

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

(typ výsledku „NmetC“)

VYUŽITÍ POLYMERÁZOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCE PRO AUTENTIZACI MAKRELY OBECNÉ (*SCOMBER SCOMBRUS*)



Autorský kolektiv:

**Eliška Čermáková^{1,2}, Farkas Kerényi¹, Subham Mukherjee^{1,3}, Kateřina Demnerová²,
Kamila Zdeňková²**

¹ Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i.

² Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

³ Univerzita Karlova v Praze

Praha, srpen 2023

Dedikace:

Metodika byla vypracována v rámci řešení výzkumného projektu NAZV QK1910231 (kód výstupu QK1910231-V15)

Metodu zpracovali:

Ing. Eliška Čermáková^{1,2} (45 %), Ing. Farkas Kerényi, Ph.D.¹ (15 %),
Mgr. Subham Mukherjee^{1,3} (10 %), Ing. Kamila Zdeňková, Ph.D.² (20 %),
prof. Ing. Kateřina Demnerová, CSc.² (10 %)

¹ Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i.
Radiová 1285/7, 102 00 Praha 10 – Hostivař

² Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Ústav biochemie a mikrobiologie, FPBT
Technická 3, 166 28 Praha – 6 Dejvice

³ Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Benátská 2, 128 01 Praha 2

Oponenti:

- 1) Ing. Veronika Kýrová, Ph.D.
- 2) Ing. Martin Kubík, Ph.D.

© Eliška Čermáková, Farkas Kerényi, Subham Mukherjee, Kateřina Demnerová,
Kamila Zdeňková, 2023

ISBN 978-80-7592-224-3

OBSAH

1.	CÍL METODIKY	4
2.	VLASTNÍ POPIS METODIKY	4
2.1	Současný stav sledované problematiky.....	4
2.2	Princip metody PCR.....	6
2.3	Chemikálie a spotřební materiál	7
2.4	Přístroje a zařízení.....	8
2.5	Pracovní postup	9
2.5.1	Schematické znázornění metodiky	9
2.5.2	Homogenizace a izolace DNA ze vzorků	10
2.5.3	Kvalitativní a kvantitativní stanovení izolované DNA.....	11
2.5.4	PCR analýza.....	12
2.6	Analýza dat.....	15
2.7	Pracovní charakteristiky metody	16
2.7.1	Výtěžnost izolace DNA	16
2.7.2	Specificita, citlivost a účinnost PCR metody.....	17
2.7.3	Robustnost metody a analýza rizik	21
3.	SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	22
4.	POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY.....	23
5.	EKONOMICKÉ ASPEKTY	24
6.	SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY.....	26
7.	SEZNAM PUBLIKACÍ PŘEDCHÁZEJÍCÍCH METODICE.....	27

1. CÍL METODIKY

Dílčím cílem projektu QK1910231 podporovaného Ministerstvem zemědělství České republiky bylo vyvinout metodu umožňující autentizaci komerčně významných druhů ryb pomocí analýzy DNA. Předkládaná metodika je zaměřena na možnost detekce a identifikace DNA makrely obecné (*Scomber scombrus*), která se na českém trhu vyskytuje především tepelně opracovaná nebo v podobě rybích výrobků a je tak snadno falšovanou komoditou. Navržená metodika je založena na metodě polymerázové řetězové reakce (PCR), která umožňuje detekci krátkých úseků DNA specifických pro vybraný živočišný druh.

Vypracovaná metodika bude dále předána pracovníkům Státního veterinárního ústavu (SVÚ), pro možné využití tohoto laboratorního postupu při posuzování autenticity makrely obecné a jejího zastoupení v rybích výrobcích.

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

2.1 SOUČASNÝ STAV SLEDOVANÉ PROBLEMATIKY

Makrela obecná (*Scomber scombrus*) je hospodářsky významný rybí druh. Spotřebiteli je makrela ceněna především pro obsah vysoce kvalitních bílkovin a polynenasycených mastných kyselin, které mohou snižovat riziko srdečních onemocnění [1-3]. Díky svým nutričním vlastnostem a chuti, ale i snadnému rybolovu díky jejich migraci k břehům ve velkých hejnech, je tak jednou z nejvíce konzumovaných ryb světa.

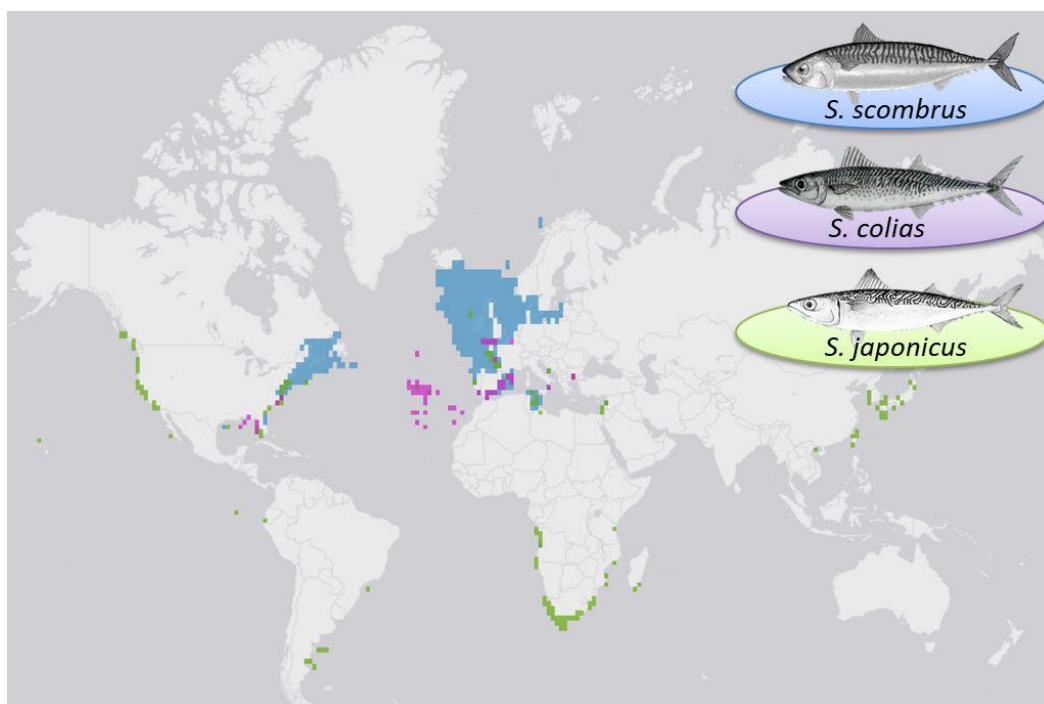
V České republice je nejčastěji prodávána makrela obecná uzená nebo zpracována do rybích produktů, jako jsou konzervy či pomazánky. V takových případech obvykle není možné identifikovat použitý druh na základě morfologických znaků a tyto potraviny tak často podléhají falšování, jako je záměna rybích druhů nebo nižší obsah rybí svaloviny, než je deklarováno na obalu [4,5]. Riziko falšování se zvyšuje také se vzrůstající celosvětovou spotřebou ryb a zvyšujícími se náklady pro výrobu daných produktů [5-7].

