

# Kontrola mieszanki paszowej na obecność komponentów pochodzenia zwierzęcego

MAŁGORZATA NATONEK-WIŚNIEWSKA, EWA SŁOTA, BARBARA REJDUCH

Dział Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt Instytutu Zootechniki, ul. Krakowska 1, 30-083 Balice

Natonek-Wiśniewska M., Słota E., Rejduch B.

## Methods of detecting animal components in feedstuff

### Summary

Epizootiological studies have shown that meat-and-bone meal of ovine or bovine origin added to feed concentrates are infectious agents in bovine spongiform encephalopathy (BSE). In view of the ban on the use of meat-and-bone meal in animal feed in European Union countries, the aim of the study was to elaborate methods for identifying chicken and sheep DNA in compound feeds. A duplex PCR reaction (simultaneous amplification of chicken and sheep DNA) was used to identify mtDNA specific to chickens and sheep. The reaction products were subjected to electrophoresis in 4% agarose gel in the presence of X 174DNA/HaeIII marker. The results obtained enabled the identification of DNA specific to both chickens and sheep.

**Keywords:** BSE, MBM, PCR

Z badań epizootologicznych BSE wynika, że czynnik zakaźny przenoszony jest przez mączki mięsno-kostne pochodzenia owczego lub bydłowego, dodawane do koncentratów paszowych. W związku z tym w ramach profilaktyki przeciwko tej chorobie wprowadzono szereg ustaw regulujących skarmianie zwierząt mieszankami zawierającymi mączki.

Ustawy, o których mowa, wprowadziły zakaz dodawania mączek mięsno-kostnych do karmy dla wszystkich zwierząt, których mięso jest przeznaczone do konsumpcji (Council decision 766/2000/EC) bądź dopuściły do stosowania jedynie dla zwierząt nieprzeżuwających i to pod warunkiem, że nie zawierają materiału pochodzącego od tego samego gatunku, co skarmiane nimi zwierzęta (Council regulation 1774/2002/EC).

Ważne zatem stało się opracowanie metod pozwalających na skuteczną kontrolę mieszanek paszowych celem identyfikacji w nich zawartości komponentów pochodzenia zwierzęcego. W związku z tym Europejski Instytut Normalizacji w porozumieniu z UE, w swoim biuletynie, zaleca prowadzenie badań nad wdrożeniem metod takich, jak spektroskopia w niskiej podczerwieni oraz analiza DNA, które pozwolą na gatunkową identyfikację składników zwierzęcych (4).

W tego typu analizach DNA wykorzystywane jest mtDNA, które ze względu na duże zróżnicowanie wśród kręgowców (10), jest dobrym markerem specyficznej identyfikacji poszczególnych gatunków zwierząt.

Metoda wykorzystująca mtDNA pozwala na identyfikację komponentów pochodzenia bydłowego, świńskiego i owczego (7). Oprócz wymienionych mączek często do skarmiania używa się mączki kurzej, dlatego również jej identyfikacja wydaje się uzasadniona. Aby skrócić czas analizy oraz ograniczyć jej koszty, warto zastosować metodę pozwalającą na jednoczesną identyfikację przynajmniej dwóch komponentów. Celem badań było opracowanie

metod pozwalających na: identyfikację w mieszance paszowej komponentu pochodzenia kurzego oraz równoczesną identyfikację komponentów pochodzenia kurzego i owczego.

### Materiał i metody

Materiał doświadczalny stanowiły:

a) standaryzowana mieszanka paszowa nie zawierająca mączki mięsno-kostnej, pochodząca z Działu Żywienia Zwierząt Instytutu Zootechniki,

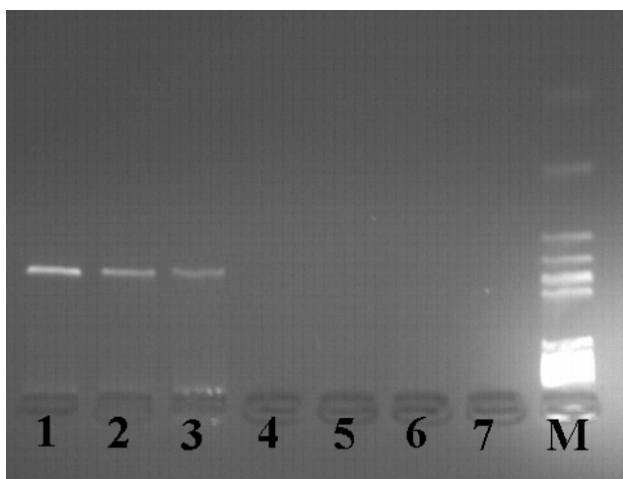
b) próbki mieszanek paszowych zawierające: 2, 4 i 8% kurzych mączek mięsnych; 4% owczych mączek mięsnych; 4% bydłych mączek mięsnych; 4% świńskich mączek mięsnych; 4% kurzych i owczych mączek mięsnych.

