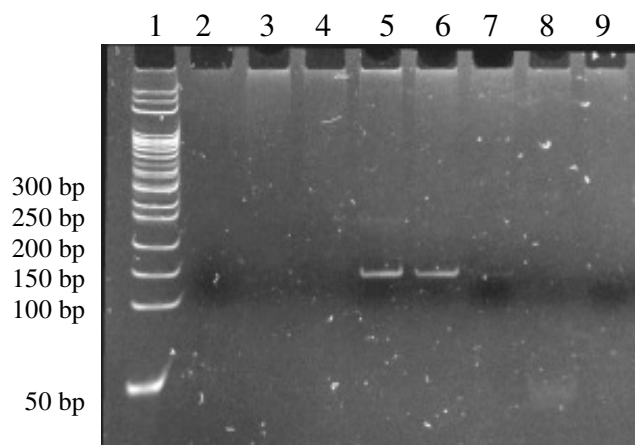
A marha-eredetű komponensek detektálását szintén egyszerű-PCR módszerrel végeztem el Ca03/Ca04 primerpárral. A 130 bázispár méretű PCR termékjel csak az adott állat valamely szervének, szövetének (hús, máj, sajt, marhafaggyú, zselatin) jelenléte esetében látható.



**40. ábra** Párizsi termékekből izolált DNS mintákból származó, a marha növekedési hormont kódoló genomális génre épített, Ca03-Ca04 primerekkel sokszorozott egyszerű-PCR reakciótermékek elektroforetogramja

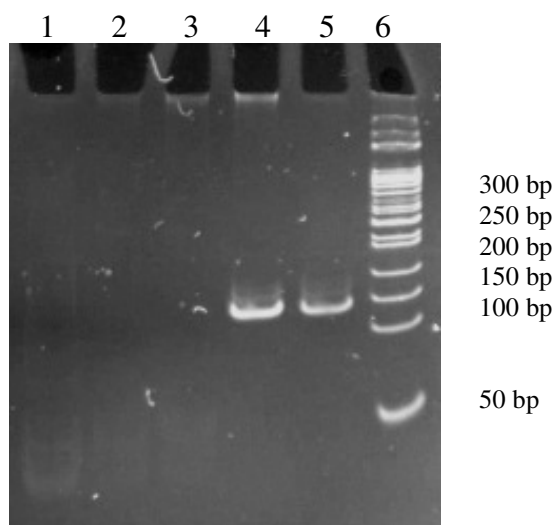
- |                                              |                                  |
|----------------------------------------------|----------------------------------|
| 1. DNS bázispár hossz standard (50-3000 bp); | 7. Párizsi 5;                    |
| 2. Negatív kontrol;                          | 8. Párizsi 6                     |
| 3. Párizsi 1;                                | 9. Párizsi 7;                    |
| 4. Párizsi 2;                                | 10. Párizsi 8;                   |
| 5. Párizsi 3;                                | 11. Párizsi 9;                   |
| 6. Párizsi 4;                                | 12. Párizsi 10;                  |
|                                              | 13. Marha DNS / pozitív kontrol; |

A párizsi minták analízisének öt esetben, azaz a minták felénél találtam pozitív mintát (40. ábra). A virslik vizsgálata során az esetek 30 %-ban pozitív eredményt kaptam (41-42. ábra). A párizsi mintáknál a 2, 3, 4, 8, és 10 sz. minta jelölése és összetétele nem egyezett meg, melyből az első négy nem jelölt alkotó volt és egy esetben a jelölt komponens nem volt kimutatható. A virsliknél a 7. és 8 sz. minta mérésekor tapasztaltam eltéréseket, egyik esetben jelöletlen összetevőt, a másik esetben bár jelölt volt a termék, de a jelenlét nem volt kimutatható. Ezt a húsfajtát és faggyút a húsipar kisebb mennyiségben használja fel, melynek elsősorban az ár, a piaci keresettség és a BSE problémák az okai.



**41. ábra** Virsli termékekből izolált DNS mintákból származó, a marha növekedési hormont kódoló genomiális génre épített, Ca03-Ca04 primerekkel sokszorozott egyszerű-PCR reakciótermékek elektroforetogramja

- |                                             |               |
|---------------------------------------------|---------------|
| 1. DNS bázispár hossz standard (50-3000bp); | 5. Virsli 6;  |
| 2. Negatív kontrol;                         | 6. Virsli 7;  |
| 3. Virsli 4;                                | 7. Virsli 8;  |
| 4. Virsli 5;                                | 8. Virsli 9;  |
|                                             | 9. Virsli 10; |

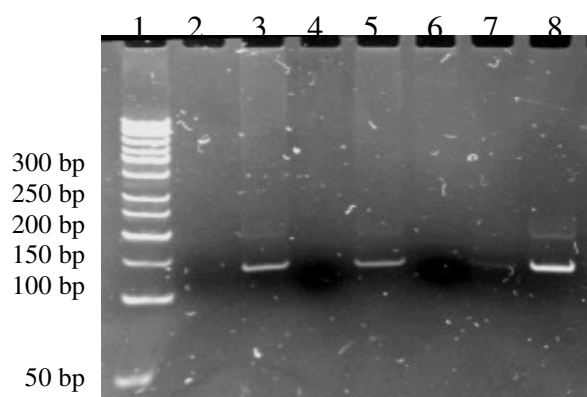


**42. ábra** További virsli termékekből izolált DNS mintákból származó, a marha növekedési hormont kódoló genomiális génre épített, Ca03-Ca04 primerekkel sokszorozott egyszerű-PCR reakciótermékek elektroforetogramja

- |                     |                                             |
|---------------------|---------------------------------------------|
| 1. Negatív kontrol; | 4. Virsli 3;                                |
| 2. Virsli 1;        | 5. Marha DNS / pozitív kontrol              |
| 3. Virsli 2;        | 6. DNS bázispár hossz standard (50-3000bp); |

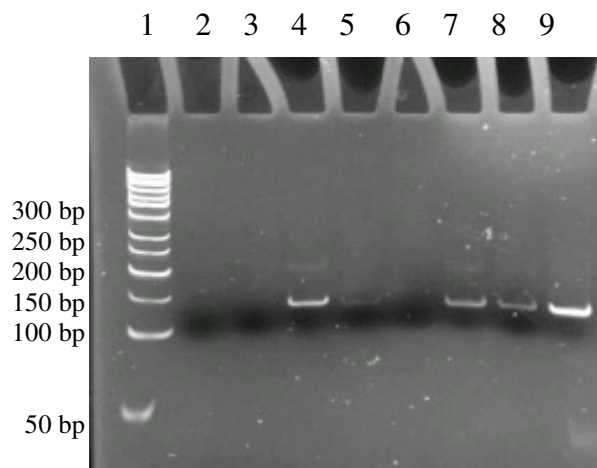


A májas mintáknál két erős pozitív és két nagyon gyenge szignált kaptam (43. ábra). Egy esetben az 5. sz. mintában kaptam egy igen gyenge jelet, melynek eredete a jelölésen nem szerepelt. A gyenge jelerősség utalhat esetleges gyártási kontaminációra is.



**43. ábra** Májas termékekből izolált DNS mintákból származó, a marha növekedési hormont kódoló genomiális génre épített, Ca03-Ca04 primerekkel sokszorozott egyszerű-PCR reakciótermékek elektroforetogramja

- |                                              |                                |
|----------------------------------------------|--------------------------------|
| 1. DNS bázispár hossz standard (50-3000 bp); | 5. Májas 3;                    |
| 2. negatív kontrol;                          | 6. Májas 4;                    |
| 3. Májas 1;                                  | 7. Májas 5;                    |
| 4. Májas 2;                                  | 8. marha DNS / pozitív kontrol |



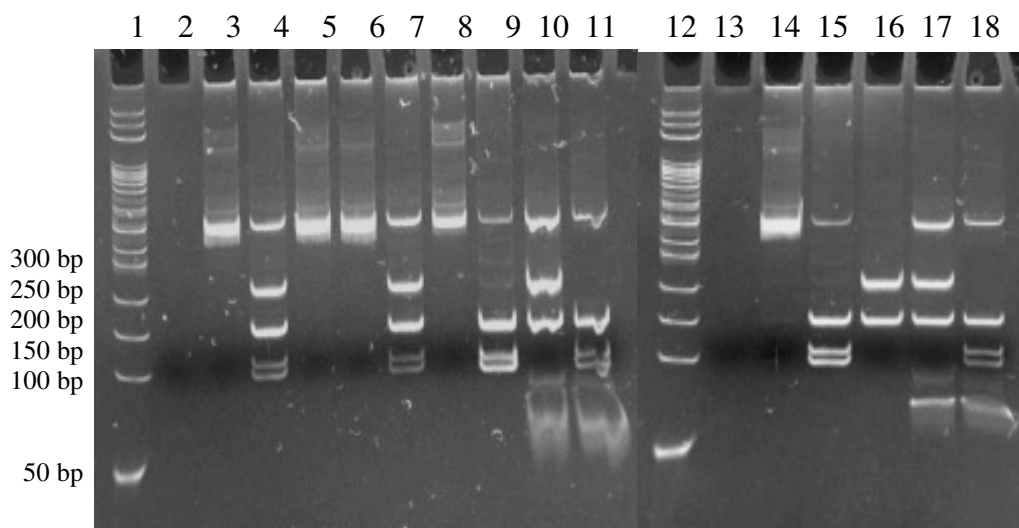
**44. ábra** Májkrém és vagdalthús termékekből izolált DNS mintákból származó, a marha növekedési hormont kódoló genomiális génre épített, Ca03-Ca04 primerekkel sokszorozott egyszerű-PCR reakciótermékek elektroforetogramja

- |                                             |                                |
|---------------------------------------------|--------------------------------|
| 1. DNS bázispár hossz standard (50-1031bp); | 5. Májkrém 3;                  |
| 2. Negatív kontrol                          | 6. Vagdalthús 1;               |
| 3. Májkrém 1;                               | 7. Vagdalthús 2;               |
| 4. Májkrém 2;                               | 8. Vagdalthús 3;               |
|                                             | 9. Marha DNS / pozitív kontrol |

A májkrémek és vagdalthúsok kétharmad arányban tartalmaztak marha-eredetű komponenseket (44. ábra). Ezek mindegyike a címkézésnek megfelelő volt.

#### 4.2.4. Baromfi-eredetű összetevők kimutatása

A húsk DNS mintáiból, Cytb1/Cytb2 primerpárral ez esetben minden állatfajnál egy 359 bázispár méretű termék képződik, melyet RsaI enzimmel hasítva, a csirke DNS PCR termékének hasítása során két fragmens keletkezik, melyek 210 és 149 bázispár hosszúságúak. A pulyka esetében három, 149, 109 és 101 bázispár méretű fragmens keletkezik. Ennek az RFLP képnek az alapján a csirke és a pulyka komponensek egymástól, valamint a marha és sertés komponensektől elkülöníthetőek.

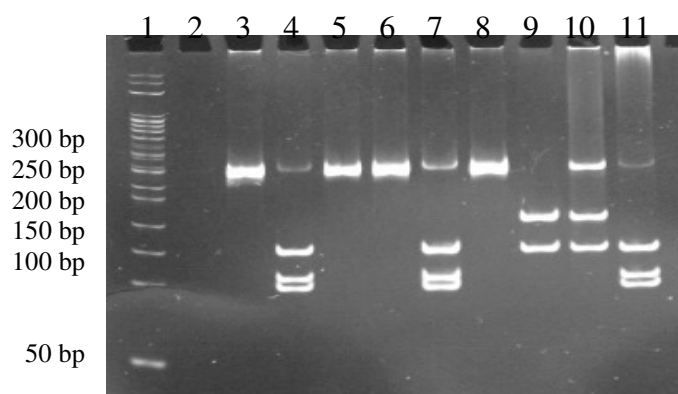


**45. ábra** Párizsi termékek DNS mintáiból származó, a citokróm b fehérjét kódoló mitokondriális génre épített, Cytb1-Cytb2 primerrel sokszorozott PCR-RFLP reakciótermékek RsaI enzimes restrikciós profilja

- |                                                     |                                                      |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>1.</b> DNS bázispár hossz standard (50-3000 bp); | <b>12.</b> DNS bázispár hossz standard (50-3000 bp); |
| <b>2.</b> Negatív kontrol;                          | <b>13.</b> Negatív kontrol;                          |
| <b>3.</b> Párizsi 1;                                | <b>14.</b> Párizsi 8;                                |
| <b>4.</b> Párizsi 2;                                | <b>15.</b> Párizsi 9;                                |
| <b>5.</b> Párizsi 3;                                | <b>16.</b> Párizsi 10;                               |
| <b>6.</b> Párizsi 4;                                | <b>17.</b> Csirke DNS / pozitív kontrol              |
| <b>7.</b> Párizsi 5;                                | <b>18.</b> Pulyka DNS / pozitív kontrol              |
| <b>8.</b> Párizsi 6                                 |                                                      |
| <b>9.</b> Párizsi 7;                                |                                                      |
| <b>10.</b> Csirke DNS / pozitív kontrol             |                                                      |
| <b>11.</b> Pulyka DNS / pozitív kontrol             |                                                      |

A baromfihús és az abból készült termékek kedveltek a magyar fogyasztók körében. A termékek íze mellett azok ára is befolyásolja a fogyasztást. Sok esetben az ipari felhasználás kedveltsége is ebből adódik.

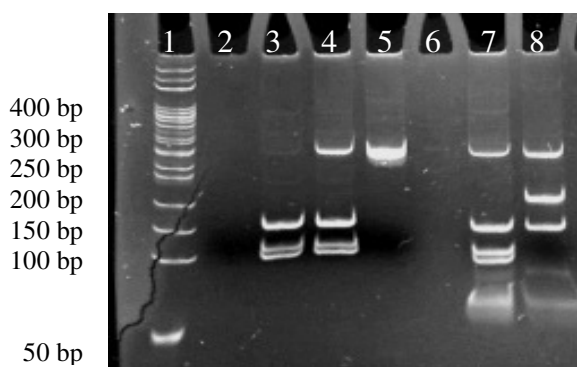
A bevizsgált tíz párizsiból ötben találtam baromfi, elsősorban pulyka-eredetű komponenst (45. ábra). A párizsi mintáknál baromfi összetevőre utaló jelölés a 2. sz. mintánál hiányzott, míg az 5., 8. és 10. mintáknál ez a terméken jelölve volt.