Podle údajů FAO dosáhl odlov makrely obecné v roce 2020 1.049.000 tun živé váhy [7,8], což odpovídá zhruba 1 % z celkového odlovu mořských ryb, a poptávka na trhu každoročně roste. Do výrobků prodávaných v České republice se tak kromě makrely obecné

běžně používá i makrela japonská (*Scomber japonicus*), která je považována za nejrozšířenější druh makrel [9], případně makrela atlantská (*Scomber colias*).

Makrela atlantská se, společně s makrelou obecnou, přirozeně hojně vyskytuje v severním Atlantském oceánu. Záměna těchto dvou druhů je tak velmi snadná a náklady na dopravu ryb ke spotřebiteli se tak příliš neliší. Naopak makrelu japonskou je nutné do Evropy dovážet z oblastí Tichého oceánu (Obr. 1). Cena za kilogram se tak v tomto případě může zvýšit v závislosti na dopravě; zároveň je tento přístup méně ekologický. I přes tento fakt je však makrela obecná stále nejdražším prodávaným druhem z výše uvedených makrel [10].

Jako makrela však bývají označovány i druhy, které nepatří do rodu *Scomber*. Příkladem může být makrela královská (*Scomberomorus cavalla*), makrela dvoupásá (*Grammatorcynus bilineatus*) či makrela Solandrova (*Acantocybium solandri*). V případě krmiv je běžné označení zastoupeného druhu ryby pouze českým rodovým jménem „makrela“, což může snadno uvést pro spotřebitele v omyl.



Obr. 1: Přirozený výskyt makrely obecné, japonské a atlantské (www.fishbase.se; <https://mapper.obis.org/>)

Z výše uvedených důvodů je vhodné mít k dispozici metodu, která umožní rychlé analýzy ryb a rybích výrobků a zhodnocení jejich autenticity. Jako velmi perspektivní a efektivní metoda pro odlišení rybích druhů z čeledi *Scombridae* se jeví polymerázová řetězová reakce (PCR) umožňující detekci specifických úseků DNA i ve zpracovaných produktech.

Dosud byla publikována metoda pro simultánní detekci makrely obecné a kranase obecného (*Trachurus trachurus*) s využitím real-time PCR s TaqMan sondou [11], což neumožňuje jednoznačnou identifikaci a kvantifikaci DNA makrely obecné. Oba amplifikované druhy bylo možné odlišit pomocí následné analýzy křivek tání amplikonů, díky čemuž lze spolehlivě ověřit autenticitu makrely obecné, nikoliv však její kvantitativní zastoupení [11].

Metodu identifikace makrely obecné s využitím real-time PCR publikoval také Velasco, *et al.* [12], avšak dle uvedených výsledků nejsou navržené primery zcela specifické pro detekovaný druh. Kromě makrely obecné byla amplifikována také DNA *S. colias* (Ct 37,2±1,8), *S. japonicus* (Ct 33,2±0,7) a *S. australasicus* (Ct 29,5±1,7) a 7 dalších druhů. Ačkoliv došlo k amplifikaci s významně nižší účinností než u makrely obecné (Ct 15,3±0,5), shledáváme toto jako možné riziko, neboť s vyšší koncentrací DNA v analyzovaném vzorku by mohlo dojít i k posunu Ct a vyhodnocení vzorků falešně pozitivně. Kromě toho docházelo k amplifikaci mitochondriální DNA (gen *cytb*), jejíž přesná kvantifikace může být v důsledku rozdílných počtů kopií ve svalovině, na rozdíl od jaderných genů, obtížná.

Předkládaná metodika si tak kladla za cíl navrhnout metodiku, která bude za daných podmínek spolehlivě identifikovat DNA makrely obecné. Další výhodou je využití parvalbuminového genu jako detekovaného cíle, jelikož se jedná o genomový marker. Jeho detekce navíc poskytuje informaci o přítomnosti nejvýznamnějšího alergenu ryb, parvalbuminu. Díky tomu může metodika poskytnout nejen kontrolu z hlediska finančních a ekologických aspektů, ale může přispět i k významné ochraně zdraví spotřebitele.

2.2 PRINCIP METODY PCR

Metoda PCR je založena na zmnožení (amplifikaci) krátkých úseků DNA specifických pro vybraný druh a jeho následné detekci na agarózovém gelu, kde dochází k rozdělení vzniklých amplikonů na základě jejich délky, či záznamem fluorescenčního signálu v reálném čase,

který umožňuje monitoring reakce již v jejím průběhu. PCR s fluorescenční detekcí v reálném čase (qPCR) je docíleno přidáním fluoroforu do reakční směsi. Naměřená hodnota fluorescence umožňuje navíc kvantitativní analýzu počátečního množství DNA ve vzorku.

2.3 CHEMIKÁLIE A SPOTŘEBNÍ MATERIÁL

Pro přípravu roztoků, PCR reakční směsi a elektroforetickou detekci ampliconů byly použity následující chemikálie v kvalitě pro analýzu¹:

- **Bio-Rad Laboratories Inc., USA:** Agaróza pro molekulární biologii
- **Applied Biosystems, USA:** 2x Power SYBR Green Master Mix
- **Generi Biotech, CZE:** Primery
- **Elisabeth Pharmacon, spol. s.r.o., CZE:** Midori Green Advance DNA Stain
- **Eppendorf AG, DEU:** 5X TBE pufr
- **New England Biolabs, Inc., USA:** Standardy pro elektroforézu - Lambda DNA/*Hind*III Marker, 50 bp DNA Ladder, 100 bp DNA Ladder
- **Penta, CZE:** Chlorid sodný p. a., ethanol (96%), isopropanol p. a., chloroform p. a.
- **Promega Corporation, USA:** voda zbavená nukleas (Nuclease Free Water - NFW)
- **Sigma - Aldrich, USA:** Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) cetyltrimethylamonium bromid (CTAB), proteinasa K (*Tritirachium album*), ribonukleasa A (hovězí pankreas), Tris-HCl p. a.