Mieszanki zostały sporządzone poprzez zmieszanie w odpowiedniej proporcji wymienionych mączek mięsnych ze standaryzowaną mieszanką paszową nie zawierającą mączki mięsno-kostnej. Mączka mięsna została przygotowana we własnym zakresie w oparciu o proces technologiczny produkcji MBM na skalę przemysłową (3). Proces ten obejmował, między innymi, obróbkę termiczno-baryczną (140°C, 3 Ba, 20 min.) zgodną z zaleceniami UE (Council decision 99/534/EC).

Cykl analityczny związany z identyfikacją mtDNA zwierząt obejmował: izolację DNA zawartego w mieszankach paszowych, amplifikację wyizolowanego DNA w reakcji PCR, elektroforezę w żelu agarozowym, analizę wyników rozdziału elektroforetycznego.

Do izolacji zastosowano metodę polegającą na wiązaniu DNA z krzemionką w obecności tiocyjanku guanidyny, a następnie wymywaniu go przez bufor TE (1). Dodatkowo użyto kazeiny (2) w celu usunięcia ewentualnego zdegradowanego DNA.

Drugim etapem analizy było powielenie w reakcji PCR sekcji charakterystycznej dla kur i owiec. Amplifikację przeprowadzono za pomocą zmodyfikowanego programu termicznego podanego przez Lahiffa (5): 94°C – 5 minut 30 cykli (94°C – 1 min., 58°C – 1 min., 72°C – 1 min., 72°C – 5 minut) i przy zastosowaniu starterów podanych również przez tego autora.



Ryc. 1. Obraz żelu po elektroforezie: mieszanka paszowa zawierająca: 1) 8% mączkę kurzą; 2) 4% mączkę kurzą; 3) 2% mączkę kurzą; 4) 4% mączkę owczą; 5) 4% mączkę wieprzową; 6) 4% mączkę bydłą; 7) negatywna kontrola; M) marker wielości. Autor: Małgorzata Natonek-Wiśniewska

**Amplifikacja kurzego DNA.** DNA wyizolowane z badanych mieszanek paszowych zostało powielone w reakcji PCR, w której stężenie poszczególnych składników w mieszaninie wynosiło: 1 × Buffer; dNTPmix – 0,5 mM; polimeraza AmpliTaq Gold – 0,05 U/μl; żelatyna – 0,039%; MgCl<sub>2</sub> – 1,5 mM. Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 25 μl.

**Równoczesna amplifikacja kurzego i owczego DNA.** DNA wyizolowane z mieszanek paszowych zawierających 4% mączki kurzej, 4% mączki owczej oraz 4% obu mączek zostało powielone w reakcji PCR, w której stężenie poszczególnych składników w mieszaninie wynosiło: 1 × Buffer; dNTPmix – 0,5 mM; polimeraza AmpliTaq Gold – 0,05 U/μl; żelatyna – 0,0644%; MgCl<sub>2</sub> – 1,5 mM. Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 12,5 μl.

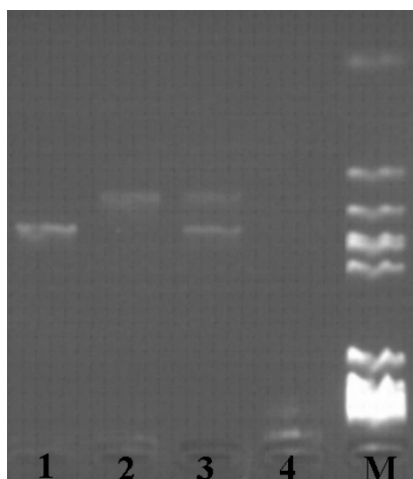
Otrzymany w reakcji PCR produkt był analizowany i identyfikowany przez elektroforezę w 4% żelu agarozowym z zastosowaniem bromku etydyny. Długość rozdzielonych fragmentów DNA określono w postaci bezwzględnych wartości liczby par zasad (pz), przez porównanie z markerem DNA (X 174 DNA/Hae III) o znanych długościach fragmentów.

