

Identyfikacja różnych gatunków ryb i bezkręgowców morskich technikami biologii molekularnej^{*)}

WOJCIECH SAWICKI, ELŻBIETA DACZKOWSKA-KOZON, BARBARA KWIATKOWSKA,
WALDEMAR DĄBROWSKI, HANNA HERRING

Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii Stosowanej Wydziału Nauk o Żywności i Rybactwa ZUT,
ul. Papieża Pawła VI 3, 71-459 Szczecin

Sawicki W., Daczowska-Kozon E., Kwiatkowska B., Dąbrowski W., Herring H.

Identification of various species of ocean fish and invertebrates through molecular biological techniques

Summary

Dietetic and nutritional value of fish and shellfish products have made them very attractive food products for consumers. This results in both the increase of seafood consumption per capita and more diverse offers of finfish/shellfish species on the market. Nevertheless, while pursuing profits some of the producers/importers may replace valuable, more costly raw materials with cheaper substitutes.

In order to efficiently monitor what is in the product and not to allow such practices to take place it is necessary to apply reliable, fast methods as to verify their contents. Until recently the methods used to test the products' components were based mostly on electrophoretic, chromatographic or the immunological tests. At presents to detect food adulteration the PCR technique and its variety based on species polymorphy (multiplex PCR, PCR-RFLP, PCR-RAPD, PCR-AFLP, PCR-FIN or PCR-SSCP) are used. The latest achievements in identification and differentiation between the species are real-time PCR and microarray DNA. Discussions on how to improve the methods of identification/differentiation and on the possible application of such methods in routine quality control of seafood by the appropriate authorities are in progress.

Keywords: adulteration, fish and seafood, „post-PCR” techniques

Możliwość potwierdzania autentyczności gatunków ryb i bezkręgowców morskich ma duże znaczenie dla producentów żywności, jak też konsumentów. Zgodnie z obowiązującymi w UE przepisami, konsument ma mieć dostęp do informacji na temat nabywanego produktu rybnego i innych produktów spożywczych. Na opakowaniu zbiorczym lub opakowaniu jednostkowym powinna znajdować się informacja dotycząca składu produktu, tj.: nazwy gatunku(-ów) surowca rybnego obecnego w danym produkcie, źródła pochodzenia ryby, metody produkcji itd. W rozumieniu ustawy z 28 października 2008 r. (Dz. U. Nr 214, poz. 1346) o jakości handlowej artykułów rolno-spożywczych produkt rolno-spożywczy jest zafałszowany, jeśli jego skład jest niezgodny z przepisami dotyczącymi jakości handlowej oraz w przypadku, gdy wprowadzono zmiany dotyczące oznakowania, mające na celu ukrycie jego rzeczywistego składu lub innych właściwości, przy czym zmiany te naruszają interesy konsumentów (37). Takie zafałszowanie naraża konsumenta na ryzyko zakupu produktu o potencjalnie szkodli-

wym działaniu, np. zawierającego alergeny. Dlatego w przypadku produktów przetworzonych, takich jak: filety mrożone, produkty panierowane (paluszki, burgery itp.) oraz dania gotowe czy przetworzone owoce morza, gdzie niemożliwa jest pierwotna charakterystyka morfologiczna surowca na podstawie cech zewnętrznych, wymagane jest użycie bardziej czułych metod analitycznych, umożliwiających jednoznaczną identyfikację, w tym oznaczenie gatunku(-ów) (15, 27, 34, 42).

Diagnostyka molekularna jest najmłodszym typem analityki laboratoryjnej bazującym na materiale genetycznym DNA i/lub RNA. Jest to bardzo szybka i czuła metoda badań. Polega na wykrywaniu materiału genetycznego, a następnie identyfikacji zmiany w obrębie określonego, powielonego fragmentu DNA. Na tej podstawie określana jest przynależność do gatunku lub rodzaju (25, 38, 40).

Szczególnie popularna jest technika PCR, opracowana przez Karla Mullisa. Za jej opracowanie autor w 1993 r. otrzymał Nagrodę Nobla. Ta niezwykle prosta metoda umożliwia wielokrotne powielenie dowolnie wybranej sekwencji DNA, pod warunkiem, że zna-

^{*)} Praca finansowana w ramach projektu badawczego MNiSW nr N312 061 31/3515.

ne są sekwencje krótkich odcinków DNA po każdej ze stron sekwencji przeznaczonych do powielania (tzw. sekwencje oskrzydłujące). Mieszanina reakcyjna PCR zawiera 4 składniki: dwuniciowy odcinek DNA przeznaczony do powielania, startery hybrydujące z sekwencjami oskrzydłującymi, 4 trifosforany deoksyrybonukleotydów (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) oraz termostabilną polimerazę DNA. Reakcję PCR przeprowadza się w aparatach zwanych termocyklerami. Składa się ona z trzech etapów, tj.:

- denaturacji, czyli rozplątywania podwójnej nici DNA. Ułatwia to starterom swobodny dostęp do każdej nici DNA; proces denaturacji w temperaturze $\sim 90^{\circ}\text{C}$ trwa od kilkunastu do kilkudziesięciu sekund;