Použité roztoky a pufry

- **5x TBE pufr** (45mM Tris-borát; 1mM EDTA; pH 8,3)
1x TBE bylo připraveno naředěním 200 ml zásobního roztoku (5x TBE) 800 ml destilované vody.
- **CTAB extrakční pufr** (20 g·l⁻¹ CTAB; 1,4M NaCl; 100mM Tris; 20mM EDTA; pH upraveno na 8,0)
10 g CTAB; 40,9 g NaCl; 6,05 g Tris a 3,725 g EDTA bylo rozpuštěno v 250 ml sterilní destilované vody. Objem byl doplněn do 500 ml, pH roztoku bylo upraveno na 8,0. Pufr byl následně sterilován v autoklávu při teplotě 121 °C, 20 minut.

¹ Validace byla provedena s chemikáliemi uvedeného původu; lze však použít i jiného dodavatele za předpokladu, že kvalita bude odpovídající.

- **CTAB precipitační roztok** (5 g·l⁻¹ CTAB; 40mM NaCl; pH upraveno na 8,0)
2,5 g CTAB a 1,25 g NaCl bylo rozpuštěno v 250 ml sterilní destilované vody. Celkový objem byl doplněn vodou do 500 ml, pH roztoku bylo upraveno na 8,0. Roztok byl sterilován v autoklávu při teplotě 121 °C, 20 minut.
- **1,2M NaCl**
7 g NaCl bylo doplněno destilovanou vodou do 100 ml. Roztok byl poté sterilován v autoklávu při teplotě 121 °C, 20 minut.
- **Ethanol - roztok 70% (v/v)**
70 ml abs. ethanolu bylo smícháno s 30 ml sterilní destilované vody.
- **Proteinasa K (20 mg·ml⁻¹)**
K 20 mg proteiny K (EC 3.1.27.5) byl přidán 1 ml NFW. Aktivita proteiny K udávaná výrobcem byla min. 8 DMC-U na mg. Roztok byl skladován při teplotách od -18 do -25 °C.
- **Ribonukleasa A (10 mg·ml⁻¹)**
K 10 mg ribonukleasy A (EC 3.1.27.5) byl přidán 1 ml NFW vody. Roztok byl skladován při teplotách od -18 do -25 °C.

Materiál:

- Běžné laboratorní sklo a plast používaný pro PCR a qPCR

2.4 PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ

Pro práci v laboratoři a zajištění správného průběhu PCR analýzy byly použity tyto přístroje a zařízení²:

Analytické váhy	Scaletec, JAR
Autokláv VX-55	Systemec, DEU
Box s laminárním prouděním vzduchu	Azbil Telstar Technologies, ESP
Centrifuga Eppendorf MiniSpin	Eppendorf, DEU
Centrifuga my Fuge Mini, Plate Fuge	Benchmark Scientific, USA

² Přístroje a zařízení uvedených dodavatelů byly použity při vývoji a validaci této metody, lze ale použít položky od alternativních dodavatelů, pokud jsou pro daný účel vhodné. Vhodnost musí být dokumentována při implementaci metody v konkrétních podmínkách

Fotodokumentační systém C200	Azure biosystems, USA
Homogenizátor (mixér R-595)	Rohnson, CZE
Horizontální elektroforéza MBE-150	Major Science., USA
Lednice (2-6 °C)	Liebherr Premium, DEU
Mikrovlnná trouba	ETA, CZE
Mrazicí box (-20°C)	Liebherr Comfort, DEU
Fluorometr Quantus	Promega Corporation, USA
pH metr EDGE	HANNA® instruments, CZE
Pipety	Eppendorf AG, DEU
Spektrofotometr NanoDrop One	Thermo Scientific, USA
Termocyklér s fluorescenčním detektorem	Applied Biosystems, USA
Vortex Yellowline TTS 2	IKA-Works, INS., USA
Výhřevný blok Thermomixer comfort	Eppendorf, DEU
Zařízení na přípravu destilované vody	Labor Komplet, CZE

2.5 PRACOVNÍ POSTUP

2.5.1 Schematické znázornění metodiky

Analýza DNA potravin je obvykle složena z těchto navazujících kroků: I) odběr a příprava vzorku; II) homogenizace a vážení laboratorního vzorku; III) izolace DNA; IV) odhad kvality a kvantity DNA, ředění na požadovanou koncentraci; V) analýza DNA pomocí vybrané molekulárně-biologické metody (např. PCR, LAMP aj.) a VI) vyhodnocení rozboru vzorku (detekce a konfirmace amplikonů). V předkládané certifikované metodice bylo ověřeno použití PCR s fluorescenční detekcí v reálném čase (qPCR); možné je využít i PCR v tradičním uspořádání, tj. s konečnou detekcí produktu na agarózovém gelu.

Analýza vzorku prostřednictvím PCR je znázorněna ve Schématu 1.

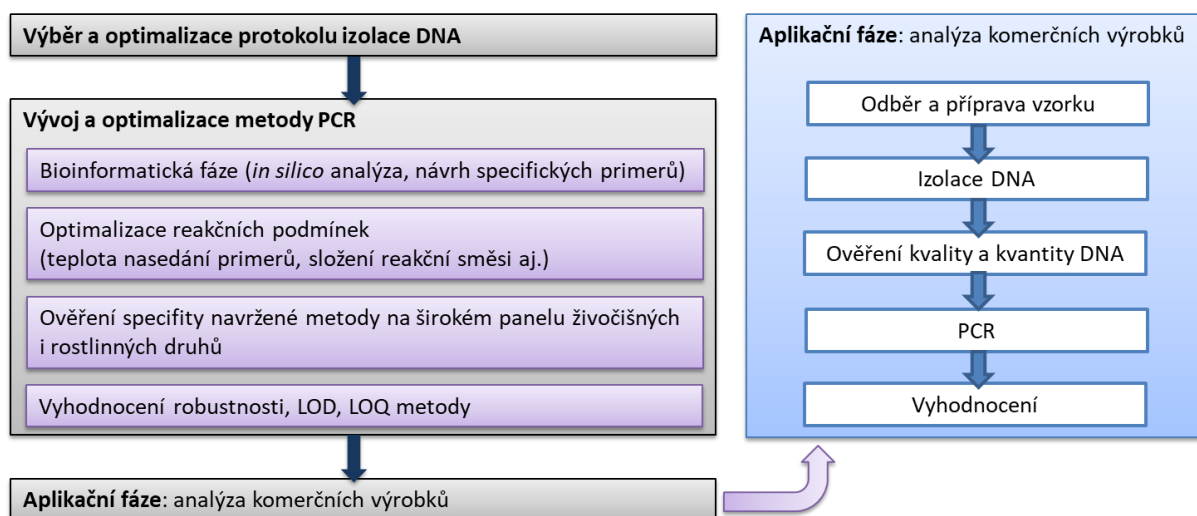


Schéma 1: Znázornění pracovního postupu DNA analýzy ryb a rybích výrobků s využitím metody PCR