## Wyniki i omówienie

**Identyfikacja kurzego komponentu.** Na obrazie żelu przedstawiającym wynik elektroforezy produktów reakcji PCR między starterami kurzymi a kurzym DNA (próbki 1, 2, 3) otrzymano produkt o długości 266 pz. (ryc. 1). W przypadku powielania DNA pochodzącego od owiec, świń i bydła (próbki 5, 6, 7) nie uzyskano produktu.

Wynik doświadczenia wskazuje na trafność wyboru do analizy zarówno mtDNA, który zgodnie z przewidywaniami pozwolił na rozróżnienie mączki kurzej od innych badanych mączek, jak również użytych starterów. Zastosowane startery okazały się specyficzne gatunkowo i pozwoliły na identyfikację wysoko przetworzonych komponentów (1, 6, 10).

Grubość prążka w żelu jest wprost proporcjonalna do ilości zawartego w próbce komponentu kurzego. Można więc stwierdzić, że technika ta jest metodą półilościową, tzn. można wykazać za jej pomocą orientacyjną ilość komponentu zwierzęcego w mieszankach paszowych, przez porównanie grubości prążka w żelu po elektrofo-



Ryc. 2. Obraz żelu po elektroforezie: mieszanka paszowa zawierająca mączkę pochodzenia: 1) kurzego; 2) owczego; 3) kurzego i owczego; 4) negatywna kontrola; M) marker. Autor: Małgorzata Natonek-Wiśniewska

kur prążka 266 pz, również produkt o długości 225 pz. charakterystyczny dla owiec (próbka 3).

Metoda identyfikacji dodatku kurzej mączki do pasz na podstawie analizy mtDNA charakteryzuje się wysoką specyficznością, a wynik jej jest obiektywny, dlatego jest ona przydatna do rutynowej kontroli pasz. Zastosowanie reakcji PCR typu duplex skraca czas i obniża koszty analizy.

## Wniosek

Zastosowanie opracowanych metod do badania pasz może zapewnić dobrą ich kontrolę, a tym samym, wraz z testami do diagnostyki BSE (8, 9), przyczynić się do zapobiegania rozprzestrzenianiu się gąbczastych encefalopatii.

## Piśmiennictwo

1. Boom R., Sol C. J. A., Salimans M. M. M., Jansen C. L., van Dillen P. M. E., Wertheim J., van der Noordaa J.: Rapid and simple method of purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 1990, 28, 495-503.
2. Boom R., Cees S., Beld M., Weel J., Goudsmit J., van Dillen P. W.: Improved silica-guanidiniumthiocyanate DNA isolation procedure based on selective binding of bovine alpha-casein to silica particles. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37, 615-619.
3. Hahn H.: Animal meal: production and determination in feedstuffs and the origin of bovine spongiform encephalopathy. *Naturwissenschaften.* 1999, 86, 62-70.
4. Institute for Reference Materials and Measurement. Animal by-products in animal feed. November 2003.
5. Lahiff S., Glennon M., O'Brien L., Lyng J., Smith T., Maher M., Shilton N.: Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meat and bone meal (MBM). *Mol. Cell. Probes* 2001, 15, 27-35.
6. Lahiff S., Glennon M., Lyng J., Smith T., Shilton N., Maher M.: Real-time polymerase chain reaction detection of bovine DNA in meat and bone meal samples. *J. Food Prot.* 2002, 65, 1158-1165.
7. Natonek M., Słota E., Żyga A., Rejduch B.: The utilization of methods based on protein and DNA analysis for identification of animal-origin components in feeds. *J. Anim. Feed Sci.* 2004, 13, 73-76.
8. Polak M., Larska M., Żmudziński J.: Nowe szybkie testy do diagnostyki post mortem BSE. *Med. Wet.* 2003, 10, 876-878.
9. Polak M., Rożek W., Żmudziński J.: Monitoring BSE w Polsce. *Med. Wet.* 2002, 5, 344-347.
10. Tartaglia M., Saulle E., Pestalozza S., Morelli R., Antonucci G., Bataglia P. A.: Detection of Bovine mitochondrial DNA in ruminant feeds: a molecular approach to test for the presence of bovine-derived materials. *J. Food Prot.* 1997, 61, 513-518.

Adres autora: dr Małgorzata Natonek-Wiśniewska, ul. Tokarskiego 2/410, 30-065 Kraków; e-mail: mnatonek@izoo.krakow.pl