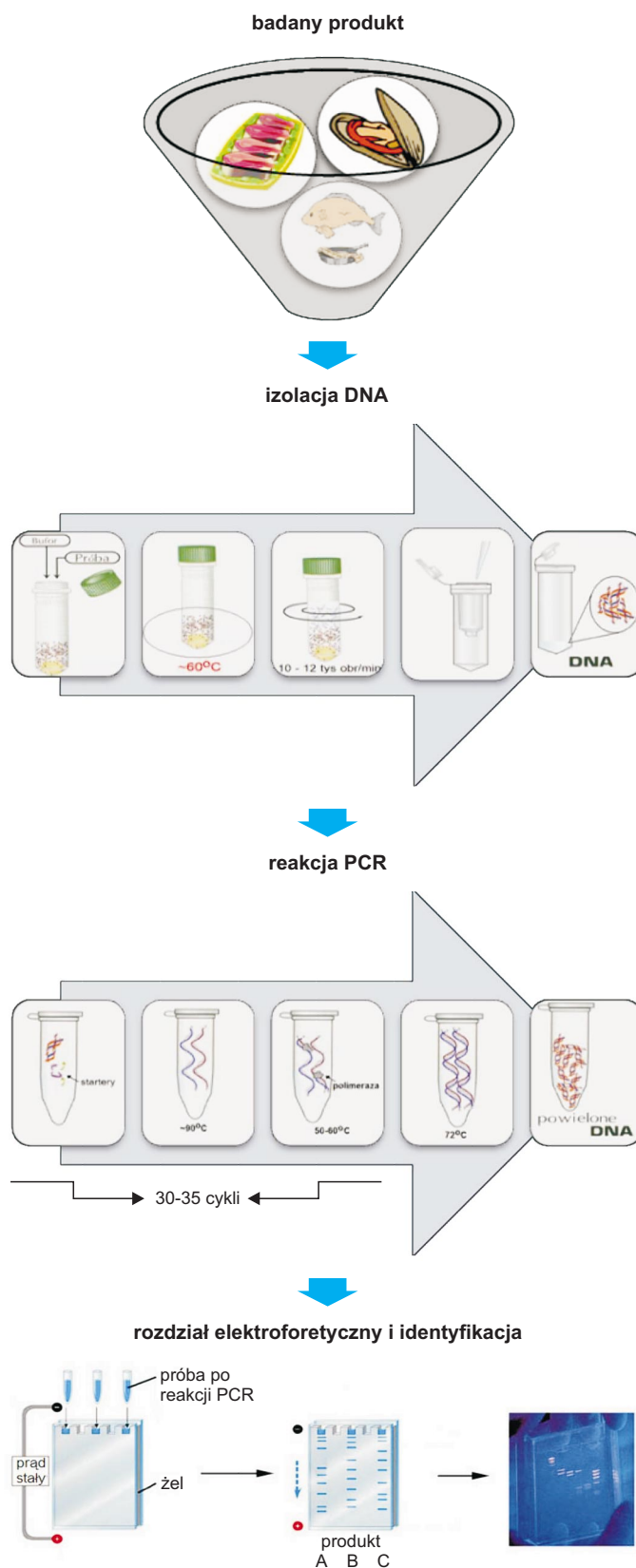
- przyłączania starterów. Obniżenie temperatury do $50\text{--}60^{\circ}\text{C}$ umożliwia komplementarne dopasowywanie i przyłączenie się starterów do pojedynczej nici DNA. Zakres temperatur dobierany jest odpowiednio do używanych starterów;

- syntezy nowego fragmentu DNA, czyli dobudowania przy pomocy polimerazy DNA brakujących nukleotydów umożliwiającego odtworzenie dwuniciowej struktury DNA; proces ten zachodzi w 72°C .

Każdy 3-etapowy cykl pozwala na uzyskanie dwóch cząsteczek potomnych z jednej macierzystej cząsteczki DNA. Teoretyczna wydajność tej metody jest bardzo duża, ale w praktyce zależy od czynników, takich jak: wyjściowa ilość badanego DNA, ilość poszczególnych reagentów w mieszaninie reakcyjnej, liczby cykli itp. (36).

Obecnie identyfikacja ryb do gatunku prowadzona jest głównie przy pomocy technik będących odmianą tradycyjnej reakcji PCR: PCR-RFLP, PCR-RAPD, PCR-AFLP, PCR-SSCP. Techniki te zastosowano z powodzeniem przy identyfikacji licznych gatunków ryb np.: dorszowatych, łososiowatych, makrełowatych, okoniowatych, jesiotrowatych, pałaszowatych, płastugokształtnych węgorzy oraz bezkręgowców wodnych, tj.: mięczaków, głowonogów, skorupiaków (tab. 1) (1-3, 29, 31, 33, 41, 43). Schemat identyfikacji surowców/produktów techniką PCR przedstawia rycina 1.