**46. ábra** Virsli termékek DNS mintáiból származó, a citokróm b fehérjét kódoló mitokondriális génre épített, Cytb1-Cytb2 primerrel sokszorozott PCR-RFLP reakciótermékek RsaI enzimes restrikciós profilja

- |                                             |                                  |
|---------------------------------------------|----------------------------------|
| 1. DNS bázispár hossz standard (50-3000bp); | 6. Virsli 7;                     |
| 2. Negatív kontrol;                         | 7. Virsli 8;                     |
| 3. Virsli 4;                                | 8. Virsli 9;                     |
| 4. Virsli 5;                                | 9. Virsli 10;                    |
| 5. Virsli 6;                                | 10. csirke DNS / pozitív kontrol |
|                                             | 11. pulyka DNS / pozitív kontrol |

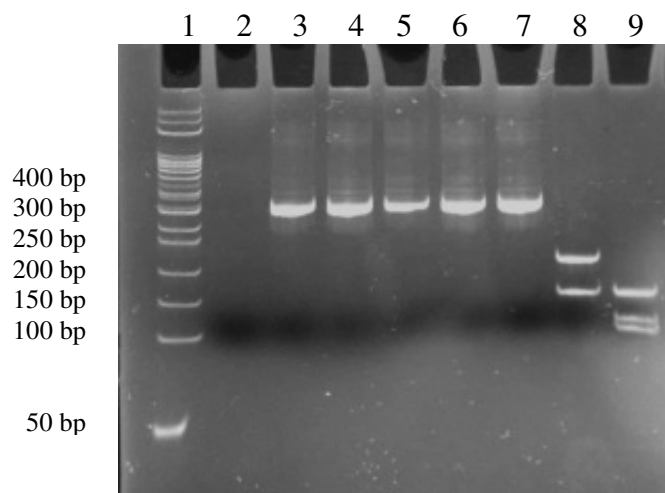
A virslik esetében az 1., 2., 8. pulyka-eredetű, 10. mintában csirke-eredetű összetevőket találtam (46-47. ábra). A jelölés lényegében véve megfelelő volt, mert ezeket a komponenseket baromfi gyűjtőnévvel tüntették fel.



**47. ábra** További virsli termékek DNS mintáiból származó, a citokróm b fehérjét kódoló mitokondriális génre épített, Cytb1-Cytb2 primerrel sokszorozott PCR-RFLP reakciótermékek RsaI enzimes restrikciós profilja

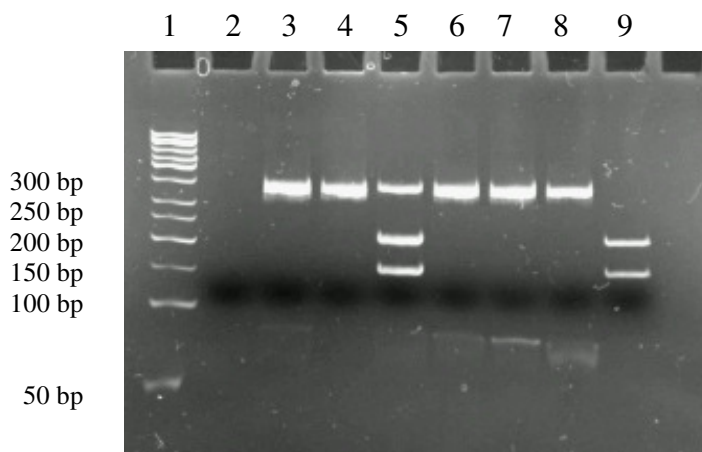
- |                                             |                                 |
|---------------------------------------------|---------------------------------|
| 1. DNS bázispár hossz standard (50-3000bp); | 5. Virsli 3;                    |
| 2. Negatív kontrol;                         | 6. -;                           |
| 3. Virsli 1;                                | 7. Pulyka DNS / pozitív kontrol |
| 4. Virsli 2;                                | 8. Csirke DNS / pozitív kontrol |

A májas minták egyike sem tartalmazott csirke vagy pulyka eredetű összetevőt, a címkzésnek megfelelően (48.ábra).



**48. ábra** Májas termékek DNS mintáiból származó, a citokróm b fehérjét kódoló mitokondriális génre épített, Cytb1-Cytb2 primerrel sokszorozott PCR-RFLP reakciótermékek RsaI enzimes restrikciós profilja

- |                                              |                                 |
|----------------------------------------------|---------------------------------|
| 1. DNS bázispár hossz standard (50-3000 bp); | 5. Májas 3;                     |
| 2. Negatív kontrol                           | 6. Májas 4;                     |
| 3. Májas 1;                                  | 7. Májas 5;                     |
| 4. Májas 2;                                  | 8. Csirke DNS / pozitív kontrol |
|                                              | 9. Pulyka DNS / pozitív kontrol |



**49. ábra** Májkrém és vagdalthús termékek DNS mintáiból származó, a citokróm b fehérjét kódoló mitokondriális génre épített, Cytb1-Cytb2 primerrel sokszorozott PCR-RFLP reakciótermékek RsaI enzimes restrikciós profilja

- |                                             |                                 |
|---------------------------------------------|---------------------------------|
| 1. DNS bázispár hossz standard (50-1031bp); | 5. Májkrém 3                    |
| 2. Negatív kontrol;                         | 6. Vagdalthús 1                 |
| 3. Májkrém 1;                               | 7. Vagdalthús 2                 |
| 4. Májkrém 2                                | 8. Vagdalthús 3                 |
|                                             | 9. Csirke DNS / pozitív kontrol |

A konzerveknél egy esetben a 3. sz. májkrém mintánál kaptam pozitív szignált, mely egybevágott a jelöléssel, ugyanakkor a 2.sz. vagdalthús minta a jelöléssel ellentétben nem tartalmazott baromfihúst (49. ábra).

Az egyszerű- PCR (sertés és marha specifikus meghatározás) és a PCR-RFLP (baromfi összetevő kimutatás) mérési eredményeit a 17-20. táblázatban foglaltam össze a terméken feltüntetett faj-specifikus állati termék jelölési információkat és saját mérési eredményeimet. Mérési eredményeim az első oszlopokban, a jelölési információk a második oszlopban szerepelnek. Szürke háttérrel emeltem ki a helytelenül jelölt termékeket, kékkel pedig azokat, amelyeknél a felirat „baromfi” jelzésű volt, de a méréssel igazolható volt a csirke vagy pulyka eredet.

A párizsi minták esetében öt mintánál fordult elő, hogy nem jelölt, marha-eredetű komponenszt találtam a mintában, valamint egy esetben találtam nem jelölt, sertés és baromfi pozitív mintát (17. táblázat). A virsli minták vizsgálati összefoglaló eredményei azt mutatták, hogy három esettől eltekintve a címkézési összetétel megegyezett a mért adatokkal (18. táblázat). A vörösrú (párizsi, virsli) minták esetében javasolható egy gyakoribb ellenőrző szűrés, illetve az üzemek részéről az összetétel-jelölése a nem hús-eredetű alkotókra is (szalonna, zselatin, bőrkepép).

A májas mintákban baromfi eredetű komponenseket, a jelölésnek megfelelően nem találtam egyik esetben sem, viszont egy esetben gyenge marha-eredetű komponensre utaló jelet kaptam (19. táblázat). A májkrém és vagdalthús konzervek analízisének (20. táblázat) egy esetben találtam eltérést a jelöléstől, ahol a feltüntetett baromfi-eredetű összetevőt nem tartalmazta a minta.

**17. táblázat** Párizsi minták DNS alapú méréseinek és a címkén való jelölésének összesítő táblázata

|  | Párizsi minták         | Marha    |             | Sertés   |             | Csirke   |             | Pulyka   |             |
|--|------------------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|
|  |                        | mérés    | jelölés     | mérés    | jelölés     | mérés    | jelölés     | mérés    | jelölés     |
|  | Párizsi 1              | +        | *           | +        | *           | -        | <i>n.a.</i> | -        | <i>n.a.</i> |
|  | Párizsi 2              | +        | <i>n.a.</i> | +        | *           | +        | <i>n.a.</i> | +        | <i>n.a.</i> |
|  | Párizsi 3              | +        | <i>n.a.</i> | +        | *           | -        | <i>n.a.</i> | -        | <i>n.a.</i> |
|  | Párizsi 4              | +        | <i>n.a.</i> | +        | *           | -        | <i>n.a.</i> | -        | <i>n.a.</i> |
|  | Párizsi 5              | -        | <i>n.a.</i> | +        | (*)         | +        | *           | +        | *           |
|  | Párizsi 6              | -        | <i>n.a.</i> | +        | *           | -        | <i>n.a.</i> | -        | <i>n.a.</i> |
|  | Párizsi 7              | -        | <i>n.a.</i> | +        | <i>n.a.</i> | -        | *           | +        | *           |
|  | Párizsi 8              | +        | <i>n.a.</i> | +        | *           | -        | <i>n.a.</i> | -        | <i>n.a.</i> |
|  | Párizsi 9              | -        | <i>n.a.</i> | -        | <i>n.a.</i> | -        | *           | +        | *           |
|  | Párizsi 10             | -        | *           | +        | (*)         | +        | *           | -        | *           |
|  | <b>Összesen eltérő</b> | <b>5</b> |             | <b>1</b> |             | <b>3</b> |             | <b>2</b> |             |

\* a címkén jelölt; (\*) jelölt nem hús alkotó; *n.a.* – címkén nem jelölt összetevő  
+ pozitív; gy - gyenge; - nincs PCR jel

**18. táblázat** Virsli minták DNS alapú méréseinek és a címkén való jelölésének összesítő táblázata

|  | Virsli minták          | Marha    |             | Sertés   |             | Csirke   |             | Pulyka   |             |
|--|------------------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|
|  |                        | mérés    | jelölés     | mérés    | jelölés     | mérés    | jelölés     | mérés    | jelölés     |
|  | Virslis 1              | -        | <i>n.a.</i> | +        | (*)         | -        | *           | +        | *           |
|  | Virslis 2              | -        | <i>n.a.</i> | +        | <i>n.a.</i> | -        | *           | +        | *           |
|  | Virslis 3              | +        | *           | +        | *           | -        | <i>n.a.</i> | -        | <i>n.a.</i> |
|  | Virslis 4              | -        | <i>n.a.</i> | +        | *           | -        | <i>n.a.</i> | -        | <i>n.a.</i> |
|  | Virslis 5              | -        | <i>n.a.</i> | +        | (*)         | -        | *           | +        | *           |
|  | Virslis 6              | +        | *           | +        | *           | -        | <i>n.a.</i> | -        | <i>n.a.</i> |
|  | Virslis 7              | +        | <i>n.a.</i> | +        | *           | -        | <i>n.a.</i> | -        | <i>n.a.</i> |
|  | Virslis 8              | -        | *           | +        | *           | -        | *           | +        | *           |
|  | Virslis 9              | -        | <i>n.a.</i> | +        | *           | -        | <i>n.a.</i> | -        | <i>n.a.</i> |
|  | Virslis 10             | -        | <i>n.a.</i> | -        | <i>n.a.</i> | +        | *           | -        | *           |
|  | <b>Összesen eltérő</b> | <b>2</b> |             | <b>1</b> |             | <b>4</b> |             | <b>1</b> |             |

\* a címkén jelölt; (\*) jelölt nem hús alkotó; *n.a.* – címkén nem jelölt összetevő  
+ pozitív; gy - gyenge; - nincs PCR jel

**19. táblázat** Májas minták DNS alapú méréseinek és a címkén való jelölésének összesítő táblázata

|  | Májas minták           | Marha    |             | Sertés   |         | Csirke   |             | Pulyka   |             |
|--|------------------------|----------|-------------|----------|---------|----------|-------------|----------|-------------|
|  |                        | mérés    | jelölés     | mérés    | jelölés | mérés    | jelölés     | mérés    | jelölés     |
|  | Májas 1                | +        | *           | +        | *       | -        | <i>n.a.</i> | -        | <i>n.a.</i> |
|  | Májas 2                | -        | <i>n.a.</i> | +        | *       | -        | <i>n.a.</i> | -        | <i>n.a.</i> |
|  | Májas 3                | +        | *           | +        | *       | -        | <i>n.a.</i> | -        | <i>n.a.</i> |
|  | Májas 4                | -        | <i>n.a.</i> | +        | *       | -        | <i>n.a.</i> | -        | <i>n.a.</i> |
|  | Májas 5                | gy       | <i>n.a.</i> | +        | *       | -        | <i>n.a.</i> | -        | <i>n.a.</i> |
|  | <b>Összesen eltérő</b> | <b>1</b> |             | <b>0</b> |         | <b>0</b> |             | <b>0</b> |             |

\* a címkén jelölt; (\*) jelölt nem hús alkotó; *n.a.* – címkén nem jelölt összetevő

+ pozitív; gy - gyenge; - nincs PCR jel

**20. táblázat** Konzerv májkrém és vagdalthús minták DNS alapú méréseinek és a címkén való jelölésének összesítő táblázata

|  | Konzerv minták         | Marha    |             | Sertés   |         | Csirke   |             | Pulyka   |             |
|--|------------------------|----------|-------------|----------|---------|----------|-------------|----------|-------------|
|  |                        | mérés    | jelölés     | mérés    | jelölés | mérés    | jelölés     | mérés    | jelölés     |
|  | Májkrém 1              | -        | *           | +        | *       | -        | <i>n.a.</i> | -        | <i>n.a.</i> |
|  | Májkrém 2              | +        | *           | +        | *       | -        | <i>n.a.</i> | -        | <i>n.a.</i> |
|  | Májkrém 3              | gy       | (*)         | gy       | (*)     | +        | *           | -        | *           |
|  | Vagdalthús 1           | -        | <i>n.a.</i> | +        | *       | -        | <i>n.a.</i> | -        | <i>n.a.</i> |
|  | Vagdalthús 2           | +        | *           | gy       | *       | -        | *           | -        | *           |
|  | Vagdalthús 3           | +        | *           | +        | *       | -        | <i>n.a.</i> | -        | <i>n.a.</i> |
|  | <b>Összesen eltérő</b> | <b>0</b> |             | <b>0</b> |         | <b>1</b> |             | <b>2</b> |             |

\* a címkén jelölt; (\*) jelölt nem hús alkotó; *n.a.* – címkén nem jelölt összetevő

+ pozitív; gy - gyenge; - nincs PCR jel

### 4.3. Vadhúsok egymás melletti meghatározása

#### 4.3.1. DNS kinyerés és tisztítás vadhúsokból

A fagyasztott húsmintákból történő DNS kivonást, Wizard gyantás és CTAB kicsapósos módszerekkel is elvégeztem, melynek összesítő adatait a 21. táblázat tartalmazza.

**21. táblázat** Fagyasztott vadhús mintákból kinyerhető DNS oldatok minőségi és mennyiségi paraméterei

| <i>Minta</i>                   | Wizard tisztítás<br>n=4                     |                                    | CTAB tisztítás<br>n=4                       |                                    |
|--------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------|
|                                | DNS mennyisége,<br>μg/100 mg<br>nyers minta | R érték<br>(A <sub>260/280</sub> ) | DNS mennyisége,<br>μg/100 mg<br>nyers minta | R érték<br>(A <sub>260/280</sub> ) |
| Vaddisznó tarja                | 5,35±0,49                                   | 1,72±0,01                          | 4,22±0,58                                   | 1,39±0,06                          |
| Őz comb                        | 6,00±0,62                                   | 1,90±0,04                          | 4,94±0,65                                   | 1,38±0,10                          |
| Szarvas lapocka                | 6,67±0,45                                   | 1,86±0,06                          | 3,33±0,43                                   | 1,41±0,04                          |
| Muflon<br>(testtáj nem ismert) | 8,70±0,94                                   | 1,77±0,02                          | 11,46±1,32                                  | 1,82±0,05                          |

Ez esetben is, hasonlóan a haszonállatok húsmintákhoz, a nagyobb R értéket eredményező, Wizard technika bizonyult kedvezőbbnek a DNS kivonáshoz. Mivel a módszer kevesebb lépésből áll és nem szükséges a DNS utólagos mosása, kisebb a keresztszennyeződések esélye is. A kivonható DNS mennyisége alacsonyabb volt, mint haszonállatok húsából kivonhatónál. Ez adódhat a kötöttebb izomszerkezetből, a magasabb fehérjetartalomtól, így az előemésztés során a minta kevésbé bomlik el.