2.5.2 Homogenizace a izolace DNA ze vzorků

Reprezentativní vzorek rybí svaloviny je homogenizován v laboratorním homogenizátoru (mlýnek), případně tyčovým mixérem. Mlýnek je před a po homogenizaci vzorku umyt vodou, poté 1% roztokem Sava a 70% roztokem ethanolu. Homogenizované vzorky jsou naváženy po 200 mg do mikrozkuvek o objemu 2 ml. Takto připravené vzorky jsou uchovávány v mrazicím boxu (-20 °C) až do dalšího kroku analýzy (izolace DNA).

DNA je ze vzorků rybí svaloviny extrahována za využití detergentu cetyltrimethylamoniumbromid - CTAB (výstup projektu NAZV QK1910231; kód výsledku: QK1910231-V3). Ke 200 mg homogenizovaného vzorku je přidáno 650 µl CTAB extrakčního pufru předem zahřátého na teplotu 65 °C a 50 mg skleněných kuliček. Směs je vortexována 1 min (dezintegrace tkání) a následně inkubována 30 min při teplotě 65 °C za stálého míchání (lyze buněk). Při izolaci DNA může být před první inkubací přidáno 10 µl ribonukleasy A o koncentraci 10 mg·ml⁻¹. Po inkubaci je do reakční směsi přidáno 10 µl proteinasy K o koncentraci 20 mg·ml⁻¹. Mikrozkuvka je jemně promíchána a směs je znovu inkubována po dobu 30 min při teplotě 65 °C. Následuje centrifugace při 12000 g po dobu 10 min. Poté je převedeno 650 µl supernatantu do nové mikrozkuvky, do které je předem napipetováno 650 µl chloroformu. Dvoufázová směs je důkladně protřepána, aby

došlo k převedení hydrofobních látek do chloroformové fáze. Následuje 15 min centrifugace při 12000 g. Po separaci je převedeno 630 μ l supernatantu do nové mikrozkušavky, kam bylo přidáno 1260 μ l CTAB precipitačního roztoku laboratorní teploty. Následuje promíchání pipetováním a 60 min inkubace při laboratorní teplotě, během níž dochází k precipitaci DNA. Po inkubaci je směs centrifugována 15 min při 12000 g. Supernatant je vylit (zbytky supernatantu odsát pipetou) a získaný precipitát je rozpuštěn v 350 μ l 1,2M NaCl. Do mikrozkušavky je přidáno 350 μ l chloroformu, roztok je důkladně protřepán a centrifugován po dobu 10 min při 12000 g. 300 μ l horní vodní fáze obsahující nukleové kyseliny je převedena do nové mikrozkušavky, do které bylo dodáno také 0,6 objemu (180 μ l) isopropanolu. Ten umožní druhou fázi precipitace DNA. Poté následuje 20 min inkubace při laboratorní teplotě a centrifugace 15 min při 12000 g. Následně je odstraněn supernatant; vzniklá peleta je promyta v 500 μ l 70% ethanolu (přečištění DNA). Mikrozkušavka je promíchána a následně centrifugována 10 min při 12000 g. Peleta je vysušena a poté resuspendována v 50 μ l NFW. Krátkodobé uchování izolované DNA probíhá při teplotě 2 až 8 °C (maximálně 1 měsíc), dlouhodobé skladování při -18 °C až -25 °C.

2.5.3 Kvalitativní a kvantitativní stanovení izolované DNA

Kontrola integrity a čistoty izolované DNA ze vzorku je prováděna pomocí horizontální agarózové elektroforézy; kvantita izolované DNA je stanovována fluorimetricky.

2.5.3.1 Stanovení kvality izolované DNA pomocí horizontální agarózové elektroforézy

K separaci je použit 1% agarózový gel v prostředí TBE pufru (1x). Ke zviditelnění nukleových kyselin (NK) bylo k agarózové suspenzi přidáno interkalační činidlo Midori Green. Na gel je nanášeno 10 μ l izolátu smíchaného s 2 μ l nanášecího barviva (Blue/Orange Loading Dye, 6x). Pro porovnání velikostí izolovaných nukleových kyselin je použit žebříček délek fragmentů tzv. marker (Lambda DNA/*Hind*III) o objemu 5 μ l. K vizualizaci interkalovaného činidla Midori Green je využito UV záření a dokumentace je provedena pomocí digitálního fotodokumentačního přístroje. Při elektroforéze se separují molekuly NK na základě své délky a konformace. V 1% agarózovém gelu je nedegradovaná genomová DNA eukaryotních organismů viditelná jako ostrý pruh (band) délky větší než 23 kbp; RNA

se pak zobrazuje jako dva bandy (28S:18S v poměru přibližně 2:1) obvykle kratší než 6 kbp. Degradace NK se zobrazí jako tzv. smír, kdy dojde k porušení ostrých bandů.

2.5.3.2 Fluorimetrické stanovení kvantity DNA

Fluorimetrické stanovení koncentrace DNA v izolátu je odvozeno z Lambert-Beerova zákona. Vztah pro výpočet koncentrace vyjadřuje rovnice (1):

$$I_f = I_0 * Q_f * (1 - 10^{-\varepsilon * c * l}) \quad \text{rovnice (1) ,}$$

kde I_f značí intenzitu fluorescence a I_0 původní intenzitu fluorescence, Q_f kvantový výtěžek fluorescence, ε absorpční koeficient, c koncentraci a l délku kyvety.

Pro každou látku jsou charakteristické dvě vlnové délky – excitační a emisní, díky čemuž lze fluorimetrii využít pro stanovení koncentrace měřené látky i v komplexních směsích. Oproti často používané spektrofotometrii je tak fluorimetrie selektivnější metodou.