Metody biologii molekularnej stosowane w identyfikacji gatunków, szczególnie techniki post-PCR, posiadają wiele zalet w porównaniu z metodami opartymi na analizie białek. Są to metody wysoce specyficzne, o dużej czułości (nawet poniżej 0,1% w gotowym produkcie), wydajne i wiarygodne (29, 38). Choć DNA może ulec częściowej degradacji w procesie przetwarzania, to i tak jest on bardziej stabilny termicznie niż białka (36). Genetyczna identyfikacja gatunków oparta jest na polimorfizmie DNA bądź genetycznej zmienności będącej wynikiem naturalnie pojawiających się mutacji w kodzie genetycznym (17). Detekcja specyficznych gatunkowo polimorfizmów DNA możliwa jest dzięki izolacji materiału genetycznego z organizmu, następnie amplifikacji DNA w reakcji PCR i analizie ujawniających się charakterystycznych polimorfizmów.



Ryc. 1. Schemat identyfikacji różnych gatunków surowców rybnych i owoców morza techniką PCR

W niniejszej pracy dokonano przeglądu i omówiono metody analityczne post-PCR wykorzystywane najczęściej w badaniu ryb i owoców morza, wskazując zalety i ograniczenia tych metod.

Tab. 1. Porównanie technik molekularnych stosowanych w celu wykrycia zafalszowań gatunkowych ryb i bezkręgowców morskich (wg 24, 33, 34)

Technika	Wymagana znajomość sekwencji dna	Liczba analizowanych loci	Oporność na degradację DNA	Powtarzalność wyników między laboratoriami	Koszt	Wykrywane rodzaje	Produkty
PCR-RFLP	tak	jedna	wysoka	wysoka	++	dorszowate, łososiowate, makrełowate, okoniowate, jesiotrowate, pałaszowate, płastugokształtne węgorze, mięczaki, głowonogi, skorupiaki	świeże, mrożone, solone, suszone, wędzone, sterylizowane, konserwowane, marynowane, filety, produkty panierowane, kawior
PCR-SSCP	tak	jedna	wysoka	średnia	++	łososiowate, makrełowate, jesiotrowate, mięczaki, węgorze	świeże, mrożone, wędzone sterylizowane, konserwowane, filety, kawior
PCR-RAPD	nie	wiele	niska	niska	+	okoniowate, mięczaki, głowonogi	świeże, mrożone
PCR-AFLP	nie	wiele	niska	średnia – wysoka	+++	łososiowate, makrełowate	świeże, wędzone, marynowane

Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (PCR-RFLP)

Metoda ta opiera się na polimorfizmie długości fragmentów restrykcyjnych kodu genetycznego. Specyficzna zmienność gatunkowa oceniana jest na podstawie długości produktów zamplifikowanych w reakcji PCR, podanych restrykcji, a następnie rozdzielonych elektroforetycznie na żelu. W wyniku rozdziału charakterystyczny układ prążków pozwala na rozróżnienie poszczególnych gatunków. PCR-RFLP jest techniką stosunkowo tanią, niezbyt skomplikowaną technicznie i odpowiednią dla rutynowych analiz. Jest ponadto metodą relatywnie szybką, wydajną, nie wymagającą drogiego osprzętowania (2, 4, 6). Z tych m.in. powodów PCR-RFLP jest coraz powszechniej wykorzystywana w badaniach mających na celu określenie gatunku ryb i owoców morza. Ponad 70% analiz związanych z identyfikacją ryb do gatunku ryb wykonywanych jest techniką PCR-RFLP (33, 34, 40).

Fragmentem DNA wykorzystywanym najczęściej w identyfikacji owoców morza i ryb np. makrełowatych, dorszowatych, łososiowatych, płastug jest gen *cytb* w mtDNA (29, 33, 43). Wykazano, że metoda PCR-RFLP sprawdza się zarówno w analizie stosunkowo blisko spokrewnionych gatunków, jak i prób zawierających różne gatunki czy poddanych różnym procesom przetworzenia technologicznego, w tym sterylizacji termicznej (38, 40). W tab. 2 podano przykłady zastosowania techniki PCR-RFLP w identyfikacji ryb i różnych produktów rybnych.

Technika PCR-RFLP, mimo że jest uważana za bardzo dobrą i wykorzystywaną w identyfikacji gatunkowej, posiada również pewne mankamenty. Głównym z nich jest możliwość występowania zmienności wewnątrzgatunkowej (24). Dodatkowym problemem jest brak gwarancji otrzymania unikatowego wzoru restryk-