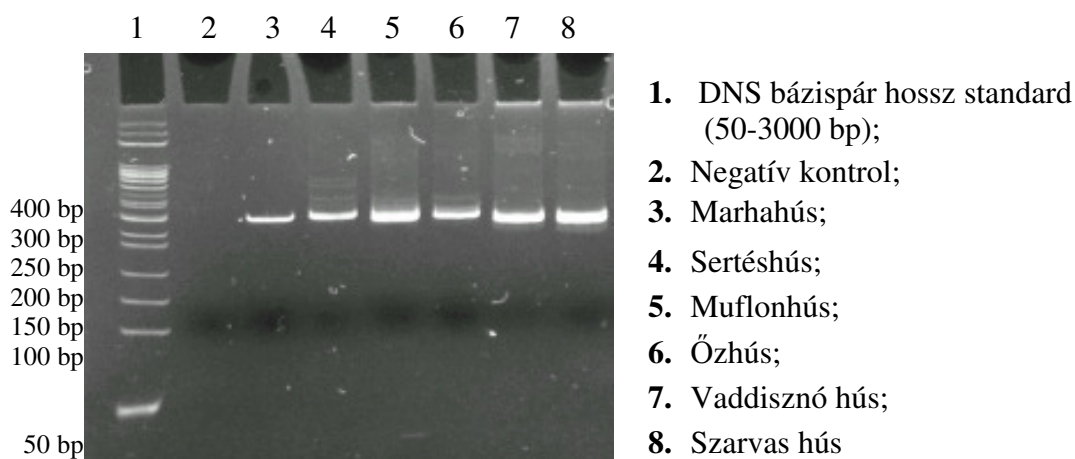
#### 4.3.2. Polimeráz láncreakción (PCR) és láncreakciót követő enzimes hasítási vizsgálatok (PCR-RFLP) vadhús mintákból

A kinyert DNS mintákból ezután több típusú, a citokróm b fehérjét kódoló mitokondriális gén eltérő szakaszait megsokszorozó polimeráz láncreakciót és azt követő restrikciós enzimes profilelemzést végeztem. Elsőként a már haszonállatok azonosításában is felhasznált citokróm b fehérjét kódoló mitokondriális gén 359 bp PCR elemzésével el a kezdtem a vizsgálatokat.



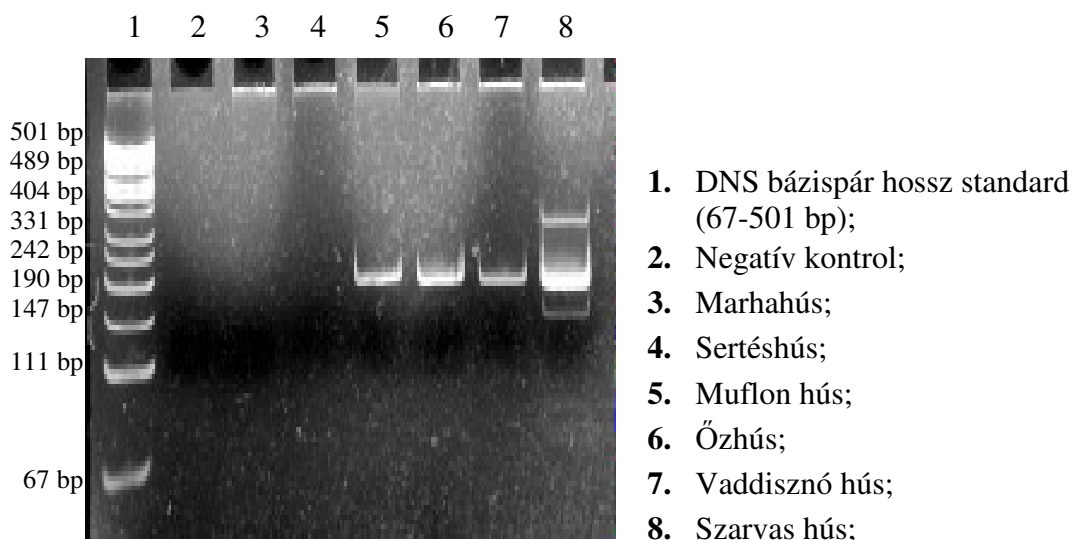
Ez a reakció, restrikciós elemzés előtt bármely gerinces állatokból származó DNS jelenléte esetében pozitív jelet ad, ezért ez esetben alkalmas volt annak kimutatására is, hogy a kivont DNS oldat esetleg tartalmaz-e további, a polimeráz láncreakciót gátló komponenst. Az elsődleges DNS tisztaságra vonatkozó spektrofotometriás analízis mellett ez egy további biztosítékot nyújt a vizsgálatok elvégzésekor. Ez a vadhúsok vizsgálatánál kiemelten fontos lehet, mivel ez hústípus a haszonállatok húsánál több hemoglobint tartalmaz. Ez a vad fajok életmódjából és húsának feldolgozásából is ered, mert a vadon lőtt állatokban több vér maradhat a kilövés során.

A 359 bázispáros, Cytb1 és Cytb2 primerpárral végzett polimeráz láncreakció eredményei a 50. ábrán láthatóak. A reakció során minden vizsgált állatfaj (marha, sertés, vaddisznó, őz, szarvas és muflon) DNS mintája erős jelet adott, azaz a DNS minta nem tartalmazott inhibitorokat.

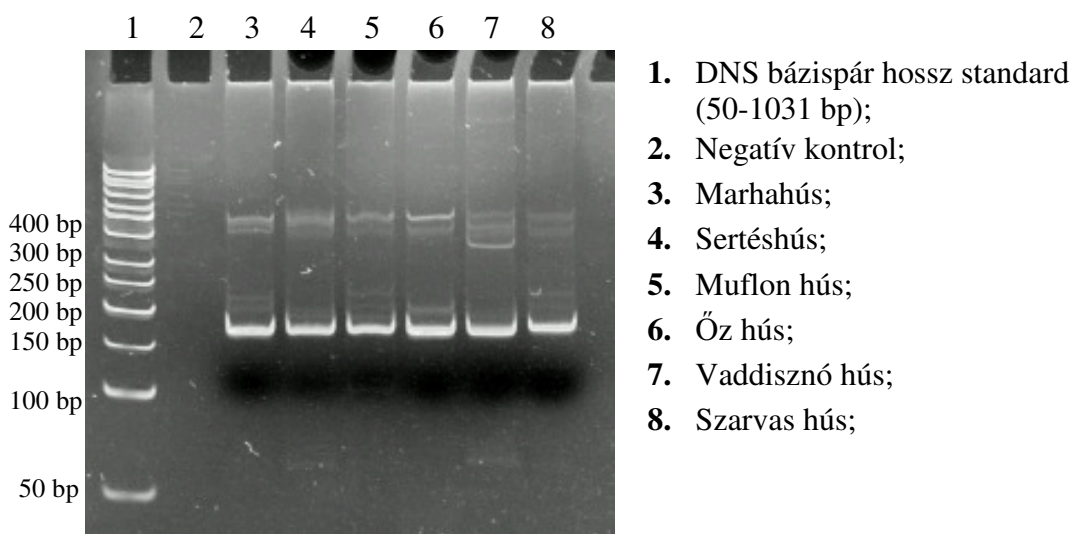


**50. ábra** Fagyasztott haszonállat és vad-húsokból izolált DNS mintákból származó, a citokróm b fehérjét kódoló mitokondriális génre épített, Cytb1-Cytb2 primerrel sokszorozott egyszerű-PCR reakciótermékek elektroforetogramja (359 bp)

A további vizsgálatok során a citokróm b fehérjét kódoló gén 194 bázispár hosszú szakaszának, RD1-RD2 primerpárral történő amplifikációjára épített egyszerű-PCR reakciót végeztem el. Mint az a 51. ábrán látható PCR termék jelet specifikusan csak a vizsgált nagyvad fajok (vaddisznó, őz, szarvas, muflon) DNS mintáiból kaptam. Az RD1-RD2 primerpár a szarvas DNS mintában több helyre is bekapcsolódhatott, ezért ez esetben plusz sávot mutattam ki a 150 bp és a 400 bp körüli tartományban.



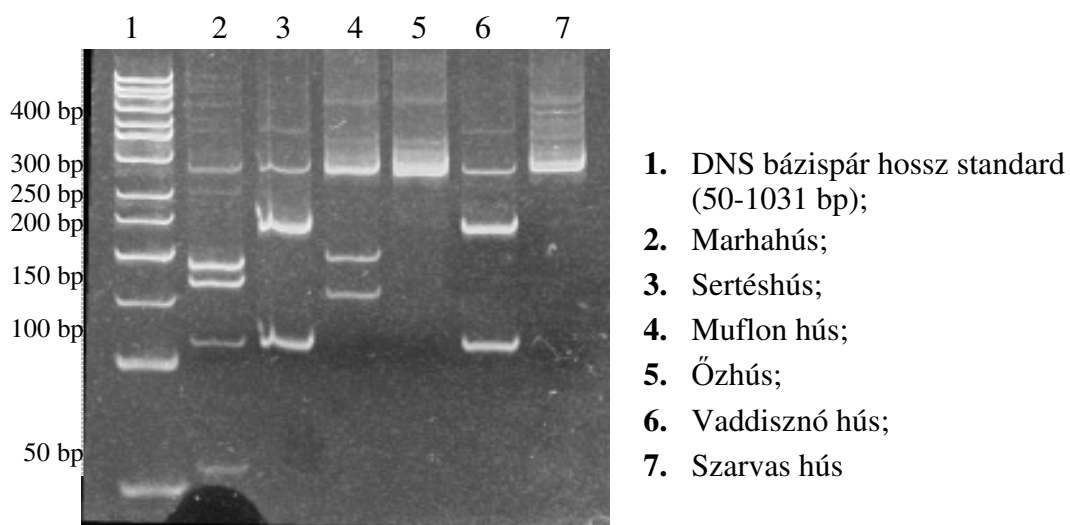
**51. ábra** Fagyasztott haszonállat és vad-húsokból izolált DNS mintákból származó, a citokróm b fehérjét kódoló mitokondriális génre épített, RD1-RD2 primerrel sokszorozott egyszerű-PCR reakciótermékek elektroforetogramja (194 bp)



**52. ábra** Fagyasztott haszonállat és vad-húsokból izolált DNS mintákból származó, a citokróm b fehérjét kódoló mitokondriális génre épített, Scytb1-Scytb2 primerrel sokszorozott egyszerű -PCR reakciótermékek elektroforetogramja (175 bp)

Harmadik típusú vizsgálatként szintén a citokróm b fehérjét kódoló mitokondriális génre épített egyszerű-PCR reakciót végeztem el. Ez esetben az alkalmazott primerpár a Scytb1-Scytb2 volt, melyekkel a gén 175 bp-os szakasza sokszorozható. A Cytb1-Cytb2 primerrel végzett egyszerű-PCR reakcióhoz hasonlóan, minden bevont állatfaj DNS mintája pozitív PCR jelet adott (52. ábra).

Az egyszerű-PCR reakciók után, a szakirodalmi adatok alapján (Meyer et al., 1994) több enzimmel is restrikciós analízist végeztem. Az eredmények azt mutatták, hogy a vizsgálatba vont restrikciós enzimek közül az AluI és HinfI enzimek használhatóak eredményesen, eltérő restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (RFLP) mintázatok nyeréséhez. A vizsgálatok eredményeit a 53-56. ábrákon és 22-27. táblázatokban részletezve mutatom be. A géleket KODAK EDAS 290 rendszerrel fotóztam, majd az egyes sávok méreteit a standard sor alapján, a rendszer KODAK 1D analízis szoftvercsomagjának felhasználásával azonosítottam. A restrikciós mintázatok a számított bázispár méret mellett „abc” betűsorral jelölve, a fajra jellemző egyszerű, egyedi mintázatsort kaphatunk.

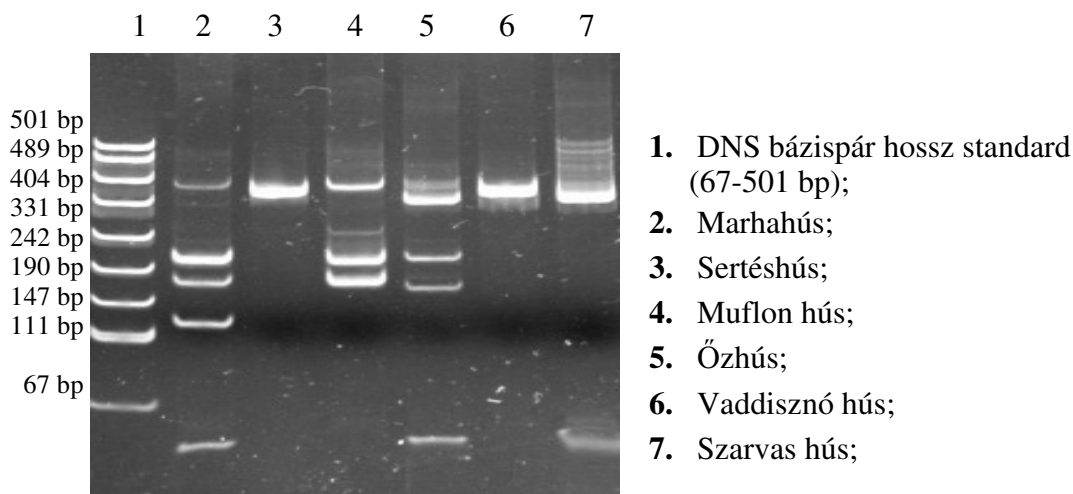


**53. ábra** Fagyasztott haszonállat és vad-húsokból izolált DNS mintákból származó, a citokrom b fehérjét kódoló mitokondriális génre épített, Cytb1-Cytb2 primerrel sokszorozott PCR-RFLP reakciótermékek AluI enzimes restrikciós profilja

Elsőként, a szélesebb körben vizsgált és több referencia eredményt adó 359 bp-os mitokondriális génszakaszra épített PCR-RFLP-t készítettem el. Mint az a 53. ábrán látható hasítási helyet a marha, sertés és vaddisznó esetében találtam, melyek összhangban voltak az irodalommal (Meyer et al., 1995), marha esetében két plusz sávot (117,5; 58,2) is kaptam (22. táblázat). A restrikciós profilt és az állat fajtát tekintve új információt adott őz és muflon fajok vizsgálatba vonása. A muflon esetében a részleges termékhasítás során két fragmens képződött (198 bp, 159 bp), míg az őz és szarvas esetében hasítási hely nem volt.