V předkládané metodice bylo měření koncentrace DNA provedeno s využitím fluorimetru Quantus (Promega, USA) a kitu QuantiFluor® dsDNA Systém (kat. č. E2671). Postupováno bylo dle pokynů výrobce.

2.5.4 PCR analýza

Sekvence primerů (Tab. I) byly navrženy při vypracovávání metodiky; pouze sekvence primeru Mac_R je převzata z publikace Prado, Boix and von Holst [11]. Složení reakční směsi (Tab. II) a teplotní režim reakce (Tab. III) byly optimalizovány pro qPCR; vzniklé amplikony jsou analyzovány a identifikovány prostřednictvím křivek tání. Teplota tání vzniklých amplikonů je uvedena v Tab. I. Ověřena byla i možnost elektroforetického odlišení amplikonů pro případné použití klasické PCR analýzy zakončené detekcí amplikonů na agarózovém gelu.

Celkový objem jedné reakce je 25 μ l, kdy doporučená koncentrace přidávané DNA do reakce je 6,25 až 50 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Společně s analyzovanými vzorky jsou vždy prováděny i kontrolní reakce: I) pozitivní kontrola - zahrnuje přidavek cílové DNA, II) negativní kontrolní - přidavek jiné než cílové DNA, III) beztemplátová reakce - místo DNA je přidavek NFW.

Tab. I: Sekvence použitých primerů

Druh ryb	Označení primeru	Sekvence primeru (5'-3')	Délka PCR produktu (bp)	Teplota tání produktu (°C)	Amplifikovaný úsek
<i>Scomber scombrus</i>	MO_F	AGACCATGTCGTCTTTAGATTTGT	113	71,3±0,2	Gen kódující parvalbumin
	MO_R	GCTGTATAGGTGATAGGACAGA			
<i>Scomber spp.</i>	Mac_F	CTGTGCGATCATGTTGCATA	174-177	84,6±0,07	
	Mac_R	GCTGTCACCGGCCTTGAG			

Tab. II: Složení reakční směsi pro qPCR

Složky reakční směsi (RS)	Koncentrace zásobních roztoků	Finální koncentrace v RS	Objem v RS
Power SYBR Green Master Mix	2x	1x	12,5 µl
MO_F primer	20 µM	0,16 µM	0,2 µl
MO_R primer	20 µM	0,16 µM	0,2 µl
Mac_F primer	20 µM	0,16 µM	0,2 µl
Mac_R primer	20 µM	0,16 µM	0,2 µl
Voda zbavená nukleas (NFW)	-	-	9,7
DNA	25 ng µl ⁻¹	50 ng µl ⁻¹	2 µl
Celkem	-	-	25 µl

Tab. III: Teplotní cyklus qPCR s analýzou křivek tání

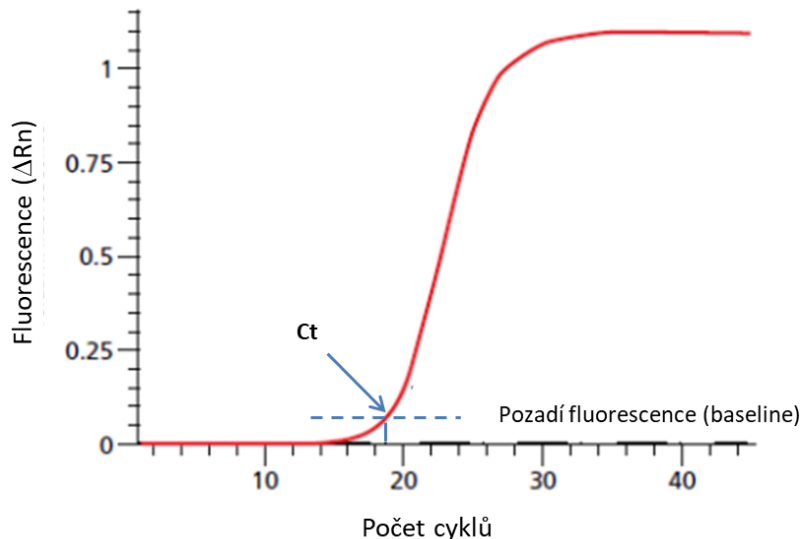
Teplotní cyklus	Počet cyklů:	Teplota:	Čas:
Počáteční denaturace	1x	95 °C	10 min
Denaturace templátu	40x	95 °C	15 s
Nasednutí primerů a elongace		60 °C	60 s
Křivka tání	1x	95 °C	15 s
		60 °C	60 s
		95 °C	15 s

2.5.4.1 Detekce a konfirmace amplikonů po qPCR

PCR analýza s fluorescenční detekcí v reálném čase (qPCR) je založena na měření fluorescence emitované fluorescenčním substrátem, který je součástí reakční směsi. V průběhu každého cyklu je, stejně jako při klasické polymerázové reakci, dvouvláknová

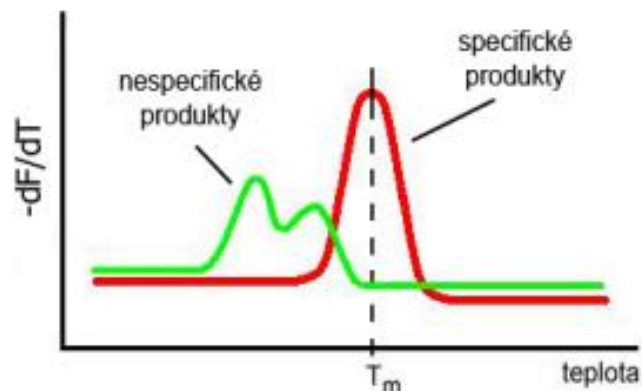
DNA (dsDNA) nejdříve denaturována, čímž dojde k oddělení jednotlivých vláken. Poté dochází k nasednutí primerů a syntéze nového vlákna DNA polymerasou. Do dsDNA se vmezeří interkalační barvivo (např. SYBR Green, Eva Green) a dochází tak k nárůstu fluorescence, která je snímána detektorem po každém reakčním cyklu. Se zvyšujícím se počtem kopií amplifikovaného úseku dochází k nárůstu fluorescenčního signálu. Výsledkem je amplifikační křivka závislosti fluorescence na reakčním cyklu (Obr. 2). Hladina fluorescence substrátu navázaného na DNA odráží množství přítomné DNA, a tedy i množství templátové DNA v analyzovaném vzorku.