Tab. 2. Przykłady zastosowań techniki PCR-RFLP w identyfikacji ryb

Identyfikowana grupa	Liczba gatunków	Wykorzystany fragment DNA	Produkt	Źródło
Dorszowate	9	tRNA ^{Glu} cyt _b w mtDNA	świeży i suszony	(1)
	3	cyt _b w mtDNA	mrożony	(3)
	2	cyt _b w mtDNA	różne produkty rybne	(4)
	8	cyt _b w mtDNA	świeże tkanki mięśniowe	(9)
	10	cyt _b w mtDNA	mrożony, suszony	(13)
	3	cyt _b w mtDNA	różne produkty z mintaja	(40)
Węgorze	4	mt 16S rRNA	filety	(14)
	2	mt 16S rRNA	świeży, mrożony	(19)
Makrełowate	1	5S rRNA	mrożony	(2)
	2	cyt _b w mtDNA 5S rDNA	mrożony	(5)
	8	cyt _b w mtDNA	przetworzony termicznie	(22)
Tuńczyki	4	cyt _b w mtDNA	filety (sashimi)	(23)
Lucjanowate	6	mt 12S rRNA	świeży i solony	(46)
Pałaszowate	3	mt 12S rRNA	świeży, mrożony	(6)
	3	mt 12S rRNA	filety	(7)
	2	mt 12S rRNA	świeży, mrożony	(8)
Łososiowate	2	cyt _b w mtDNA	świeży, mrożony	(12)
Różne rodzaje	7	mt 12S i 16S rRNA	świeży i nieprzetworzony	(11)

cji w przypadku wszystkich badanych gatunków. Ze względu na te ograniczenia badania techniką PCR-RFLP należy wykonywać ze szczególną uwagą i przy właściwie zoptymalizowanej metodzie.

Polimorfizm konformacyjnego jednoniciowego DNA (PCR-SSCP – Single Strand Conformational Polymorphism)

Metoda PCR-SSCP umożliwia wykrywanie polimorfizmów międzygatunkowych. Jest to szczególnie istotne w przypadku blisko spokrewnionych gatunków. Analizę SSCP rozpoczyna amplifikacja fragmentu

DNA specyficznego dla wszystkich badanych gatunków. Otrzymane amplikony są denaturowane do jednoniciowego DNA (ssDNA), którego trójwymiarowa struktura, tworzona w wyniku wewnątrznicowego parowania zasad, zależy od sekwencji ssDNA. Wykrywanie zmienności sekwencji bazuje na różnicy w migracji powstałych amplikonów w żelu poliakrylamidowym. Tak można prawidłowo zidentyfikować nieznaną próbę. Metoda SSCP nadaje się zarówno do badania próbek poddanych obróbce termicznej, gdzie w procesie technologicznym materiał genetyczny może ulec uszkodzeniu (analiza małych fragmentów DNA, ~100 bp), jak i detekcji gatunków próbek mieszanych. Generalnie, analiza SSCP opiera się na zmienności genu *cytb* w sekwencji mtDNA. Chociaż metoda ta nie jest tak powszechnie stosowana jak PCR-RFLP, to umożliwia identyfikację różnych gatunków ryb, np.: łososiowatych, makrełowatych, jesiotrowatych, węgorzy. Ponadto z powodzeniem została zastosowana do identyfikacji mięczaków (9, 26, 28, 30). Technika SSCP jest bardziej wymagająca niż RFLP. Wymaga dostosowania warunków doświadczenia indywidualnie do każdego badanego przypadku.

Metoda losowej amplifikacji polimorficznych fragmentów DNA (RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA Analysis)

W metodzie RAPD nie ma ustalonego fragmentu DNA, który ma zostać powielony w reakcji PCR, stąd też nie jest konieczna jego wcześniejsza znajomość. Dlatego stosuje się dowolnie wybrany pojedynczy starter oligonukleotydowy. Zmienność w kodzie genetycznym w analizie RAPD ujawnia się poprzez unikatowy układ produktów (fragmentów DNA). Pozwala to ustalić tzw. genetyczny odcisk palca DNA. Porównując charakterystyczny wzór powstały dla danego gatunku z nieznaną próbą, przeprowadza się weryfikację gatunkową. RAPD jest precyzyjnym i szybkim narzędziem, z powodzeniem stosowanym przy wykrywaniu oszustw handlowych (36, 38). Metoda ta jest relatywnie tania, szybka i prosta oraz, co jest również bardzo istotne, nie wymaga wcześniejszej znajomości sekwencji genomu, a startery są powszechnie dostępne (17, 21). W dodatku analiza RAPD nie wymaga użycia dużej ilości DNA i umożliwia badanie zmienności wewnątrz- i zewnątrzgatunkowej. W porównaniu z takimi metodami jak PCR-RFLP czy AFLP metoda RAPD jest techniką wiarygodną i taną w przypadku przeprowadzania identyfikacji gatunkowej, jeśli nie ma żadnych wcześniejszych informacji na temat sekwencji genomu (17, 36). Protokół RAPD opracowano dla zwierząt gospodarskich oraz organizmów morskich, tj.: zębacza, tilapii, małży jadalnych i arowany azjatyckiej (25, 29) oraz węgorzy, okoni nilowych (15) i żabnicy (*Lophius gastrophysus*) (32). Pomimo wymienionych zalet PCR-RAPD posiada również wady. Zasadniczą jest produktywność metody szczególnie w przypadku ograniczonej ilości docelowego DNA czy

nieznacznej degradacji DNA. Jednocześnie, aby powstały genetyczny odcisk palca dokładnie odzwierciedlał odpowiedni gatunek, muszą być zapewnione stałe i ściśle określone warunki reakcji PCR.

Polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów (AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism)

AFLP jest techniką łączącą elementy metody RFLP oraz RAPD, tj. trawienie enzymami restrykcyjnymi z dwiema rundami amplifikacji w reakcji PCR: niespecyficzną i specyficzną. Amplifikacja specyficzna zachodzi z użyciem specyficznego starterów, posiadających na swoim końcu 3' 2-4 specyficzne nukleotydy. Obydwa enzymy generują tzw. lepkie końce. Są one niezbędne do połączenia produktów trawienia z cząsteczkami adaptorów. Po ligacji adaptorów prowadzona jest reakcja amplifikacji (16, 34, 45). Prowadzenie dwóch reakcji amplifikacji zwiększa powtarzalność metody. Rozdział produktu następuje na żelu w procesie elektroforezy (26). Ostatecznie możliwe jest ujawnienie wewnątrz- i międzygatunkowych polimorfizmów DNA poprzez stwierdzenie obecności specyficznych fragmentów bądź ich brak. Metoda AFLP posiada wiele zalet, dlatego uważana jest za atrakcyjne narzędzie badawcze w diagnostyce gatunkowej. Metoda ta może być wykorzystywana niezależnie od pochodzenia i złożoności docelowego DNA. Chociaż technika ta jest podobna do RAPD, ponieważ nie wymaga wcześniejszej znajomości sekwencji DNA, to analizę AFLP charakteryzuje większa wydajność i możliwość detekcji polimorfizmów. Dodatkowo, nie wymaga stosowania procesu sekwencjonowania i jest relatywnie tania. Analiza AFLP na dużą skalę stosowana jest do badań genetycznych roślin, grzybów i bakterii. Natomiast w przypadku zwierząt istnieją pewne ograniczenia. Markery AFLP obecnie są stosowane w badaniach zaledwie kilku wodnych gatunków zwierząt, takich jak: zębacz (20), ostryga (31) okoń i tuńczyk (16), pstrąg i łosoś (31, 45). Metoda AFLP używana jest w badaniach zafałszowań produktów rybnych z uwagi na mały nakład pracy oraz możliwą dużą skalę zastosowania.

Mikromacierze DNA (DNA microarray)

Genetyczne badania autentyczności żywności to obecnie duże wyzwanie dla badaczy. Podstawą jest uzyskanie wysokiej jakości DNA z produktu poddanego obróbce termicznej bądź o złożonym składzie gatunkowym. Najnowsze techniki badawcze umożliwiają przeprowadzanie rutynowych badań w sposób szybki, łatwy i niedrogi z jednoczesną identyfikacją dużej liczby gatunków w żywności oraz oznaczeniu ilościowym danego gatunku w próbce mieszanej. Warunki te spełnia obecnie kilka technik. Jedną z nich jest technologia DNA chip. Prawdopodobnie, z uwagi na możliwość jednoczesnej identyfikacji > 100-1000 gatunków, w niedalekiej przyszłości chipy DNA (mikromacierze DNA) będą bardzo istotnym narzędziem

badawczym (30). Biochipy są zminiaturyzowanymi mikrosystemami wykorzystującymi zdolność DNA do spontanicznego wykrywania i wiązania komplementarnej sekwencji w sposób wysoce specyficzny i odwracalny (hybrydyzacja). Struktura biochipów może opierać się na technologii on chip, gdzie oligonukleotydowe sondy są syntetyzowane chemicznie *in situ* lub na technologii off chip – sondy DNA przed wszczęciem do substratu są syntetyzowane, oczyszczane i kontrolowane. Początkowo tego typu techniki wykorzystywały nylonowe lub nitrocelulozowe membrany, a detekcja odbywała się za pomocą radioaktywnych izotopów. Wraz ze wzrostem zróżnicowanych sond kompatybilnych z detekcją wykorzystującą fluorescencję zastosowano inne nośniki. W zależności od rodzaju biochipów i firm je produkujących, mikroelektryczne komponenty mogą być wtapiane w szkło lub silikon (10).

Dotychczas wyprodukowano już prototypy chipów DNA, umożliwiających różnicowanie 6 gatunków zwierząt rzeźnych (28). W tym celu użyto uniwersalnych starterów do amplifikacji fragmentu mitochondrialnego DNA, genu *cytb*. Otrzymane fragmenty DNA zidentyfikowano na mikromacierzach dzięki specyficznym gatunkowo sondom oligonukleotydowym. Ostatnio powstały mikromacierze przeznaczone do różnicowania 11 ważnych handlowo gatunków ryb, opartych na fragmentacji genu 16S rDNA o długości 600 pz (20). Stworzono również tzw. Fish Chips, które umożliwiają identyfikację około 50 gatunków ryb żyjących w morzach Europy. Macierze DNA typu fish chip zamierza się wykorzystywać w badaniach zafałszowań żywności, jak również w innych celach, istotnych dla przemysłu rybnego (12). Pomimo zalet metoda macierzy DNA jest rzadko stosowana w identyfikacji gatunkowej żywności, głównie z uwagi na wysokie koszty analizy, dużą pracochłonność oraz ciągle małą dostępność identyfikowanych gatunków.