**22. táblázat** A citokrómban fehérjét kódoló mitokondriális génre épített, Cytb1-Cytb2 primerrel sokszorozott PCR-RFLP reakciótermékek AluI enzimes restrikciós profiljának adatai

| Állatfaj    |                  |              |        |              |              |           |         |
|-------------|------------------|--------------|--------|--------------|--------------|-----------|---------|
|             | Fragmens jelölés | Marha        | Sertés | Muflon       | Őz           | Vaddisznó | Szarvas |
| bp<br>méret | T                | 369,7        | 371,2  | 369,7        | <b>368,2</b> | 363,6     | 374,2   |
|             | A                | -            | 242,7  | -            | -            | 240,3     | -       |
|             | B                | -            | -      | <b>198,1</b> | -            | -         | -       |
|             | C                | 190,0        | -      | -            | -            | -         | -       |
|             | D                | 171,2        | -      | -            | -            | -         | -       |
|             | E                | -            | -      | <b>158,8</b> | -            | -         | -       |
|             | F                | <b>117,5</b> | 117,9  | -            | -            | 114,6     | -       |
|             | G                | <b>58,22</b> | -      | -            | -            | -         | -       |



**54. ábra** Fagyasztott haszonállat és vad-húsokból izolált DNS mintákból származó, a citokrómban fehérjét kódoló mitokondriális génre épített, Cytb1-Cytb2 primerrel sokszorozott PCR-RFLP reakciótermékek HinfI enzimes restrikciós profilja

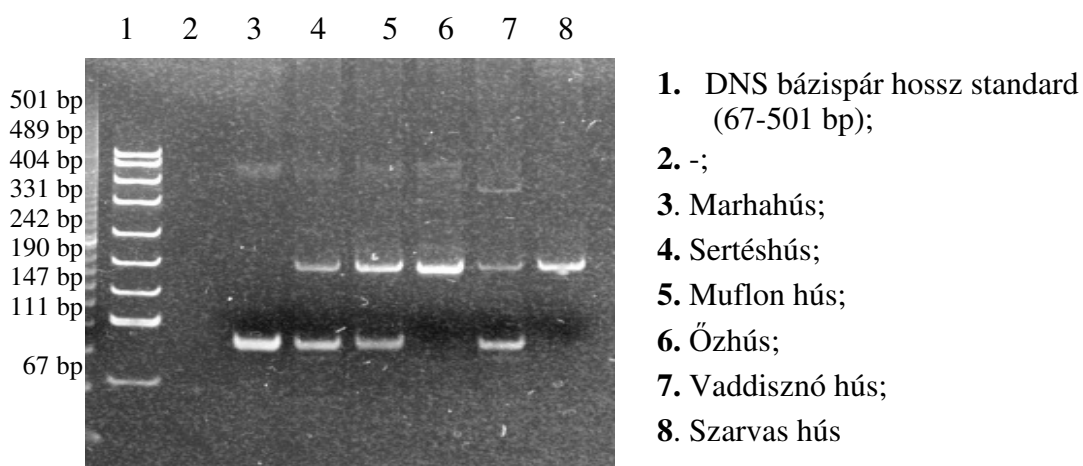
A 54. ábrán a Cytb1-Cytb2 primerrel végzett PCR-RFLP reakció HinfI restrikciós hasítás eredményei láthatóak. A sávmintázatot a szakirodalommal (Meyer et al., 1995) egybevetve a marha- és sertéshús esetében a mintázat egyező eredményt adott, a sertés DNS-ből nyert PCR termék hasítási helyet nem tartalmazott, míg marhahús esetében a részleges hasadás során négy további fragmens keletkezett (210,174,123 és 43 bp méret).

Új eredményeket jelentett a vizsgálat vaddisznó DNS mintájának esetében, ahol az adott, magyar populációból származó mintából (Vecsési vadfeldolgozó, négy egyedi minta) ez a hasítási hely hiányzott. Az őznél (210, 168, 47 bp) és a muflonnál (255, 207, 176 bp) a PCR termék hasítása során három plusz sáv jelentkezett, míg a szarvasnál egy (45 bp), az 50 bp alatti tartományban (23. táblázat). Ezek az eredmények őz esetében az irodalommal egyező eredményt adtak, melyek a muflon minták eredményeivel bővíthetők az eredmények. Partis et al., (2000) kutatási eredményeitől eltérően a szarvas mintában csak 1 restrikciós helyet találtam.

**23. táblázat** A citokróm b fehérjét kódoló mitokondriális génre épített, Cytb1-Cytb2 primerrel sokszorozott PCR-RFLP reakciótermékek HinfI enzimes restrikciós profiljának adatai

| Állatfaj |                  |       |        |        |       |           |         |
|----------|------------------|-------|--------|--------|-------|-----------|---------|
|          | Fragmens jelölés | Marha | Sertés | Muflon | Őz    | Vaddisznó | Szarvas |
| bp méret | T                | 383,6 | 368,3  | 383,6  | 342,9 | 373,4     | 356,5   |
|          | A                | -     | -      | 254,7  | -     | -         | -       |
|          | B                | 209,9 | -      | 207,3  | 209,9 | -         | -       |
|          | C                | 174,2 | -      | 176,4  | 167,8 | -         | -       |
|          | D                | 123,6 | -      | -      | -     | -         | -       |
|          | E                | 43,3  | -      | -      | 47,0  | -         | 45,7    |

A PCR-RFLP technikával további analíziseket végeztem a citokróm b fehérjét kódoló, mitokondriális gén 175 bp szakaszának vizsgálatával, melyek sokszorozását az Scytb1-Scytb2 primerpárral végeztem. Ennek a génszakasznak a PCR-RFLP vizsgálatát olasz szerzők (Branciaro et al., 2000) marha, sertés és baromfi húsok azonosítására használták eredményesen. Mint az a 55. ábrán látható, az őz és szarvas DNS mintázatok egyértelműen elkülönülnek a többi mintától, a PCR terméken restrikciós hasítási hely nem található. A másik három állatfaj esetében a keletkezett PCR termék marha esetében teljesen, sertés, muflon és vaddisznó mintáknál részlegesen elhasadtak, egy átlagosan 94 bázispár méretű termékre (24. táblázat).

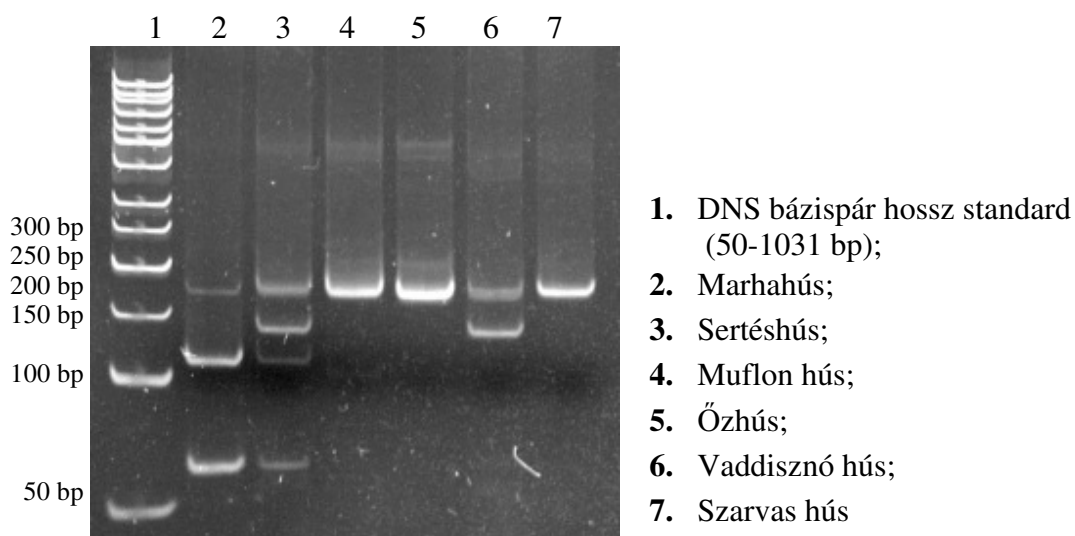


**55. ábra** Fagyasztott haszonállat és vad-húsokból izolált DNS mintákból származó, a citokróm b fehérjét kódoló mitokondriális génre épített, Scytb1-Scytb2 primerrel sokszorozott PCR-RFLP reakciótermékek HinfI enzimes restrikciós profilja

**24. táblázat** A citokróm b fehérjét kódoló mitokondriális génre épített, Scytb1-Scytb2 primerrel sokszorozott PCR-RFLP reakciótermékek HinfI enzimes restrikciós profiljának adatai

| Állatfaj |                   |       |        |        |     |           |         |
|----------|-------------------|-------|--------|--------|-----|-----------|---------|
|          | Fragsmens jelölés | Marha | Sertés | Muflon | Őz  | Vaddisznó | Szarvas |
| bp méret | T                 | -     | 179,3  | 179,9  | 178 | 179,9     | 179,9   |
|          | A                 | 94,8  | 94,5   | 94,8   | -   | 94,1      |         |

A mitokondriális génre épített, Scytb1-Scytb2 primerekkel sokszorozott 175 bázispáros terméken egy Alu I enzimmal is elvégeztem a termékhasítást. Az eredmények marhahús DNS mintájának vizsgálatánál az irodalommal (Branciarri et al., 2000) egybevágtak, részleges termékhasítás során két, 115 és 67 bázispáros termék keletkezett (56. ábra). A sertéshús DNS mintából származó PCR termék esetében azonban az irodalmi hivatkozástól eltérően három fragmenst találtam, 139, 116 és a 67 bázispár mérettartományban. A vizsgálat új adatokat adott a Cervus fajok (szarvas, őz) és a muflon esetében. Ez esetben a PCR terméken hasítási hely nem volt detektálható. A vaddisznó esetében pedig, a sertéstől eltérően egy plusz, 136 bázispáros fragsmens keletkezett (25. táblázat).



**56. ábra** Fagyasztott haszonállat és vad-húsokból izolált DNS mintákból származó, a citokróm b fehérjét kódoló mitokondriális génre épített, Scytb1-Scytb2 primerrel sokszorozott PCR-RFLP reakciótermékek AluI enzimes restrikciós profilja

**25. táblázat** A citokróm b fehérjét kódoló mitokondriális génre épített, Scytb1-Scytb2 primerrel sokszorozott PCR-RFLP reakciótermékek AluI enzimes restrikciós profiljának adatai

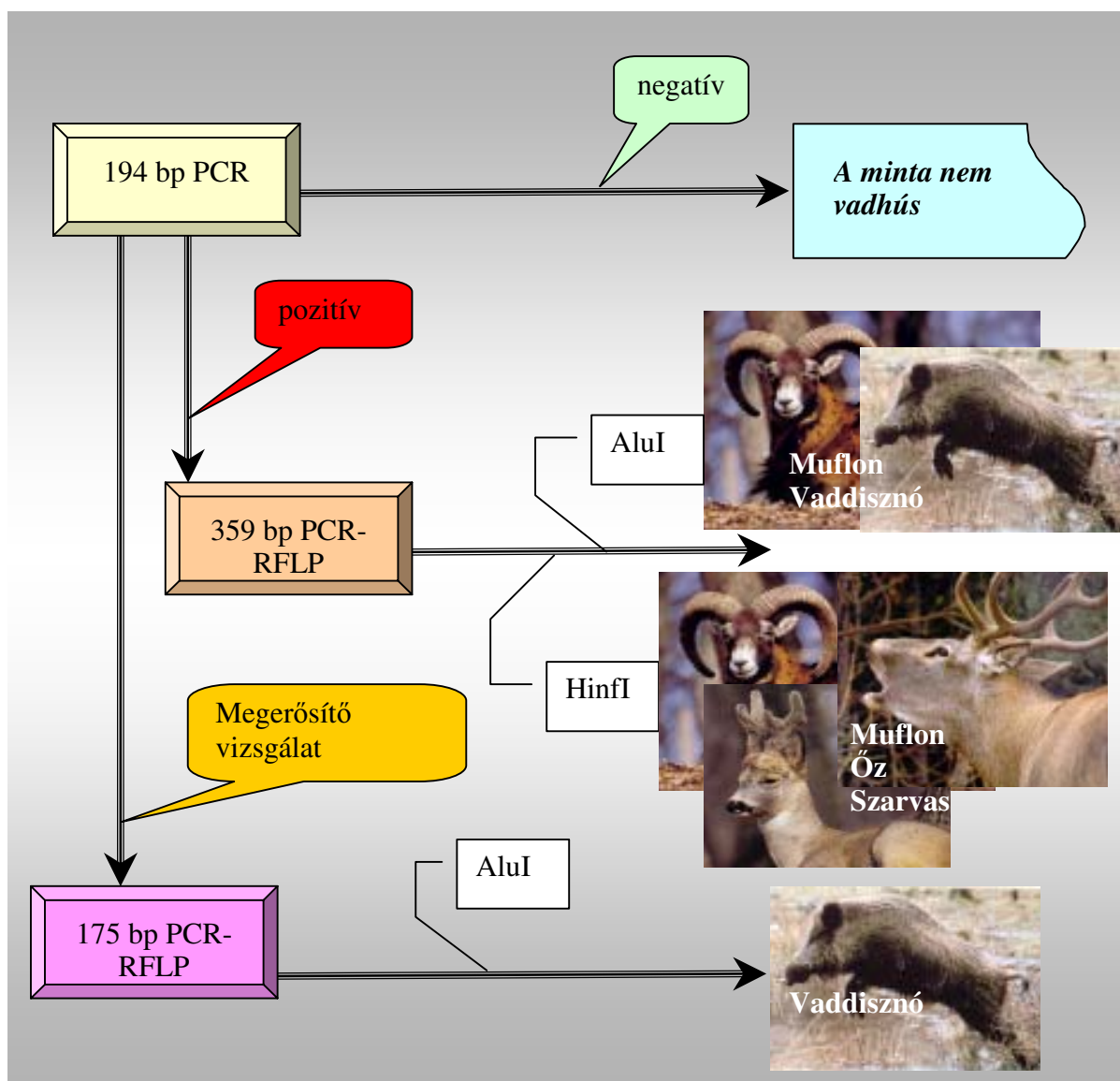
| Állatfaj |                  |       |        |        |       |           |         |
|----------|------------------|-------|--------|--------|-------|-----------|---------|
|          | Fragmens jelölés | Marha | Sertés | Muflon | Őz    | Vaddisznó | Szarvas |
| bp méret | T                | 175,7 | 178,6  | 174,3  | 172,9 | 174,3     | 175,0   |
|          | A                | -     | 139,5  | -      | -     | 136,8     | -       |
|          | B                | 115,3 | 116,3  | -      | -     | -         | -       |
|          | C                | 67,1  | 67,9   | -      | -     | -         | -       |

**26. táblázat** Vadhús vizsgálatok összesítő eredményei

|                      | <b>194 bp</b> | <b>359 bp+AluI</b> | <b>359 bp+Hinfi</b> | <b>175 bp+AluI</b> | <b>175 bp+Hinfi</b> |
|----------------------|---------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| <b>Marha</b>         | -             | + cdfg             | +bcde               | +BC                | +A                  |
| <b>Sertés</b>        | -             | + af               | -                   | +BCD               | +A                  |
| <b>Vaddisznó</b>     | +             | + bf               | -                   | +B                 | +A                  |
| <b>Muflon</b>        | +             | + be               | +abc                | -                  | +A                  |
| <b>Őz</b>            | +             | -                  | +bce                | -                  | -                   |
| <b>Szarvas</b>       | +             | -                  | +e                  | -                  | -                   |
| <b>Specifikusság</b> | <b>Vadak</b>  | <b>M/Mu/S-Vd</b>   | <b>M/Mu/Ő/Sz</b>    | <b>M/S/Vd</b>      | <b>M/S/Vd/Mu</b>    |

A kapott mintázatokat „abc” betűsorral jelezve a 26. táblázatban megadtam a mérések összesítő eredményeit, melyen vázoltam az egyes PCR rendszerek fajelkülönítő méréseit. A 57. ábrán felvázoltam egy olyan összefoglaló sémát, mely segítségével a feltételezhetően vadhúst tartalmazó minta azonosítható és elkülöníthető a vágóállatok húsmintájától. A vizsgálatokhoz a mitokondriális citokróm b fehérjét kódoló gén 194 bp, majd 359 és 175 bázispár méretű szakaszait felsokszorozzuk, majd e két utóbbit enzimesen hasítjuk. A kapott profilképek a megfelelő kontrolok felvitele mellett azonosíthatóak.