Fluorescenční měření jsou prováděna na cykleru s fluorescenční detekcí, např. StepOne Plus (Applied Biosystems, USA). Po skončení PCR jsou data analyzována pomocí vhodného softwaru (např. StepOne softwareTM, Applied Biosystem). Jako pozitivní jsou vyhodnoceny vzorky, u kterých dochází k nárůstu fluorescence nad prahový detekční cyklus (angl. threshold cycle, Ct) a překročí tak definovanou základní hodnotu detekce (pozadí fluorescence). Odhad Ct je znázorněn na Obr. 2.



Obr. 2: Stanovení prahového detekčního cyklu (threshold cycle, Ct) v qPCR

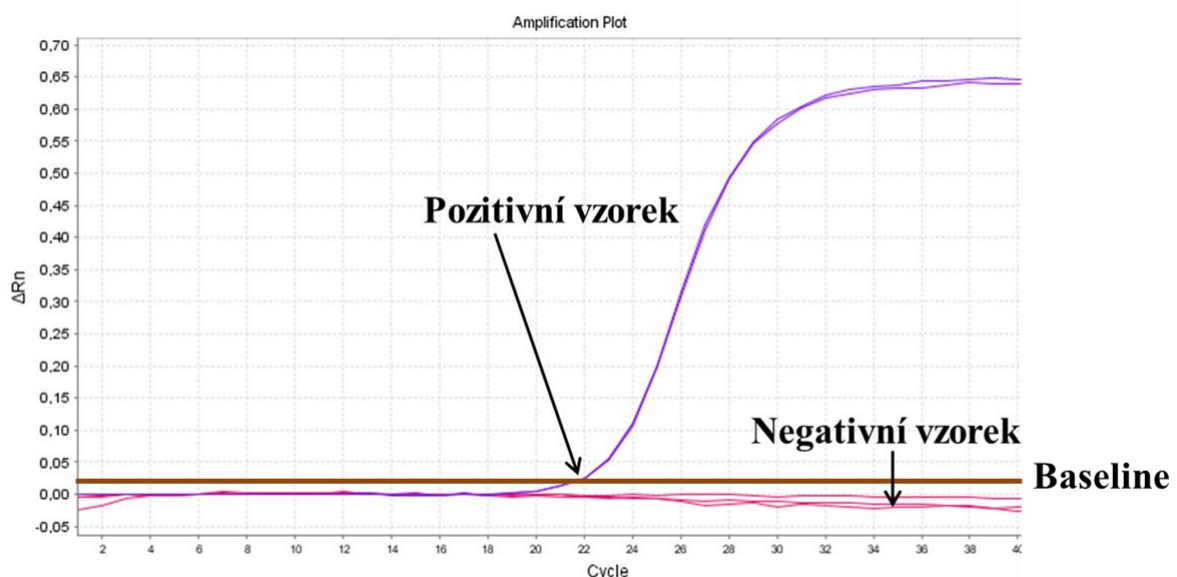
Jelikož je interkalace fluorescenčního barviva do dsDNA nespecifická (váže se i do necílové DNA), využívá se často pro vyhodnocení amplifikace analýza křivek tání (Obr. 3), případně je možné ověřit velikost požadovaných produktů na 2% agarózovém gelu obdobně jako u klasické PCR.



Obr. 3: Analýza derivovaných křivek tání - stanovení teploty tání (T_m) PCR produktu

2.6 ANALÝZA DAT

Analýza qPCR dat je založena na vyhodnocení **amplifikačních křivek** závislosti fluorescence na amplifikačním cyklu (Obr. 2; Obr.). Pokud hodnota fluorescence vzorku překročí hodnotu fluorescence základny (angl. baseline), je amplifikace vyhodnocena pozitivně a vzorek tedy obsahuje stanovovaný cílový úsek. V případě, že vzorek cílový úsek neobsahuje nebo je jeho obsah ve vzorku nižší než detekční limit použité metody, naměřená hodnota fluorescence nepřekročí hodnotu fluorescence základny (Obr.).



Obr. 4: Vyhodnocení qPCR amplifikačních křivek

Výsledek analýzy lze ověřit také elektroforeticky, kdy je ke zpracování a interpretaci výsledků použita horizontální agarózová elektroforéza. Na výsledném elektroforeogramu je

vyhodnocena přítomnost a délka produktů (odhad na základě porovnání se standardem o známé délce). Očekávané délky produktů jsou uvedeny v Tab. I.

V případě pozitivní negativní či beztemplátové kontroly nebo negativní pozitivních kontrol je nutné analýzu opakovat. Pro vyhodnocení jsou používány minimálně dvě nezávislé analýzy (paralely) zahrnující izolaci i PCR amplifikaci vzorku.

2.7 PRACOVNÍ CHARAKTERISTIKY METODY

2.7.1 Výtěžnost izolace DNA

Kvalita templátové DNA, konkrétně čistota a/nebo degradace, může ovlivnit účinnost PCR. Proto je nutné optimalizovat metodu izolace DNA především pro analýzu rybích výrobků, které mohou obsahovat látky inhibující amplifikaci DNA a ovlivnit tak výsledek PCR analýzy. Dalším rizikem u opracovaných výrobků je poškození (degradace) DNA, které může vést k snížení počtu molekul DNA vhodných pro následnou analýzu. K degradaci DNA může dojít například vlivem mechanického poškození, působením vyšších teplot či nízkého pH [13]. Důležitým faktorem pro správný průběh PCR analýzy je tak i koncentrace získaného izolátu DNA.

Pro účely certifikované metodiky byla DNA izolována s využitím detergentu CTAB. Nejnižší dosažená koncentrace DNA izolované z čisté svaloviny ryb byla naměřena pro tresku obecnou, a to $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Pro všechny ostatní testované druhy byla naměřená koncentrace vyšší. DNA izolovaná z komerčních výrobků byla rovněž v koncentraci dostatečné pro následnou PCR analýzu. Průměrné koncentrace DNA a poměry absorbancí poukazující na čistotu izolátu naměřené spektrofotometricky při vlnových délkách 260 a 280 nm jsou uvedené v Tab. IV (po odečtu absorbance pozadí A_{320}). Z uváděných hodnot je patrné, že vybraná metoda izolace DNA byla úspěšně použita i pro zpracovanou rybí svalovinu.