Ilościowe oznaczanie składników technikami molekularnymi

Techniki bazujące na reakcji PCR pozwalają również na ilościowe oznaczenie docelowego DNA. Przykładami takich metod są tzw. ilościowy-konkurencyjny PCR (QC-PCR) i real-time PCR (rt-PCR).

QC-PCR polega na współamplifikacji docelowego, analizowanego DNA z tzw. wewnętrznym standardem (czynnikiem konkurencyjnym), który wyróżnia się posiadaniem małego intronu bądź zmutowanego miejsca restrykcyjnego. Współamplifikacja jest wymagana, zwłaszcza jeśli w tej samej próbce reakcyjnej przy użyciu identycznej pary starterów powielany jest DNA docelowy i nieznaną ilość matrycy stanowiącej wewnętrzną kontrolę. Wielokrotne reakcje PCR przeprowadzane są dla każdej amplifikowanej próbki ze wzrastającą ilością czynnika konkurencyjnego, przy stałej koncentracji próbki. Ilość zamplifikowanego produktu określa się przez przyrównanie odpowiedniego

punktu, w którym amplikon czynnika konkurencyjnego wytwarza sygnał o takiej samej intensywności, jak sekwencja docelowa DNA na zabarwionym żelu agarozowym. QC-PCR może być z powodzeniem stosowany w detekcji i ilościowym określeniu wieprzowego DNA w produktach mięsnych, jak również genetycznie modyfikowanych organizmów: soi i kukurydzy (18, 29, 38, 39). QC-PCR jest bardzo często wykorzystywany do badań żywności pochodzenia zwierzęcego w celu identyfikacji i określenia udziału ilościowego białka danego gatunku zwierzęcia (41).

Inną metodą oznaczania ilościowego DNA jest real-time PCR. W celu detekcji próbki wykorzystuje się fluorochromy i/lub sondy znakowane fluorescencyjnie i mierzy poziom emitowanej fluorescencji za pomocą spektrofлуorymetru sprzężonego ze specjalnie przystosowanym do tego celu termocyklem. Pozwala to na uniknięcie procesu wizualizacji na żelu. Silniejsza fluorescencja oznacza większą liczbę kopii DNA. Wiele metod opartych jest na zjawisku fluorescencji, włączając w to użycie: starterów znakowanych fluorescencyjnie (Aplmifluor™); sond zawierających na jednym swoim końcu reporter fluorescencyjny, a na drugim cząsteczkę wygaszającą fluorescencję (TaqMan); „molecular beacons” emitującego światło, tylko jeśli związany jest z sekwencją docelową DNA; starterów typu Scorpion™ i technologii LightCycler™, wykorzystującej dwie sondy oligonukleotydowe – donorową i receptorową (21). Główną zaletą tych metod oprócz szybkości i prostoty jest możliwość określenia ilości docelowego materiału genetycznego. Sondę TaqMan stosowano do weryfikacji gatunkowej i określania ilości DNA dla wielu gatunków ryb i konserwowych produktów mięsnych (18). TaqMan real-time PCR była pierwszą dobrze opracowaną techniką z powodzeniem stosowaną przy badaniu białych ryb. TaqMan można również stosować do detekcji łupacza (*Melanogrammus aeglefinus*) w próbce mieszanej zawierającej inne gatunki ryb (17). Sánchez i wsp. (35) posłużyli się tą techniką przy identyfikacji morskiczka. Real-time PCR może być stosowany przy ustalaniu gatunków zwierząt w przetworzonych produktach mięsnych, ponieważ nawet małe fragmenty DNA pozostałe po obróbce termicznej mogą być amplifikowane i identyfikowane (17).

Podsumowanie

Opis na etykiecie produktu niezgodny z faktem może być powodem określonych problemów zdrowotnych konsumenta. Możliwość wykrywania takich praktyk jest potrzebą chwili. W opracowywanie szybkich, możliwie prostych, wiarygodnych i powtarzalnych technik umożliwiających identyfikację składu produktu spożywczego zaangażowanych jest szereg ośrodków naukowych.

Obecnie prace te skupiają się przede wszystkim na rozwoju technik analitycznych, tzw. post-PCR, czyli: RFLP, SSCP, RAPD i AFLP. Dotychczas zastosowa-

no je do genetycznej identyfikacji wielu gatunków ryb, m.in. dorszowatych, łososiowatych i makrełowatych. Dzięki doskonaleniu i optymalizacji metod możliwa jest analiza małej ilości DNA w produktach o różnym stopniu przetworzenia, a także detekcja i oznaczanie ilościowe DNA w próbkach mieszanych. Przyszłością wydaje się technologia mikromacierzy DNA. Chipy DNA są obiecującą metodą do szybkich detekcji, gdyż w zależności od potrzeb można wyprodukować płytkę zawierającą od 100 do 1 000 000 różnych sond na 1 cm², a tym samym przeprowadzać milion reakcji jednocześnie.