**57. ábra** Vadhús azonosítás láncreakciók és restrikciós analízisek sorozatával

## **4.4. Új eredmények**

### **I. Haszonállatok (marha, sertés, csirke) húsmintáinak kimutatása modell rendszerekben**

- 1) A húsipari élelmiszervizsgálatok kibővítése érdekében új, a termékeket jellemző összetételű modellrendszert vezettem be a PCR és PCF-RFLP módszerek adaptációjához.
- 2) A sterilizett, konzerv típusú modellrendszer alkalmazása esetén az erősen fragmentálódott DNS-szakaszokat Amicon Ultraszűrővel besűrítve PCR-sokszorozásra alkalmas, megfelelő mennyiségű és minőségű DNS szakaszokat nyertem.

### **II. Kereskedelmi minták vizsgálata**

- 1) Belföldi húszüzemek által gyártott termékek esetében hézagpótló összesítő adatokat gyűjtöttem a jelölésekben megadott húsösszetétel, és a DNS alapú vizsgálatokkal igazolt faj-specifikus eredet között.

### **III. Haszonállatok (marha, sertés) és nagyvad fajok (vaddisznó, őz, szarvas, muflon) húsmintáinak egymás melletti szelektív kimutatása:**

- 1) A citokróm b fehérjét kódoló, mitokondriális-eredetű gén 194 bp méretű fragmensének RD1-RD2 primerpárral történő sokszorozásán alapuló PCR-rendszer adaptálásával eredményesen különítettem el a hazai nagyvadak (gímszarvas, őz, muflon, vaddisznó) és a haszonállatok hújának DNS mintáit.
- 2) A citokróm b fehérjét kódoló gén, Cytb1-Cytb2 primerpárral sokszorozott, 359 bp-os PCR-RFLP rendszerű vizsgálatával felderítettem, hogy a vecsési vadfeldolgozóból, négy különböző mintából származó vaddisznó DNS mintából hiányzik a HinfI restriktációs enzim hasítási helye, és megállapításaim szerint ez alkalmas lehet a földrajzi eredet meghatározására.
- 3) Vadhúsokból izolált DNS mintákon elsőként alkalmaztam az Scytb1-Scytb2 primerpárral felszaporított, mitokondriális gén citokróm b fehérjét kódoló génszakaszának 175 bp-os fragmensére épített PCR-RFLP eljárást, amellyel lehetővé vált a muflon és a vaddisznó hús elkülönítése a szarvashústól.

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

- Az általam kidolgozott modellrendszerre adaptált, faj-specifikus, növekedési hormont kódoló génre épített PCR és a citokróm b fehérjére épített PCR-RFLP technika egy DNS koncentráló lépés beiktatásával alkalmas sertés, marha, csirke haszonállat fajok, egymás mellett, szelektív azonosítására hústermék alapanyagokban és erősen hőkezelt feldolgozott termékekben. A citokróm b fehérjét kódoló mitokondriális gén PCR-RFLP alapú vizsgálati technikája alkalmas továbbá a vadhúsok szelektív elkülönítésére is.
- A hústermékek jelölési információi és az általam adaptált DNS alapú ellenőrző módszerek összehasonlító elemzése alapján megállapítottam, hogy a nem izom eredetű termékek (zsír, zselatin, bőrke és ínpép, tejpor, tojás) vizsgálata is szükséges a faj-specifikus eredet kimutatására.
- Az általam kifejlesztett két, illetve többkomponensű hústerméket reprezentáló modellrendszerekre alapozott standard sorok alkalmasak lehetnek különböző izolálási módszerek fejlesztésével és összehasonlításával kvantitatív PCR, illetve real-time PCR technikának faj-specifikus vizsgálatainak megalapozására.
- Az általam optimált DNS alapú állatfaj specifikus PCR rendszerek detektálási határértéke lényegesen javítható a minta-előkészítési módszerek finomításával, mely különösen fontos az állati és növényi eredetű allergén kontamináció kimutatása szempontjából.
- A sejtekben nagyobb kópiaszámban jelenlévő mitokondriális DNS-re alapozott PCR módszerek alkalmazásával lehetővé válik az erősen hőkezelt termékek ellenőrzése is.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

### Előzmények, célkitűzések

A húsok és hústermékek alapvető szerepet töltenek be táplálkozásunkban, elsősorban nagy biológiai értéket képviselő fehérje és kedvező makroelem összetételükkel fogva. A különböző húsok azonosítása napjainkban egyre fontosabbá váló feladat, mivel az élelmiszeriparban is meghatározóvá válik a fogyasztóvédelem és a minőségbiztosítás. Az állatfajok azonosítása a termékhamisítás, egészségvédelem, export-import ellenőrzések, vallási fogyasztási tabuk, állatvédelem, bűnügyek felderítésének területein válhat jelentőssé. Az élelmiszeripar számára a termék összetétel-jelölés szabályozását tekintve a 2003. évi LXXXII. Élelmiszer Törvény, a Magyar Élelmiszerkönyv 1-3/13-1 Egyes hústermékek és a 2-13 Hústermékek fejezetei irányadóak. Ennek megfelelően szükség van olyan analitikai módszerek kidolgozására és fejlesztésére, melyekkel egy összetett élelmiszerrendszerben is megvalósítható a szelektív, faj-specifikus eredet azonosítás.

Az irodalom számos módszert ismertet, melyek jelentős része a gyakorlatban is alkalmazott fehérje vagy DNS alapú azonosítás elvén működik. Az izoelektromos fókuszálás (IEF) és az immunanalitikai technikák (ELISA, Immunkromatográfia) általánosan használt fehérje alapú módszerek. Az izoelektromos fókuszálás alapja a fehérjék pH gradiensben történő elválasztása, mely elválasztást követően a fehérjesávok *Commassie blue*, ezüst vagy pszeudoperoxidáz festéssel tehetőek láthatóvá. Azonban ezek a módszerek nem alkalmasak hőkezelt hústermékek vizsgálatára, mivel a legtöbb oldható fehérje a hőkezelési tartósítási eljárások során aggregálódik vagy degradálódik. A húsfehérjék és ellenanyagok kovalens kötésű immunkomplexének kimutatásán alapuló immunanalitikai technikák egy része hőkezelt termékek esetében is működik. Hátrányuk azonban, hogy egyes fajok (csirke-pulyka; sertés-vaddisznó; marha-birka-szarvas) egymás melletti kimutatása esetében a kifejlesztett immunszérumok keresztaktivitást mutathatnak. Emellett probléma lehet az is, hogy a fehérjék mennyisége kortól, fajtától, takarmányozástól és szövet típustól függő ingadozást mutat. A DNS-alapú módszerek nagy előnye, hogy a DNS szekvencia az adott élőlényre jellemző, minden sejtjében azonos és nem változik meg a hőkezelés hatására, viszont a vizsgálati módszereknél figyelembe kell venni a fragment-méret jelentős csökkenését. A technikák közül leginkább a DNS sokszorozódáson alapuló PCR módszerek (egyszerű PCR, RAPD-PCR, multiplex PCR, PCR-RFLP, real-time PCR) különböző változatai terjedtek el.

Mindezek ismeretében, célom volt olyan DNS alapú PCR technikák alkalmazása, tesztelése és fejlesztése, mellyel mind a haszonállatok (sertés, marha, csirke, pulyka), mind a nagyvad fajok húsmintái (vaddisznó, őz, muflon, gímszarvas) egymás mellett, szelektíven meghatározhatóak, illetve feldolgozott, erősen hőkezelt élelmiszerből is kimutathatók.

## Vizsgálati módszerek

**Vizsgálati minták.** A sertés és marha húsokat közvetlenül a vágóhídról, a csirke és pulyka húsokat kereskedelmi forgalomból szereztem be. A vadhúsok a Mavad Rt. Vecsési és az Öreglaki Vadfeldolgozóból származtak, a muflon húst a Pilisi Parkerdő Gazdaság biztosította számomra. A PCR módszer tesztelésére 30 % összhús tartalmú vörösáru modellt és 60 % összhús tartalmú, konzerv modellt használtam fel, melyek hozzáadott sót, vizet és szójafehérje- izolátumot is tartalmaztak.

**Polimeráz láncreakción alapuló technika.** A DNS izolálást proteináz-K enzim előkezelést követően Wizard technikával végeztem húsmintákból, összetett modellekből és élelmiszerekből (sonkák, vörösáruk, májasok és konzervek). A sterilizett mintáknál és konzerv élelmiszereknél a mintamátrix izolálás előtti bekonzentrálása Amicon ultraszűrő rendszert használtam fel. A tiszta DNS oldat koncentrációjának és tisztaságának ellenőrzésére spektrofotometriás mérést, összetöredezettisének meghatározására agaróz gél-elektroforézist végeztem. A sokszorozódó DNS szakasz a sertés-specifikus primerpár (Sw01-Sw02) esetében a növekedési hormont kódoló gén 108 bázispár hosszúságú szakasza) volt. A kimutatás, marha esetén szintén a növekedési hormont kódoló gén 130 bázispár hosszú szakaszának felsokszorozása Ca03-Ca04 primerpár segítségével történt. A mitokondriális, citokróm b fehérjét kódoló gén 359 bp-os fragmensének PCR-RFLP vizsgálatán alapult a csirke, a 175 bp, 194 bp és 359 bp szakaszának felsokszorozásán a vadhúsok specifikus meghatározása. A restrikciós fargmenthossz polimorfizmus kimutatásán alapuló vizsgálatoknál a PCR termékeket RsaI (5'..GT↓ AC..3'), AluI (5'.. AG↓CT..3') és HinfI (5'..G↓ANTC..3') restrikciós enzimekkel hasítottam. A termékanalízist poliakrilamid gélelektroforézissel végeztem a géleket etidium-bromiddal festettem, majd megfelelő szűrőfeltét alkalmazása mellett KODAK EDAS 290 rendszerrel fotóztam és értékeltem.

## Kísérleti eredmények

### Haszonállatok húsmintáinak egymás melletti szelektív, faj-specifikus meghatározása, összetett modell rendszerekben és élelmiszermintákban PCR és PCR-RFLP módszerekkel

Különböző haszonállat fajokból származó minták (marha, sertés, csirke) egymás melletti szelektív, kimutatását végeztem el DNS alapú polimeráz láncreakcióval. A módszer megalapozása, a DNS kivonás hatékonyságának vizsgálata és a láncreakciók kimutatási határértékének meghatározása több komponensű húsmodellek alapján történt. A marha- és sertés-eredetű összetevők azonosítására a növekedési hormont kódoló, genomiális DNS 130 bp és 108 bp hosszú szakaszán alapuló egyszerű-PCR technikát használtam fel, ahol PCR termék csak az adott faj húsmintájának esetében képződött. A csirke komponensek kimutatására a mitokondriális gén, citokróm b fehérjét kódoló régiójának Cytb1 –Cytb2 primerpárral felszaporított 359 bp hosszú szakaszának fragmenthossz-polimorfizmusán alapuló PCR (PCR-RFLP) rendszert alkalmaztam. Itt minden faj húsból képződik PCR termék, majd ezt RsaI (5'..GT↓AC..3') restrikciós enzimmel hasítva csak a csirke és pulyka esetében kaptam kettő (210 bp, 149 bp), illetve három (149 bp, 109 bp és 101 bp), kisebb méretű fragmentum nyerhető. A módszerek beállításához meghatároztam a primerek specificitását és a láncreakció kimutatási határértékét, hígított DNS oldat segítségével. A konzerv modellek és az élelmiszerek fragmentálódott DNS tartalmának kinyerésére megnöveltem a vizsgálatba vont minta mennyiségét (300mg-ról 1,5 g-ra) és az enzimes előkezelés után a mintatérfogatot szűrőssel koncentráltam. Ezzel a módosítással egy lépésben növelhető volt a DNS kinyerés. A kialakított módszereket laboratóriumban előállított, nyers hús-hús keverékeken, összetett, vörösáru típusú (72 °C maghőmérséklet) és sterilizett konzerv (115 °C maghőmérséklet) modelleken teszteltem. Az izolálás során 300 mg mintából kinyerhető összes DNS mennyisége a kiindulási nyers massa átlagosan 24-29 µg mennyiségéről, sterilizett mintában a kinyerés lecsökkent átlagosan 7-9 µg-ra. Ezzel párhuzamosan a DNS átlagos fragmens-mérete 500 bp alá esett vissza. Élelmiszerekben, mintától és terméktípustól függően 8 - 45 µg DNS/ 300 mg minta volt kinyerhető. Sterilizett mintáknál a bekonzentrálással a modellekben 20-37 µg, a termékekben 127-320 µg DNS izolálható egy lépésben 1,5 g kiindulási anyagból.. Ez utóbbi eltéréseket az magyarázza, hogy a konzervek egy része májat tartalmazott, melynek izolálható DNS tartalma az izomszövetnél nagyobb és a hozzáadott (modellben nem szereplő) zöltségek és fűszerek is DNS hordozók voltak. Ennek modellezése további kísérleteket igényel.

Megállapítottam, hogy az ismert összetételű mintákkal nyers és vörösáru típusú, összetett modellrendszerben a kimutatás 0,5 % határérték mellett megvalósítható. Konzerv modellkeveréknél a feldúsított DNS tartalom kombinálva egy nagyobb ciklusszámmal 10 %-os szintű kimutatást tett lehetővé.

A továbbiakban a beállított módszerekkel kereskedelemből származó húsipari termékminták elemzését végeztem el marha, sertés, csirke és pulyka eredetű összetevők kimutathatóságára, majd az eredményeket összevetettem a címke jelölésekkel, figyelembe véve a nem hús eredetű összetevőket is. A vizsgálatok során eltéréseket tapasztaltam minden vizsgált termék csoportban (párizsi 23%, virsli 10%, májas 6%, konzervek 6%). Élelmiszervizsgálati eredményeimmel hézagpótló adatokat gyűjtöttem a belföldi gyártóktól származó, húsipari termékek DNS alapú jellemzésével.

### **Vadhúsok egymás melletti meghatározása**

Kutatásaim mási iránya a vadhúsok egymás melletti meghatározása és a haszonállatoktól való elkülönítése volt. Ez esetben több, a mitokondriális gén 175 bp, 194 bp és 359 bp szakaszát sokszoroztam, majd a PCR termékeket AluI (5'.. AG↓CT..3') és HinfI (5'..G↓ANTC..3') restrikciós enzimekkel hasítottam el. A vizsgálatok során eredményesen különítettem el a hazai nagyvadak (gímszarvas, őz, muflon, vaddisznó) húsmintáit a haszonállatokból származó húsmintáktól a citokróm b fehérjét kódoló gén kimutatásán alapuló 194 bp egyszerű-PCR rendszer felhasználásával. A nemzetközi irodalomban publikált eredményektől eltérően, a Vecsési feldolgozóból származó vaddisznó minták mitokondriális génre épített 359 bp PCR-RFLP rendszerben történt vizsgálati eredményei azt mutatták, hogy ennél a populációnál hiányzik a HinfI restrikciós enzimes hasítási hely. Vadhúsokból nyert DNS mintákra elsőként alkalmaztam a citokróm b fehérjét kódoló génre épített 175 bp PCR eljárást, melynek segítségével el tudtam különíteni a muflon és vaddisznó húsokat a szarvas-félék mintáitól.