Tab. IV: Ukázka spektrofotometricky naměřených hodnot absorbancí a koncentrace DNA izolované z rybí svaloviny s využitím metody CTAB

Analyzované vzorky	$(A_{260}-A_{320})/(A_{280}-A_{320})$	$(A_{260}-A_{320})/(A_{230}-A_{320})$	Koncentrace [ng·μl ⁻¹] ± SD
Makrela obecná	1,9 ± 0,1	2,0 ± 0,4	124,5 ± 78,8
Makrela obecná uzená	1,7 ± 0,1	1,8 ± 0,1	79,8 ± 39,9
Pelamida obecná	2,0 ± 0,1	1,9 ± 0,5	248,2 ± 160,1
Losos obecný	2,0 ± 0,0	2,4 ± 0,2	302,7 ± 57,9
Tilapie nilská	1,9 ± 0,1	1,5 ± 0,2	71,0 ± 40,6
Treska obecná	2,0 ± 0,4	0,9 ± 0,3	17,5 ± 11,3
Slávky jedlé	1,7 ± 0,7	1,2 ± 0,6	781,0 ± 347,5
Tuňák žlutoploutvý	1,9 ± 0,2	1,7 ± 0,7	228,3 ± 50,3
Rybí výrobek 1 (<i>S.scombrus</i> *)	1,7 ± 0,1	3,6 ± 0,3	126,7 ± 9,5
Rybí výrobek 2 (<i>S.japonicus</i> *)	1,7 ± 0,1	3,3 ± 0,6	172,1 ± 59,5
Rybí výrobek 3 (<i>S.colias</i> *)	2,0 ± 0,0	2,5 ± 0,1	626,4 ± 263,3

*druh makrely podle deklarace výrobcem na obalu výrobku

2.7.2 Specificita, citlivost a účinnost PCR metody

PCR umožňuje detekovat vybraný cílový úsek DNA, specifický pro testovaný živočišný druh či jejich skupinu, díky selektivitě použitých oligonukleotidů (primerů). Primery nasedají k vybranému úseku DNA genu na základě komplementarity bazí, proto je důležité věnovat velkou pozornost *in silico* analýze známých nukleotidových sekvencí a zvolit takový úsek DNA, který se od necílové DNA dostatečně liší. V předkládané metodice byly za tímto účelem použity veřejně dostupné databáze, jako je NCBI či ENA. Výsledky ukázaly vysokou specifitu navržených primerů MO k parvalbuminovému genu makrely obecné; očekávaná délka ampliconu je 113 bp (Obr. 5). Primery Mac vykazují dle databáze NCBI specifitu k makrele obecné (produkt 177 bp) a makrele japonské (174 bp).

A)		B)	
Primer pair 1		Primer pair 1	
	Sequence (5'->3')		Sequence (5'->3')
Forward primer	AGACCATGTCGTCTTTAGATTTGT	Forward primer	CTGTGCGATCATGTTGCATA
Reverse primer	GCTGTATAGGTGATAGGACAGA	Reverse primer	GCTGTCACCGCCTTGAG
Products on target templates		Products on target templates	
>FN544077.1 Scomber scombrus pvalb gene for parvalbumin beta		>FN544077.1 Scomber scombrus pvalb gene for parvalbumin beta	
product length = 113		product length = 177	
Forward primer	1 AGACCATGTCGTCTTTAGATTTGT 24	Forward primer	1 CTGTGCGATCATGTTGCATA 20
Template	342 365	Template	606 625
Reverse primer	1 GCTGTATAGGTGATAGGACAGA 22	Reverse primer	1 GCTGTCACCGCCTTGAG 18
Template	454 433	Template	782 765
		>EF016113.1 Scomber japonicus parvalbumin gene, complete cds	
		product length = 174	
		Forward primer	1 CTGTGCGATCATGTTGCATA 20
		Template	589 T....G..... 608
		Reverse primer	1 GCTGTCACCGCCTTGAG 18
		Template	762 745

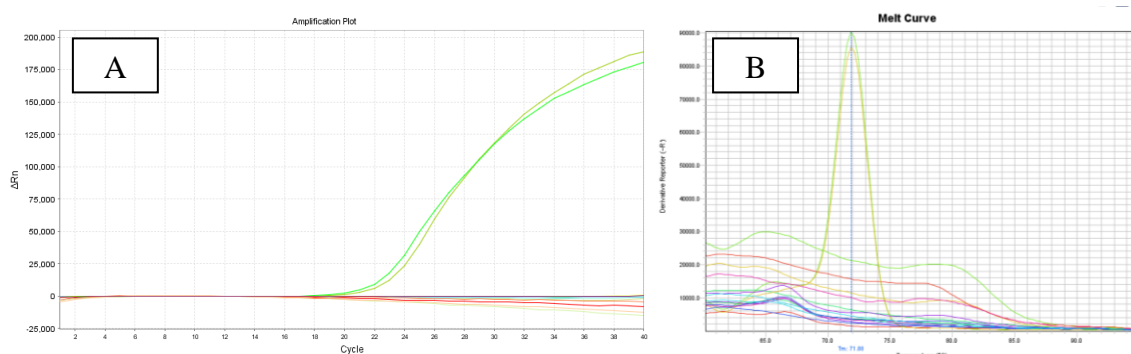
Obr. 5: Ukázka výsledků *in silico* analýzy navržených primerů MO (A) a Mac (B) v databázi NCBI

Specifita navržených primerů za daných reakčních podmínek byla dále ověřena experimentálně s DNA 26 živočišných druhů; konkrétně se jednalo o: makrelu obecnou, makrelu japonskou, pelamidu obecnou, tuňáka žlutoploutvého, tuňáka modroploutvého, štiky obecnou, kapra obecného, lososa obecného, pstruha duhového, tresku obecnou, tresku tmavou, štikozubce argentinského, tilapie nilské, candáta obecného, mořského d'asa, d'asa černobřichého, platýse obecného, mahi mahi, vlkouše obecného, sivena amerického, slávku jedlou, krevety, kachnu domácí, kur domácí, jelena, daňka. Kromě toho byla testována také možnost analýzy směsných vzorků. Za tímto účelem byly připraveny dvoudruhové směsi, a to ze svaloviny I) makrely obecné a pelamidy obecné a II) makrely obecné a makrely japonské v různých poměrech (zastoupení 1 až 99 hmotnostních procent jednotlivých druhů). DNA izolovaná z připravených směsí byla analyzována stejně jako DNA z jednotlivých druhů; navíc byla ověřena možnost stanovení (kvantifikace) hmotnostních procent svaloviny ve vzorku.