Obecnie coraz szersze zastosowanie ma technika real-time PCR umożliwiającą poza określeniem konkretnego gatunku stwierdzenie procentowego udziału poszczególnych składników w produkcji.

Piśmiennictwo

1. Akasaki T., Yanagimoto T., Yamakami K., Tomonaga H., Sato S.: Species Identification and PCR-RFLP analysis of cytochrome b gene in cod fish (order Gadiformes) products. *J. Food Sci.* 2006, 71, 190-195.
2. Aranishi F.: Rapid PCR-RFLP method for discrimination of imported and domestic mackerel. *Mar. Biotech.* 2005, 7, 571-575.
3. Aranishi F., Okimoto T., Izumi S.: Identification of gadoid species (Pisces, Gadidae) by PCR-RFLP analysis. *J. Appl. Genet.* 2005, 46, 69-73.
4. Aranishi F., Okimoto T., Ohkubo M., Izumi S.: Molecular identification of commercial spiny pollack roe products by PCR-RFLP analysis. *J. Food Sci.* 2005, 70, 235-238.
5. Bektas Y., Belduz A. O.: PCR based identification and discrimination of *Caranx rhonchus* (pisces, Carangidae) based on nuclear and mtDNA sequences. *J. Anim. Vet. Adv.* 2009, 8, 518-525.
6. Chakraborty A., Aranishi F., Iwatsuki Y.: Genetic differences among three species of the genus *Trichiurus* (Perciformes: Trichiuridae) based on mitochondrial DNA analysis. *Ichthyol. Res.* 2006, 53, 93-96.
7. Chakraborty A., Aranishi F., Iwatsuki Y.: Molecular identification of hairtail species (pisces: Trichiuridae) based on PCR-RFLP analysis of the mitochondrial 16S rRNA gene. *J. Appl. Genet.* 2005, 46, 381-385.
8. Chakraborty A., Aranishi F., Iwatsuki Y.: Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis for species identification of hairtail fish filets from supermarkets in Japan. *Fish Sci.* 2007, 73, 197-201.
9. Comi G., Iacumin L., Rantsiou K., Cantoni C., Coccolin L.: Molecular methods for the differentiation of species used in production of cod-fish can detect commercial frauds. *Food Control.* 2005, 16, 37-42.
10. Cuzin M.: DNA chips: a new tool for genetic analysis and diagnostics. *Transfus. Clin. Biol.* 2001, 8, 291-296.
11. Di Finizio A., Guerriero G., Russo G. L., Ciarcia G.: Identification of gadoid species (pisces, Gadidae) by sequencing and PCR-RFLP analysis of mitochondrial 12S and 16S rRNA gene fragments. *Eur. Food Res. Tech.* 2007, 225, 337-344.
12. Dooley J. J., Sage H. D., Brown H. M., Garrett S. D.: Improved fish species identification by use of lab-on-a-chip technology. *Food Control.* 2005, 16, 601-607.
13. Dooley J. J., Sage H. D., Clarke M. A., Brown H. M., Garrett S. D.: Fish species identification using PCR-RFLP analysis and lab-on-a-chip capillary electrophoresis: application to detect white fish species in food products and an inter-laboratory study. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 3348-3357.
14. Gagnaire P. A., Tsukamoto K., Aoyama J., Minegishi Y., Valade P., Berrebi P.: RFLP and semi-multiplex PCR-based identification of 4 eel species from the south-western Indian Ocean region. *J. Fish Biol.* 2007, 71 (Suppl. B), 279-287.
15. Gil L. A.: PCR-based methods for fish and fishery products authentication. *Trends Food Sci. Tech.* 2007, 18, 558-566.
16. Han K., Ely B.: Use of AFLP analyses to assess genetic variation in Morone and *Thunnus* species. *Mar. Biotech.* 2002, 4, 141-145.
17. Hird H. J., Hold G. L., Chisholm J., Reece P., Russell V. J., Goodier R., MacArthur R.: Development of a method for the quantification of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) in commercial products using real-time PCR. *Eur. Food Res. Tech.* 2005, 220, 633-637.
18. Jonker K. M., Tilburg J. J. H. C., Hägele G. H., Deboer E.: Species identification in meat products using real-time PCR. *Food Addit. Contam.* 2008, 25, 527-533.
19. Keszka S., Panicz R., Kempter J.: Eel species identification by polymerase chain reaction followed by restriction fragment length polymorphism. *Medycyna Wet.* 2009, 65, 315-318.
20. Kochzius M., Nölte M., Weber H., Silkenbeumer N., Hjörleifsdóttir S., Hreggvidsson G. O., Marteinson V., Kappel K., Planes S., Tinti F., Magoulas A., Garcia Vazquez E., Turan C., Hervet C., Campo Falgueras D., Antonioni A., Ladni M., Blohm D.: DNA microarrays for identifying fishes. *Mar. Biotech.* 2008, 10, 207-217.
21. Laube I., Zagon J., Broll H.: Quantitative determination of commercially relevant species in foods by real-time PCR. *Int. J. Food Tech.* 2007, 42, 336-341.
22. Lin W. F., Hwang D. F.: Application of PCR-RFLP analysis on species identification of canned tuna. *Food Control.* 2007, 18, 1050-1057.