## **Következtetések, javaslatok**

Az egyszerű-PCR és a PCR-RFLP módszerek az általam kidolgozott modellrendszer és koncentráló lépés együttes alkalmazásával megfelelő analitikai módszert fejlesztettem az állatfajok egymás melletti, specifikus kimutatására húsipari alapanyagokban és a feldolgozott húskészítményekben egyaránt.

A továbbiakban azonban lényegesnek tartom a nem izom eredetű összetevők (zsír, zselatin, bőrke és ínpép, tojás) vizsgálatát is, mivel pozitív eredményt adhatnak PCR rendszerben, amennyiben a termékekben megtalálhatóak. A sokszorozandó génszekvenciák kiválasztásánál mitokondriális DNS módszerek alkalmazását javaslom az erősen hőkezelt, vagy az olajban sütött termékek elemzésére, a sejtekben lévő nagyobb kópiaszámuk miatt. Nagy érzékenységű, minőségi és mennyiségi vizsgálatokra alkalmazható láncreakciós rendszerek kidolgozásához javaslom a mintavételi módszerek egységesítését, különböző izolálási módszerek fejlesztését és összehasonlítását, valamint a mennyiségi analitika megalapozásához a megfelelő referencia standard sorok kidolgozását.



## 7. SUMMARY

### Introduction

Authenticity testing of the animal species present in food is important for economic, safety, legal, religious and health reasons. Food labelling regulations require that the species of meat in food products are accurately declared to the consumer. This has led to the need for reliable and specific methods of meat species determination in a variety of products where meat may be comminuted, mixed with other ingredients and processed. A variety of analytical approaches for species identification have been described in the literature, which can be based on either protein or DNA detection methods. Isoelectric focussing (IEF) and immunoassays (ELISA, immunostrip) are the most commonly used protein-based techniques nowadays. Isoelectric focussing is based on the separation of proteins on polyacrilamid gel by the use of a pH-gradient and on the subsequent staining of the proteins by using comassie blue, silver or pseudoperoxidase staining methods. It has been reported that IEF is not suitable for the processed meat products, because most soluble proteins degrade very rapidly under such conditions. Certain immunoassays have been shown are working for the heated proteins. The disadvantage of immunoassays is the restricted availability of antibodies free from many cross-reactions to with the related organism. Furthermore the presence of proteins is always a function of age, race, maturity and type of tissue in which they are expressed.

For the identification of species, it is preferable to detect DNA. It is identical in all cell types of an organism, therefore it is not essential whether the DNA is extracted from the muscle, fat or offal. DNA hybridisation and polymerase chain reaction (PCR) offer analytical approaches based on nucleic acid to identify species specificity. PCR restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) is nowadays the most widely used method of identifying different fish and meat species. Most of these methods use the highly conserved regions of cytochrome b gen as a target sequence.

I have adopted and developed assays based upon PCR and PCR-RFLP amplification of genomic and mitochondrial genes for species-specific detection of bovine, porcine chicken from processed meat products and game meat (wild boar, moufflon, red deer, roe deer) from raw meats.

## Materials and methods

Samples of fresh raw meats (beef, pork, chicken, turkey) and frozen game meat (wild boar, moufflon, roe and red deer) were obtained from slaughterhouses (Bicske, Vecsés, forestry of Pilis), processed meat were purchased from local supermarkets.

DNAs from beef, pork, chicken, turkey and game meat species were obtained by extraction using the Wizard DNA Clean up purification kit (Promega) and modified CTAB methods. Isolations of DNA from heat-treated model matrixes (beef-pork and chicken-pork meat contained matrix-mixtures), commercial meat products (ham, sausage, liver pie) were performed using Wizard DNA Clean up purification system. This method was used to purify DNA from sterilized models and luncheon meat after the samples were concentrated by Amicon ultra filtrate system (Millipore). Extracted DNA was stored in Tris-EDTA buffer and quantified spectrophotometrically. The average size of DNA fragments was analysed using 2 % agarose-gelelectrophoresis.

Polymerase chain reaction. The primers were designed from the growth hormone gene of beef (130 bp) and pork (108 bp). In case of chicken species-specific detection 359 bp PCR-RFLP method was used, based on amplification and RsaI (5'..GT↓AC..3') digestion of mitochondrial gene fragment. Three of PCR and PCR-RFLP assays were used to find the differences between game and domesticated animal meat samples. Three primer pairs amplify 175 bp, 194 bp and 359 bp length fragments from the mithochrondrial gene. The PCR products were digested with restriction enzymes AluI (5'.. AG↓CT..3') and HinfI (5'..G↓ANTC..3'). Amplifications were performed in a final volume of 50 µl in thin walled PCR tube containing 1x Sigma Ready mix, 0,5 mM primer.

PCR products were identified by separation on 10 % polyacrylamide gel in TBE running buffer, for 1 h at 200 V and ethidium bromide was used for the visualisation. The gels were documented with Kodak EDAS 290 system.

## Results

### Detection of pork, beef and chicken meat in meat-model matrixes and food products by PCR and RFLP-PCR methods

DNAs purified from meat of various animal species and heat-treated, complex model matrixes (meat, water fat, soy protein) were subjected to agarose gelelectrophoresis. DNA fragments originated from raw and heat-treated models had about 20.000 bp of average size . The average size of DNA fragments isolated from autoclaved meat was very low, around 300 bp. The amount of extracted DNA ranged from 24 to 29 µg / 300 mg raw sample and 7 to 9 µg / 300 mg autoclaved sample. After using of Amicon ultra filtrating system combined with 1,5 g starting sample mass, the amount of extractable DNA could be raised up to 20-37 µg in the case of autoclaved models. The yields of DNA ranged from 8 to 45 µg / 300 mg for the heat-treated meat products and 127-320 µg / 1500 mg for the autoclaved food samples.

The pork and beef PCR assays demonstrated to be highly specific for porcine/ beef DNA, producing an amplification product of the expected size of 108 and 130 bp. No amplification product was obtained from chicken and poultry DNA. With 35 amplification cycles, using ethidium-bromide-based detection the minimum detection level was 0,5 % for the raw and the heat-treated model mixtures using pork, beef or chicken specific PCR assays respectively. The primers did not have any cross-reactivity with plant-derived soy or wheat DNA.

The 359 bp fragment of cytochrome b gene could be amplified successfully from pork, beef and poultry DNA. RsaI (5'..GT↓AC..3') restriction sites were found in cyt b amplicon from DNA of chicken and turkey origin. Whereas the RsaI fragments of chicken were 210 bp and 149 bp long and the poultry amplicon yielded RsaI fragments 149 bp, 109 bp and 101 bp long.

In the case of sterilized matrix a filter concentrator was used to raise the recoverable DNA content. Using this concentration step the detection limit could be lowered up to 10 % from sterilized models. 40 commercially purchased heat-treated meat products were tested using these assays and the results were compared with the labelling. Depending on the product type, 0,5 -23 % of the samples were falsely labelled (sausage 23 %, Frankfurter type of sausage 10 %, liver pie 6 %, canned products 6 %)

## **Detection of game meat species**

The polymerase chain reaction-restriction length polymorphism was applied to species identification of raw meat from wild animal (wild boar, red deer, roe deer, moufflon). The sequences selected for amplification was a 359, 194 and a 175 base pair fragment of the mitochondrial cytochrome b gene as a part of the template DNA. A 194 bp signal was obtained from game samples, but any bands were detected in the case of beef and pork meats. The 359 bp and the 175 bp fragment was amplified as a product of PCR from each species, but in the AluI and Hinf I restriction fragment pattern we could find enough differences for the identification of the individual species. In contradiction to special literature the restriction point was not found in the 359 bp length product of the wild boar. It was the first investigation when the analysis of 175 bp products was applied in case of the wild animals.

## **Conclusion**

The PCR and PCR-RFLP methods combined with model-matrix systems and DNA concentration step developed by me is a useful analytical method for the identification of different animal species in raw materials and processed foods.

In the future I am paying a great importance to the investigation of non-meat origin type ingredients in the meat products such as fat, gelatine, milk powder and egg. It would be interesting to learn, if they are present in the products and in what extent they can give overlapping results in the PCR system. I would suggest the refinement and standardisation of the sampling methods in the development of such chain reaction systems, which are highly sensitive and could be applied for quantitative analysis as well. In addition I would propose the application of the mitochondrial DNA based methods for the selection of the gene sequences which must be multiplied for the analysis of the strongly heat-treated or fried products because of their higher copy number presented in the cells.

## 8. MELLÉKLETEK

### M1. Irodalomjegyzék

#### Jogszabályok, előírások:

1995. évi XC. törvény az élelmiszerekről.

1996. évi LV. törvény a vad védelméről, a vadgazdálkodásról, valamint a vadásatról.

1997. évi CLV. törvény a fogyasztóvédelemről.

2003. évi LXXXII. törvény az élelmiszerekről.

2004. évi XCIV. törvény a vad védelméről, a vadgazdálkodásról, valamint a vadásatról szóló 1996. évi LV. törvény módosításáról.

2004. évi XVI. törvény a fogyasztóvédelemről szóló 1997. évi CLV. törvény módosításáról.

2003. évi CXII. törvény az egyes földművelésügyi ágazati törvények módosításáról.

1/1996. (I. 9.) FM-NM-IKM együttes rendelet a 1995. évi XC. törvény végrehajtásáról.

9/2002. (I.23.) FVM rendelet a vadon élő állat és a tenyésztett vad elejtéséről, húsvizsgálatáról és forgalmáról, valamint a házinyúl húsvizsgálatáról.

19/2004. (II. 26.) FVM-ESZCSM-GKM együttes rendelete az élelmiszerek jelöléséről.

167/2004. (XI. 29.) FVM-EÜM-GKM együttes rendelet az élelmiszerek jelöléséről szóló 19/2004. (II. 26.) FVM-ESzCsM-GKM együttes rendelet módosításáról.

56/2005. (VI.25) FVM rendelet: a vad védelméről, a vadgazdálkodásról, valamint a vadásatról szóló 1996. évi LV. törvény végrehajtásának szabályairól szóló 79/2004. (V.4.) FVM rendelet módosításáról.

90/2005. (X. 13.) FVM-EÜM-GKM együttes rendelet, az élelmiszerek jelöléséről szóló 19/2004. (II. 26.) FVM-ESZCSM-GKM együttes rendelet módosításáról.

Magyar Élelmiszerkönyv, 1-3/13-1 számú előírás, Egyes húskészítmények (2004)

Magyar Élelmiszerkönyv, 2-13 számú irányelv, Húskészítmények (2004)

## Irodalmi források:

- AUSUBEL, F.M. et al. (1989) Short Protocols in Molecular Biology. New York: Wiley.
- BÁLINT, M. (2000): Molekuláris biológia I. Budapest: Műszaki könyvkiadó. 207.p.
- BÁLINT, M. (2000): Molekuláris biológia II.. Budapest: Műszaki könyvkiadó. 207.p.
- BAUER, F. (1981): Identifizierung nahe verwandter Tierarten mittels Ultradünnschicht-isoelektrischer Fokussierung. In: 27. *Europäischer Fleischforscherkongreß*, Wien, Proc. S 602-604. p.
- BAUER, F.K., HOFMANN, K. (1987a): Elektrophoretische Tierartbestimmung Steigerung der Empfindlichkeit durch Peroxidasefärbung der Myoglobine. *Fleischwirtschaft*, 67 861-867. p.
- BAUER, F.K., HOFMANN, K. (1987b): Empfindlicher Nachweis von Schweinefleisch in erhitzten Rindfleisch/Schweinefleisch Mischungen. *Fleischwirtschaft*, 67 1141-1144. p.
- BERGER, R.G., MAGEAU, R.P., CHWAB, B., JONSTON, R.W. (1988): Detection of poultry and pork in cooked canned meat foods by enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of AOAC*, 71 406-409. p.
- BRANCIARI, R., AVELLINI, P., SUKASI-SANGAMAYYA, R., DI ANONIO, E. (2000): PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) analysis for species determination in heat-treated meat products. *Industria Alimentari*, marz 313-318. p.
- BRODMANN, P.D., MOOR, D. (2003): Sensitive and semi-quantitative TaqMan real-time polymerase chain reaction system for the detection of beef (*Bos taurus*) and the detection of the family Mammalia in food and feed. *Meat Science*, 65 599-607.p.
- CANDRIAN, U., LÜTHY, J. (1991): Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik. *Chimia*, 45 49-52. p.
- CÉSPEDES, A., GARCIA, T., CARRERA, E., GONZALES, I., SANZ, B., HERNANDEZ, P.E., MARTIN, R. (1998): Identification of flatfish species using Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification and restriction analysis of cytochrome b gene. *Journal of Food Science*, 63 (2) 206-209. p.
- CHIKUNI, K., TANABE, R., KOSUGIYAMA, M., MONMA, M. (1994): Polymerase Chain Reaction assay for detection of sheep and goat meats. *Meat Science*, 37 337-345. p.
- COLOMBO, F., VIACAVA, R., GIARETTI, M. (2000): Differentiation of the species ostrich (*Struthio camelus*) and emu (*Dromaius novaehollandiae*) by polymerase chain reaction using an ostrich-specific primer-pair. *Meat Science*, 56 15-17. p.
- DAVIS, C. E., BRACEWELL, A.J., ANDERSON, J.B., REAGAN, J. O. (1985): Time temperature heating effect on biuret-positive water-extractable porcine and bovine muscle proteins. *Journal of Food Protection*, 48 (3) 215-220. p.

- DI PINTO, A., FORTE, V.T., CONVERSANO, M.C., TANTILLO G.M (2005) Duplex polymerase chain reaction for detection of pork meat in horse meat fresh sausage from Italian retail sources. *Food Control*, 16 391-394 p.
- DOOLEY, J.J., PAINE, K.E., GARRETT, S.D., BROWN, H. M. (2004): Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. *Meat Science*, 68 431-438. p.
- EBBEHOJ, K. F., THOMSEN, P. D. (1991): Species Differentiation of Heated Meat Products by DNA Hybridization. *Meat Science*, 30 221-234. p.
- FISCHER, C., HOFMANN, K., BLÜCHEL, E. (1978): Elektrophoretische Untersuchungen der Proteine von Sarkoplasma und Myofibrillen in normalen und PSE-Fleisch beim Schwein. *Fleischwirtschaft*, 58 303-306. p.
- GARCIA, T., MARTIN, R., MORALES, P., HAZA, A., ANGUITA, G., GONZALES, I., SANZ, B., HERNANDEZ, P.E. (1994): Production of a horse specific monoclonal antibody and detection of horse meat in raw meat mixture by an indirect ELISA. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 66 411-415. p.
- GARDNER, E.J. & SNUSTAD, D.P. (1984): Principles of genetics. New York: Wiley.
- GAZZAZ, S. S., RASCO, B. A., DONG, F. M. (1992): Application of immunochemical assays to food analysis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32 (3) 197-229. p.
- GOODWIN, P. (1992): Immunoassay methods for animal specification. 33-39. p. In MORGAN M.A., SMOITH C.J., WILLIAMS P.A. (eds) *Food safety and quality assurance: application of immunoassay system*. London: Elsevier Sci.Publ.
- GRIFFITHS, N. M., BILLINGTON, M. J. (1984): Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay beef blood serum to determine indirectly the apparent beef content of beef joints and model mixtures. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 35 909-914. p.
- GRUNDHÖFER, F. (1982): Tierartbestimmungen in der Lebensmittelüberwachung mit Hilfe der Ultradünnschicht-isoelektrischen Fokussierung auf miniaturisierten Gelen. p. 72-74 In: *Elektrophorese forum '82* 3. Diskussionstagung Techn. Univ. München
- HAJÓS, GY. (2000): A húsfehérjék humánbiológiai megítélése. *A Hús*, 1 16-18. o.
- HAMM, R. (1977): Changes of muscle proteins during the heating of meat in: Höyem T. & Kvale O (eds): *Physical, chemical and biological changes in food caused by thermal processing* London: Applied Science Publishing
- HERNÁNDEZ, P.E., MARTÍN, R., GARCÍA, T., MORALES, P., ANGUITA, G.,HAZA, A.I, GONZÁLES, I., SANZ, B. (1994): Antibody-based analytical methods for meat species determination and detecting adulteration of milk. *Food & Agricultural Immunology*, 6 95-104. p.
- HIRD, H., CHISHOLM, J., BROWN, J., (2005): The detection of commercial duck species in food using a single probe-multiple species-specific primer real-time PCR assay *Eur.Food Res.Technology*, 221 559-563.p.

- HOFMANN, K. (1973): Unterscheidung des Fleisches von Rind, Schwein, Hammel und Pferd mit Hilfe der Elektrophorese. *Jahresb. Bundesanstalt für Fleischforschung*, 67-68. p.
- HOFMANN, K. (1985): Principal Problems in the Identification of Meat Species of Slaughter Animals using Electrophoretic Methods. p. 9-31. In Patterson R.L.S. (ed.): *Biochemical Identification of Meat Species*, London and New York: Elsevier Applied Sci. Pub. 213 p.
- HOFMANN, K. & BLÜCHEL, E., (1986): Tierartbestimmung von hocherhitztem Fleisch und Fleischkonserven durch isoelektrische Fokussierung und empfindliche Silberfärbung. *Fleischwirtschaft*, 72 (1) 85-89.p.
- HOLLAND, P.M., ABRAMSON, R.D., WATSON, R., GELFAND, D.H.(1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. In: *Proceedings of Natl.Acad. Sci. USA*, 88 7276-7280.p.
- HUFF-LONERGAN, E., F. C. PARRISH, JR., ROBSON, R. M. (1995) Effects of postmortem aging time, animal age, and sex on the degradation of titin and nebulin in bovine longissimus muscle. *J. Anim. Science*, 73 1064–1073.p.
- JANSSEN, F.W., HAGELE, G.H., BUNTJER, J.B., LENSTRA, J.A. (1998): Species identification in meat by using PCR-generated satellite probes. *J. of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21 115-120.p.
- KHORANA, H.G. (1971) Study on polynucleotides: repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *Journal of Molecular Biology*, 56 341. p.
- KOCH, M.C., LIM C.H., CHUA S.B., CHEW S.T., PHANG S.T.W. (1998) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints for identification of red meat animal species. *Meat Science*, 48 275-285. p.
- KOCHER, T.D., THOMAS, A., MEYER, S.V., EDWARDS, S., PÄBO, F.X (1989): Dynamic of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. In: *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 86 6196-6200. p.
- LAUBE, I., SPIELBERG, A., BUTSCHKE, A., ZAGON, J., SCHAUZU, M., KROH, L., BROLL H. (2003): Method for the detection of beef and pork in foods using real-time polymerase chain reaction. *Int. Journal of Food Science and Technology* 38, 111-118. p.
- LÁSZTITY, R. (1980): A hús kémiaja és fizikája. Kézirat, BME Vegyészmérnöki kar Mosonmagyaróvár
- LOCKLEY, A.K., BARDSLEY, R.G. (2000) DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology* 11, 67-77. p.
- LOCKLEY, A. K., RONALD, G. (2002): Intron variability in an actin gene can be used to discriminate between chicken and turkey DNA. *Meat Science*, 61 163-168. p.
- LUNGSTRÖM, I., ENGVALL, E., RUITENBERG, E.J. (1974): ELISA- Enzyme –linked immunosorbent assay- in serological diagnosis of *Trichinella spiralis* infection. In: *Proceedings of third international congress of parasitology*, Vol I. II. III. Vienna: Facta Publications 1204-1205.p.



- MANIATIS, T., FRIRSCH, E. F., SAMBROOK, J. (1989): Molecular cloning, New York: Cold Spring Harbor
- MANN, M., BAUER, F. (1991): Influence of storage, salting, curing and heating on the electrophoretic behaviour of sarcoplasmic proteins. 37<sup>th</sup> ICOMST, Proc. Kulumbach Vol. II. 1163-1166. p.
- MARTENS, H., STABURVIK, E., MARTENS, M. (1982): Texture and colour changes in meat during cooking related to thermal denaturation of muscle proteins. *Journal of Texture Studies*, 13 291-309. p.
- MARTIN, R., AZCONA, J.I., CASAS, C., HERNANDEZ, P.E., SANZ, B. (1988a): Sandwich ELISA for detection of pig meat in raw beef using antisera to muscle soluble proteins. *Journal of Food Protection*, 51 790-794. p.
- MARTIN, R., AZCONA, J.I., CASAS, C., HERNANDEZ, P.E., SANZ, B. (1988b): A sandwich ELISA for detection of horse meat in raw meat mixtures using antisera to muscle soluble proteins. *Meat Science*, 22 143-153. p.
- MARTIN, R., AZCONA, J.I., TIRMO, J., HERNANDEZ, P.E., SANZ, B. (1988c): Detection of chicken meat in raw meat mixtures by a sandwich enzyme immunoassay. *Int. Journal of Food Science and Technology*, 23 303-310. p.
- MARTIN, R., WARDALE, R.J., JONES, S.J., HERNANDEZ, P.E., PATTERSON, R. L. S. (1991): Monoclonal antibody sandwich ELISA for the potential detection of chicken meat in mixtures of raw beef and pork. *Meat Science*, 30 23-31. p.
- MARTINEZ, I., YMAN, I.M. (1998): Species identification in meat products by RAPD analysis. *Food Reserch International*, 31 (6-7) 459-466 p.
- MATSUGANA, T., CHIKUNI, K., TANABE, R., MUROYA, S., NAKAI, H., SHIBATA, K., YAMADA, J., SHINMURA, Y. (1998): Determination of mitochondrial B gene Sequence for red deer (*Cervus elaphus*) and the differentiation of closely related deer meat. *Meat Science*, 49 379-385. p.
- MATSUGANA, T., CHIKUNI, K., TANABE R., MUROYA, S., NAKAI, H., SHIBATA, K., YAMADA, J., SHINMURA, Y. (1999): A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science*, 51 143-148. p.
- MEYER, R., CANDRIAN, L., LÜTHY, J. (1994): Detection of Pork in Heated Meat Products by Polymerase Chain Reaction. *Journal of AOAC*, 77 (3) 617-622. p.
- MEYER, R., HÖFELEIN, C., LÜTHY, J., CANDRIAN U. (1995): PCR-RLFP: A Simple Method for Species Identification in Food. *Journal of AOAC*, 78 (6) 1542-1551. p.
- MCCORMIC, R.J., REECK, G.R., KROPF, D.H. (1988): Separation and identification of porcine sarcoplasmic proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 36 1193-1196. p.
- MORALES, P., GARCIA, T., GONZALES, I., MARTIN, R., SANZ, B., HERNANDEZ, P.E. (1994): Monoclonal antibody detection of porcine meat. *Journal of Food Protection*, 54 146-149. p.

- MORITA, J. I., YASUI T. (1991): Involvement of hydrophobic residues in heat-induced gelation of myosin tail subfragment from rabbit skeletal muscle. *Agricultural Biological Chemistry*, 55 597-599. p.
- MULLIS, K. B., FRED, A., FALOONA, F.A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction 335-350 p. In: Wu, R. (ed.): *Methods in Enzymology. Recombinant DNA Part F* New York: Elsevier Inc., 628 p.
- OKAYAMA, T., FUJI, M., YAMANOUE, M. (1991): Effect of cooking temperature on the percentage, colour formation, nitrite decomposition and sarcoplasmic protein denaturation in processed meat products. *Meat Science*, 30 49-57. p.
- PARTIS, L., CROAN, D., GUO, Z., CLARK, R., COLDHAM, T., MURBY, J. (2000): Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats *Meat Science*, 54 369-376. p
- PENNY, I. (1980): The enzymology of conditioning 115-144 p. in LAWRIE R. (ed) *Developments in meat science –I* London: Applied Sci. Publ 254 p.
- QUALI, A. (1990): Meat tenderization: possible causes and mechanism. *J. Muscle Food*, 1 129-165.p.
- RIGETTI, P. G., GIANAZZA, E., GELFI, C., CHIARI, M. (1992): Isoelectric focusing 149-216.p. In: HAMES B.D., RICKWOOD, D. (eds): *Gel electrophoresis of proteins, The practical approach series*, Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press
- ROITT, I., BROSTFF, J., MALE, D. (1998): Immunology. London: Mosby International Ltd 423 p.
- ROSSEN, L., NORSKOV, P., HOLMSTROM, K., RASMUSSEN, O. F. (1992): Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*, 17 37-45. p.
- RODRIGEZ, M. A., GARCIA, T., GONZALES, I., HERNANDEZ, P. E., MARTIN, R. (2005): TaqMan real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures. *Meat Science*, 70 113-120. p.
- RÜGGEGER, G. H., GAEDE, W., TSCHIRDEWAHN, B., BOOKE, A., MÜLLER, M. (1997): Tierartidentifizierung bei gekochten Fleischproben. *Fleischwirtschaft*, 77 (8) 732-734. p.
- SAWAYA, W. N., MAMEES, H., EL-RAYES, E., HUSAIN, A., DASHTI, B. (1990): Detection of pork in processed meat by an enzyme-linked immunosorbent assay using anti-swine antisera. *Journal of Food Science*, 55 293-297. p.
- SAWYER, J., WOOD, C., SHANAHAN, D., GOUT S., McDOWELL D. (2003): Real-time PCR for quantitative meat species testing. *Food control*, 14 579-583. p.
- SHERIKAR, A. T., KARKARE, U. D., KHOT, J. B., JAYARAS, B. M., BHILEGAONKAR, K. N. (1993): Studies on thermostable antigens production of species-specific anti-adrenal sera and comparison of immunological techniques in meat speciation. *Meat Science*, 33 121-136. p.

SZERDAHELYI KÁROLYNÉ (2005): A Magyar Élelmiszerkönyv. Élelmiszerszabályozási információk 3. 30. p.

TINBERG, B.J., OLSMAN, W.J. (1976): Isoelectrische Fokkussierung als eine Technik zur Species Identifizierung in der Lebensmittelüberwachung *Fleischwirtschaft*, 56 1495-1498. p.

ZIMMERMANN, A., LÜTHY, J., PAULI, U. (1998): Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. *Zeitung für Lebensm. Unters. Forsch.*, 207 81-90. p.

WILSON, I.G.(1997): Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Appl. Env. Microbiology*, 63 (10) 3741-3751. p.

WINTERO, A.K., THOMSEN, P. D., DAVIES, W. (1990): A comparison of DNA hybridization, immundiffusion, countercurrent immunoelectrophoresis and isoelectric focusing for detecting the admixture of pork to beef. *Meat Science*, 27 75-85. p.

WOLF, C., LÜTHY, J. (2001): Quantitative competitive (QC) PCR for quantification of porcine DNA. *Meat Science*, 57 161-168. p.

#### **További forrásmunkák:**

Applied Biosystem ABI PRISM 7000 ismertető

[www.cofc.edu/~deavorj/102/images/nucleic/pcrsteps.gif](http://www.cofc.edu/~deavorj/102/images/nucleic/pcrsteps.gif)

[www.sanidadanimal.info](http://www.sanidadanimal.info)

[people.eku.edu/ritchisong/301notes3.html](http://people.eku.edu/ritchisong/301notes3.html)

## **M2. Hústermék összetételével, és jelölésével, valamint ezzel összefüggésben lévő fogyasztóvédelemmel kapcsolatos szabályozási információk**

A dolgozat témájához kapcsolódó törvények és rendeletek:

- 2003. évi LXXXII. törvény az élelmiszerekről;
- 19/2004. (II.6.) FVM-ESZCSM-GKM együttes rendelet az élelmiszerek jelöléséről és módosításai: 90/2005. (X. 13.), 167/2004. (XI. 29.);
- 1997. évi CLV. törvény és a módosításáról szóló 2004. évi XVI. törvény a fogyasztóvédelemről.

Az élelmiszerek jelölése törvényi szinten a 2003. évi LXXXII. Élelmiszer törvényben, rendeleti szinten az 19/2004 (II.26) FVM – ESZCSM –GKM együttes rendeletben, valamint a Magyar Élelmiszerkönyvben (1-3/13-1 Egyes húskészítmények, 2 -13 Húskészítmények fejezetei) szabályozott. Az élelmiszerekkel kapcsolatosan az első, általános jellegű jogszabályok a XX. század elején jelentek meg, míg a minőségi előírásokat termékszabványok rögzítették.

Az Élelmiszer törvény az előállítás és ellenőrzés szabályozása mellett, fogyasztóvédelmi elemeket is tartalmaz, miszerint az élelmiszer jelölése nem vezetheti félre a fogyasztót az élelmiszer tulajdonságait (fajta, azonosság, jellemzők, összetétel, mennyiség, eltarthatóság, származás, eredet, előállítási vagy termelési mód) illetően. A termék csomagolásán magyar nyelven, közérthetően, egyértelműen, jól olvashatóan fel kell tüntetni a fogyasztók tájékoztatásához szükséges jelöléseket.

A törvény rögzíti a hatósági élelmiszer-ellenőrzésre jogosultak körét és amennyiben a termék minősége kifogásolható, feljogosítja az ellenőrző hatóságot bírság kiszabására.

Az Európai Gazdasági Közösség élelmiszer szabályozásához igazodva az 1995. évi XC. törvény hozta létre az európai gyakorlathoz hasonló, Magyar Élelmiszerkönyvben (*Codex Alimentarius Hungaricus*) lefektetett, részletes minőségi szabályozás működő rendszerét. A törvény végrehajtására kiadott 1/996 (I.9.) FM-NM-IKM rendelet alapján 1996-ban sor került a Magyar Élelmiszerkönyv első kiadására. A várható Európai Unió tagságnak megfelelően az Élelmiszer törvény 2003-ban módosult, mely magával hozta a Magyar Élelmiszerkönyv módosításának szükségességét. A törvény 17.§-a szerint a *Codex Alimentarius Hungaricus* felépítése hármas tagozódású. Az Élelmiszerkönyv I. kötete kötelező előírásként átvette az Európai Unió egyes irányelveit, valamint tartalmazza a Magyarországon előállított, vagy forgalomba hozott élelmiszerekre kötelező előírásokat, míg II. kötete az ajánlott termékleírásokat tartalmazza.

A Magyar Élelmiszerkönyv III kötete a hivatalos élelmiszervizsgálati módszergyűjteményt foglalja magába (Szerdahelyi, 2005).