23. Lin W. F., Shiau C. Y., Hwang D. F.: Identification of 4 *Thunnus* tuna species using mitochondrial cytochrome b gene sequence PCR-RFLP analysis. *J. Food Drug. Anal.* 2005, 13, 382-387.
24. Liu Z. J., Cordes J. F.: DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 2004, 238, 1-37.
25. Liu Z. J., Nichols A., Li P., Dunham R. A.: Inheritance and usefulness of AFLP markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. furcatus*), and their F1, F2, and backcross hybrids. *Mol. Gen. Genet.* 1998, 258, 260-268.
26. Lockley A. K., Bardsley R. G.: DNA-based methods for food authentication. *Trends Food Sci. Tech.* 2000, 11, 67-77.
27. Mackie I. M., Pryde S. E., Gonzales-Sotelo C., Medina I., Pérez-Martin R., Quinteiro J., Rey-Mendez M., Rehbein H.: Challenges in the identification of species of canned fish. *Trends Food Sci. Tech.* 1999, 10, 9-14.
28. Mafra I., Ferreira I., Oliveira M.: Food authentication PCR-based methods. *Eur. Food Res. Tech.* 2007, 227, 649-665.
29. Marmiroli N., Peano C., Maestri E.: Advanced PCR techniques in identifying food components, [w:] Lee M. (ed.): *Food authenticity and traceability*. Cambridge, U.K., Woodhead Publishing Ltd. 2007, 3-33.
30. Moran P., Garcia-Vazquez E.: Identification of highly prized commercial fish using a PCR-based methodology. *Bioch. Mol. Biol. Edu.* 2006, 34, 121-124.
31. Peter C., Brunen-Nieweler C., Cammann K., Borchers T.: Differentiation of animal species in food by oligonucleotide microarray hybridization. *Eur. Food Res. Tech.* 2004, 219, 286-293.
32. Ramella M. S., Kroth M. A., Tagliari C., Arisi A. C. M.: Optimization of random amplified polymorphic DNA protocol for molecular identification of *Lophius gastrophysus*. *Cienc. Tecnol. Aliment. Campinas.* 2005, 25, 733-735.
33. Rasmussen R. S., Morrissey M. T.: Application of DNA-based methods to identify fish and seafood substitution on the commercial market. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety.* 2009, 8, 118-154.
34. Rasmussen R. S., Morrissey M. T.: DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety* 2008, 7, 280-293.
35. Sánchez A., Quinteiro J., Rey-Mendez M., Perez-Martin R. I., Sotelo C. G.: Identification of European hake species (*Merluccius merluccius*) using Real-Time PCR. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 3397-3403.
36. Sawicki W.: Identyfikacja zafalaszowań żywności z zastosowaniem metod PCR. *Przem. Spoż.* 2009, 4, 28-31.
37. Sawicki W.: Nowelizacja ustawy o jakości handlowej artykułów rolno-spożywczych. *Przem. Spoż.* 2009, 2, 6-11.
38. Sawicki W.: Wykrywanie niewłaściwych surowców w produktach spożywczych przy zastosowaniu techniki łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). *Praca dokt., Wydz. Nauk o Żywności i Rybactwa AR, Szczecin* 2006.
39. Sawicki W., Daczowska-Kozon E.: Application of PCR (Polymerase Chain Reaction) technique for identification of genetically modified soy in processed soy products. *Folia Univ. Agric. Stetin. Sci. Alimen.* 2006, 251, 63-68.
40. Sawicki W., Dąbrowski W., Bogusławska-Wąs E., Daczowska-Kozon E., Kwiatkowska B., Szynkowska A.: Identifying Alaskan pollock fish products by PCR-RFLP technique. *Medycyna Wet.* 2009, 65, 73-144.
41. Sawicki W., Dąbrowski W., Daczowska-Kozon E.: Detection of different kinds of meat in processed food using polymerase chain reaction (PCR). *Folia Univ. Agric. Stetin. Sci. Alimen.* 2004, 238, 101-106.
42. Sawicki W., Dąbrowski W., Daczowska-Kozon E., Bogusławska-Wąs E., Bieniasz Ł.: Application of Polymerase Chain Reaction for the identification of hake (genus *Merluccius*). *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2009, 53, 75-78.
43. Teletchea F., Maudet C., Hänni C.: Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends Biotechnol.* 2005, 23, 359-364.
44. Young W. P., Wheeler P. A., Coryell V. H., Keim P., Thorgaard G. H.: A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids. *Genetics* 1998, 148, 839-850.
45. Zhang J., Cai Z.: Differentiation of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from Atlantic salmon (*Salmo salmar*) by the AFLP-derived SCAR. *Eur. Food Res. Technol.* 2006, 223, 413-417.
46. Zhang J., Huang H. D., Cai Z., Huang L.: Species identification in salted products of red snappers by semi-nested PCR-RFLP based on the mitochondria 12S rRNA gene sequence. *Food Control.* 2007, 18, 1331-1336.