A Magyar Élelmiszerkönyv hústermékekre vonatkozóan előírás-módosítást és szigorítást vezetett be, melynek célja az volt, hogy az egyes termékek elnevezése egyben utaljon annak minőségére is. A termékmegnevezést illetően, általánosan megfogalmazott irányelv a termékek izomfehérje-tartalomtól függő kategorizálása.

Ennek megfelelően, amennyiben a termék összes fehérje tartalmán belül az izomfehérje aránya:

- legalább 80 %, akkor a megnevezése tartalmazhat minőségi jelzőt;
- legalább 60 %, a termékek neve alatti összetétel egyedi termékleírással meghatározott;
- 60 % alatt van, a termék csak fantázianéven kerülhet forgalomba.

A termék izomfehérje tartalma a teljes fehérje (nitrogéntartalom\*6,25) és a nem-hús eredetű fehérjék (növényi fehérjék, tejfehérje), valamint a kötőszöveti fehérjék különbségéből határozható meg. A termékek összetételének ellenőrzése nem könnyű analitikai feladat, mivel jelen pillanatban nincs elfogadott módszer az izomfehérje-tartalom közvetlen módon történő meghatározására.

A Magyar Élelmiszerkönyv 2-13. sz. irányelv Húskészítmények fejezete, felépítését tekintve két részre osztható. Az „A” részben találjuk meg a húskészítményekhez felhasználható húsipari alap-, jelleg- és ízkialakító anyagok, valamint a hús és nem hús eredetű anyagok előírásait, melyek közül az A.10.4. sz. előírás (2004) szabályozza közvetlenül az állatfajok jelölésének használatát a húskészítményben. A termék összetételének megadásakor valamennyi felhasznált húsipari eredetű összetevő nevét az állatfajra utaló eredettel kell megnevezni. Ha a húskészítmény több állatfaj húsát is tartalmazza, akkor a termék nevében utalni kell erre. Egyedi leírással meghatározott termékeknél csak a nyersanyagok között felsorolt húsipari alapanyagokat szabad hús összetevőként felhasználni, így egyéb állatfaj húsának felhasználása még a termék nevének jelzővel való megváltoztatása esetén sem engedélyezett. Kiemelendő az is, hogy a termék összetételének megadásakor valamennyi állati eredetű összetevő nevét az állatfajra utaló eredettel is meg kell nevezni!

A Magyar Élelmiszerkönyv 2-13. sz. irányelv, Húskészítmények „B” fejezetében tizenhét, az alább felsorolt csoport tartalmazza a magyar hús- és baromfiipar termékeinek összefoglalását, melyből tizenöt húskészítménnyel, kettő szalonna és zsírfélékkel foglalkozik az alábbiak szerint:

- |                             |                                                                         |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| - Vörösáruk                 | - Aszpikos termékek                                                     |
| - Mozaikos húskészítmények  | - Pácolt, füstölt, füstölt-főtt, lángolt, érlelt, sült, formázott húsok |
| - Formában sült húskenyerek | - Formában vagy bélben főtt, pácolt húsok                               |
| - Kolbászok                 | - Húskonzervek                                                          |
| - Szalámifélék              | - Gyorsfagyasztott baromfikészítmények                                  |
| - Hússajtok                 | - Étkezési szalonnafélék                                                |
| - Hurkák                    | - Olvasztási anyagok és termékeik                                       |
| - Kenhető húskészítmények   | - Gyorsfagyasztott húskészítmények                                      |
| - Pástétomok                |                                                                         |

Az egyes termékleírásoknál megtalálhatóak a makroösszetételre, elsősorban fehérje- és zsírosszetételre vonatkozó minimum értékek, melyeket a termékek előállítása során teljesíteni kell.

A következő felsorolás tartalmazza azokat a termékeket, melyek előírásai kiemelten átkerültek a Magyar Élelmiszerkönyv 1-3/13-1 sz. előírásai, Egyes húskészítmények fejezetébe. E fejezet mellékletei további szigorításokat tartalmaznak arra nézve, hogy a sertés, marha, ló, csirke illetve pulyka megnevezést tartalmazó párizsi, virsli és sonka csak az adott faj húsból állítható elő:

- Vörösáruk (párizsi, baromfi párizsi, krinolin, virsli, baromfi virsli);
- Mozaikos húskészítmények (sonkás, zala, olasz, nyári turista felvágott);
- Kolbászok (csemege debreceni, parasztkolbász);
- Szalámifélék (téliszalámi, csemege szalámi);
- Pácolt, füstölt, füstölt-főtt, lángolt, érlelt, sült, formázott húsok (parasztsonka);
- Formában vagy bélben főtt, pácolt húsok (gépsonka, baromfi sonka);
- Húskonzervek (natúr libamáj, libamájpástétom, libamájparfé);

Étkezési szalonna (füstölt angolszalonna). Fontos változásként kiemelendő a 19/2004 FVM-ESZCSM-GM együttes rendelete, mely szabályozza a hús kifejezéssel megnevezett összetevők maximális zsír- és kötőszövet tartalmát. Amennyiben a termék a 27. táblázatban felsoroltaknál több zsírt vagy kötőszövetet tartalmaz, azt a termékösszetétel feltüntetésekor külön ki kell emelni.

**27. táblázat** Hús kifejezéssel megnevezett összetevők maximális kötőszövet és zsírtartalma

| <b>Faj</b>                                     | <b>Zsírtartalom<br/>(%)</b> | <b>Kötőszövet tartalom<br/>(%)</b> |
|------------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| Emlősök húsa,<br>kivéve a sertést és<br>nyulat | 25                          | 25                                 |
| Sertéshús                                      | 30                          | 25                                 |
| Szárnyasok és<br>nyúl húsa                     | 15                          | 10                                 |

A termékjelölés szempontjából kiemelő változás a 167/2004. (XI. 29.) FVM-EÜM-GKM együttes rendelet, amely szerint a termékben jelenlévő növényi és állati-eredetű allergén komponensek jelöléskötelezettek. A 28. táblázatban ezeket az allergén összetevőket foglaltam össze, melyek között több húsféleség, így a rák, kagyló és hal is szerepelnek. 2005. év októberétől ez a rendelet kiegészült (90/2005. (X. 13.) FVM-EüM-GKM együttes rendelet) a 28. táblázatban felsorolt anyagokból készült, de allergénnek nem minősülő termékkel. Ezek elsősorban olaj és szeszesital termékek. A helytelenül jelölt áru a fogyasztó anyagi megkárosításán kívül, több esetben is súlyos egészségügyi következményekkel járhat élelmiszer-allergia esetében. Szerencsére a húsfehérjék által kiváltott allergia ritkán fordul elő, azonban a hústermékekben használható húsfehérje pótló anyagok, elsősorban a szója, tej, tojás, búza és fűszerek okozhatnak problémát.

**28. táblázat** Az élelmiszerek címkéjén kötelezően jelölendő allergén összetevők

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1.</b> Glutént tartalmazó gabona (búza, rozs, árpa, zab, tönköly, kamut-búza vagy ezek hibrid változatai) és azokból készült termékek                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>2.</b> Rákfélék és azokból készült termékek                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>3.</b> Tojás és abból készült termékek                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>4.</b> Halak és azokból készült termékek                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <b>5.</b> Földimogyoró és abból készült termékek                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>6.</b> Szójabab és abból készült termékek                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>7.</b> Tej és abból készült termékek (beleértve a laktózt is)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>8.</b> Diófélék, azaz mandula ( <i>Amygdalus communis</i> L.), mogyoró ( <i>Corylus avellana</i> ), dió ( <i>Juglans regia</i> ), kesudió ( <i>Anacardium occidentale</i> ), pekándió [ <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch], brazil dió ( <i>Bertholletia excelsa</i> ), pisztácia ( <i>Pistacia vera</i> ), makadámia és queenslandi dió ( <i>Macadamia ternifolia</i> ) és azokból készült termékek |
| <b>9.</b> Zeller és abból készült termékek                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>10.</b> Mustár és abból készült termékek.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>11.</b> Szezám-mag és abból készült termékek                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>12.</b> Kén-dioxid és SO <sub>2</sub> -ben kifejezett szulfitek 10 mg/kg, illetve 10 mg/liter koncentrációt meghaladó mennyiségben                                                                                                                                                                                                                                                                             |

(Forrás: 167/2004. (XI. 29.) FVM-EÜM-GKM együttes rendelet)

A gazdálkodó szervezetek, fogyasztókat érintő tevékenységét a fogyasztóvédelemről szóló az 1997. évi CLV. törvény és 2004. évi XVI. törvénymódosítás szabályozza. A továbbiakban néhány, a fogyasztó érdekvédelmét biztosító paragrafust foglalkoztat össze. A 1997. évi CLV. törvény első részének, II. fejezete (3-5.§) szól a fogyasztó életének, egészségének és biztonságának védelméről, mely szerint nem biztonságos élelmiszer nem hozható forgalomba. Amely élelmiszerről kiderült, hogy kockázatot jelent a fogyasztóra nézve, a forgalomból ki kell vonni, illetőleg vissza kell hívni. Ennek megvalósítása érdekében az árut megfelelő azonosító jelöléssel kell ellátni és ezt rendszeresen ellenőrizni kell. A 1997. évi CLV. törvény (III. fejezet, 6. § és módosítása) szerint, a fogyasztó vagyoni érdekei sérülhetnek, ha a fogyasztó nem megfelelő minőségű áruval látja el vagy megsérti a címkézésre vonatkozó előírásokat.

A 1997. évi CLV. törvény IV. fejezet 9-11. § -ai részletezik a fogyasztó megfelelő tájékoztatásához szükséges a címkézést, melynek tartalmaznia kell:

- az áru-azonosításra alkalmas megnevezést, amelyet védjegy vagy fantázianév nem helyettesíthet
- gyártójának vagy forgalmazójának nevét és címét, azonosításra alkalmas módon;



- származási helyének megjelölését, ha az áru nem az Európai Gazdasági Térségből származik;
- méreteit, nettó mennyiségét az árura jellemző mértékegységben vagy darabszámban;
- előállításához felhasznált összetevőket (mennyiségi összetétel, a felhasznált anyagok aránya);
- rendeltetésszerű használhatóságának vagy minőségmegőrzésének várható időtartamát.

Az első három pont megadása magyar nyelven is szükséges. Továbbá a 16. § alapján a gyártó felelős a fogyasztó tájékoztatásáért. A fogyasztóvédelemmel kapcsolatos hatósági feladatokat a Fogyasztóvédelmi Főfelügyelőség szakmai irányításával a területi felügyelőségek látják el (1997. CLV. tv., VII. fejezet, 42. §).

Hasonlóan az élelmiszerekkel kapcsolatos szabályozáshoz a vadászat, vadvédelem is törvényi szinten, ennek végrehajtása rendeleti szinten, valamit további rendeletekkel szabályozott. A hatályos törvényi szabályozást tekintve a vad védelméről, a vadgazdálkodásról, valamint a vadászatról szóló 1996 évi LV. törvény és annak 2003. évi CXII. , valamint 2004. évi XCIV. törvény módosításai érvényesek. A nyolc nagy fejezetből álló vadászati törvény második fejezete (II. fejezet: a vad és élőhelyének védelme) szabályozza a vadászati idény és vadászati tilalmi idő tárgykörét. A vadászati idényt a miniszter, a természetvédelemért felelős miniszterrel egyetértésben rendeletben állapítja meg. A hatályos vadászati idényeket a 29. táblázatban ismertetem.

## 29. táblázat a 2005 évi idényben, vadászható nagyvad fajok

| Nagyvad faja                            | Vadászati idénye           |
|-----------------------------------------|----------------------------|
| Gímszarvasbika, golyóra érett           | szeptember 1-október 31.   |
| - bika selejt, tehén                    | szeptember 1-január 31.    |
| - üdő, borjú                            | szeptember 1-február 28.   |
| Dámbika, golyóra érett                  | október 1-december 31.     |
| - bika selejt                           | október 1-január 31.       |
| - tehén, üdő borjú                      | október 1-február 28.      |
| Őzbak                                   | április 15-szeptember 30.  |
| - suta, gida                            | október 1.-február 28.     |
| Muflon kos, muflon juh, -jerke, -bárány | szeptember 1-február 28.   |
| Vaddisznó kan, süldő, malac, (*6)       | egész évben                |
| - koca                                  | május 1-január 31.         |
| Szika szarvasbika,                      | szeptember 1- december 31. |
| - tehén, -üdő, -borjú                   |                            |

(Forrás: a 79/2004. (V. 4.) FVM rendelet 5.sz. mellékletének 56./2005 (VI:25) módosítása)

A 79/2004. (V. 4.) FVM rendeletben előírt vadászható nagyvad fajok:

- Gímszarvas (*Cervus elaphus*),
- Dámszarvas (*Cervus dama*),
- Őz (*Capreolus capreolus*),
- Muflon (*Ovis gmelini musimon*),
- Vaddisznó (*Sus scrofa*),
- Szikaszarvas - Japán szika (*Cervus nippon nippon*),
- Dybowski szika (*Cervus nippon hortulorum*),

Élelmiszerbiztonsági, vadvédelmi, valamint feldolgozási szempontból meghatározó a kilőtt vadak száma, faja és egészségi állapota. Szigorú szabályozás alá esik, hogy az adott vadászati évben csak megfelelő vadgazdálkodási tervben előírt fajú és számú egyed lőhető ki. A kilövést követően a vadbegyűjtő helyen, vagy a vadfeldolgozó üzemben állatorvosi húsvizsgálatnak kell megelőznie a feldolgozást. Az állat húsa megfelelő jelöléssel (sorszámmal ellátott azonosító) és papírokkal szállítható, melynek tartalmaznia kell az adott faj megnevezését is. A húsvizsgálatok közül kiemelném az emberben is halálos kimenetelű betegséget előidéző *trichinella* kimutatását, melyet a vaddisznó esetében kell elvégezni.

Állatokra vonatkozó járványügyi szempontból pedig a sertéspestis ellenőrző vizsgálatokat emelném ki. A húsvizsgálatokról, jelölésről, csomagolásról részletesen a vadon élő állat és a tenyésztett vad elejtéséről, húsvizsgálatáról és forgalmáról, valamint a házinyúl húsvizsgálatáról szóló 9/2002. (I.23) FVM rendelet rendelkezik.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőm Dr. Hajós Gyöngyi osztályvezető támogatását és javaslatait a dolgozat összeállításában.

Köszönöm főosztályvezetőm, Dr. Gelencsér Éva és Dr. Kárpáti György ösztönzését a PhD fokozat megszerzéséhez és munkám során nyújtott szakmai támogatását. Köszönöm Dr. Cukor Bálint a dolgozat javításához adott ötleteit.

Köszönettel tartozom Dr. Szamos Jenőnek a PCR technika elsajátításában nyújtott gyakorlati szakmai támogatásáért, Molnár Mihályné laboratóriumi asszisztensnek, valamint Ujhelyi Gabriella tudományos segédmunkatársnak a kísérletek kivitelezésében nyújtott segítségéért.

Köszönettel tartozom az Országos Húsipari Kutató Intézet munkatársainak és a Champden és Chorleywood Kft munkatársainak, hogy közös pályázatokkal segítette munkámat. Valamint köszönet a Pilisi Parkerdő Gazdaságnak és a Mavad Vecsés Rt-nek a minták beszerzésében nyújtott támogatásáért.

Végül szeretném megköszönni Családom kitartó türelmét.