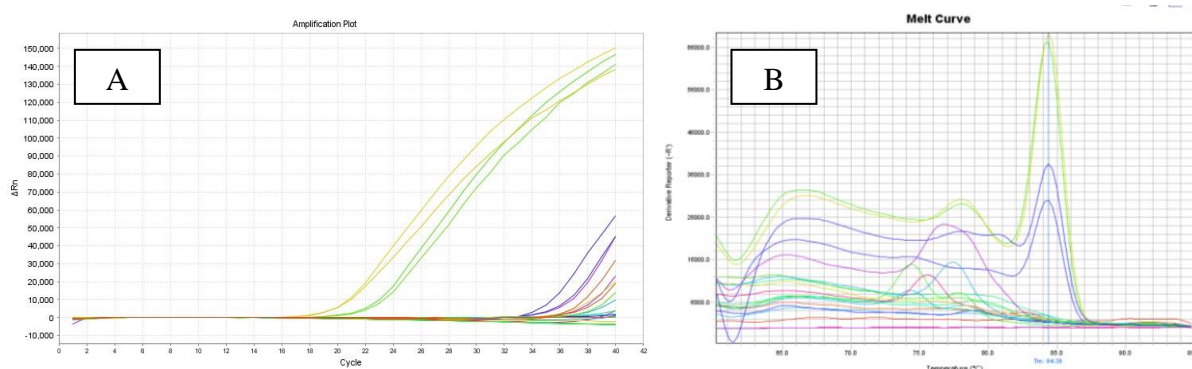
Bylo prokázáno, že primery navržené pro makrelu obecnou (MO) amplifikují pouze DNA makrely obecné (Ct 21,45±0,06 pro koncentraci DNA 50 ng·μl⁻¹); primery Mac pak

nasedaly dle očekávání na DNA zástupců rodu *Scomber* (Obr. 6 a 7). Slabě amplifikovány byly také DNA zástupců jiných rodů, avšak rozdíl mezi Ct makrel (≤ 22) a nespecifických produktů byl více než 10 cyklů ($Ct \geq 35$) a lze je tak považovat za nevýznamné. Falešně pozitivní by mohla být vyhodnocena křivka tání tuňáka žlutoploutvého a tilapie nilské, proto je nutno vždy zohlednit Ct amplifikační křivky při vyhodnocení reakce.

Pomocí horizontální agarózové elektroforézy byla ověřena velikost produktů, která odpovídala očekávaným velikostem. Zároveň tak bylo prokázáno, že je pro průkaz přítomnosti DNA makrely obecné možné využít také PCR ve formátu end-point.



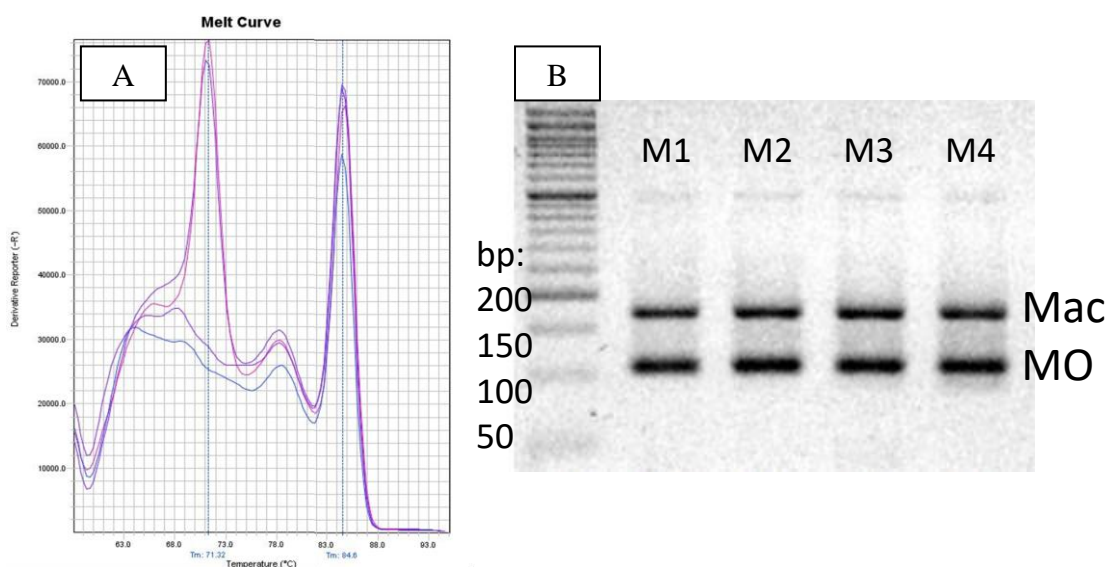
Obr. 6: Ukázka křivky amplifikace (A) a křivky tání (B) DNA makrely obecné. V uvedeném příkladu byla testována DNA makrely obecné (zelené křivky), pelamidy obecné, tuňáka žlutoploutvého, tuňáka modroploutvého, štiky obecné, kapa obecného, lososa obecného, pstruha duhového, pstruha obecného, tresky tmavé, štikozubce argentinského, tilapie nilské, candáta obecného, mořského d'asa, d'asa černobřichého, platýse obecného, mahi mahi, vlkouše obecného, sivena amerického



Obr. 7: Ukázka výsledků amplifikace DNA 18 druhů ryb s využitím primerů Mac: amplifikační křivky (A) a křivky tání (B). DNA makrely obecné a makrely japonské je

vyobrazena v khaki a zelené barvě. Při analýze křivek tání poskytla falešně pozitivní výsledky DNA tuňáka žlutoploutvého a tilapie nilské; v obou případech však byla amplifikace s Ct vyšším než 35 a byla by tak považována za negativní

Možnost použití navržených primerů v duplexním uspořádání bylo experimentálně ověřeno na DNA izolované ze syrové (tepelně neopracované) i tepelně upravené rybí svaloviny. Bylo prokázáno, že systém spolehlivě detekuje DNA makrely obecné v obou případech. Rovněž analýza komerčně zakoupených výrobků (konzervy, pomazánky, uzená makrela), kdy izolát DNA může obsahovat inhibitory PCR, byla úspěšná.



Obř. 8: Ukázka výsledků duplexní PCR s primery MO a Mac při analýze směsi svalovin makrely obecné a makrely japonské. V případě přítomnosti makrely obecné byl detekován pík o teplotě tání 71,3 °C (A – křivky tání) a produkt o velikosti 113 bp (B – analýza produktů na agarózovém gelu)

Dále byla testována citlivost navržených metodik. Detekční limit byl zjišťován prostřednictvím analýzy DNA izolované z jednotlivých živočišných druhů i připravených směsí svalovin; v obou případech byla z izolátu DNA připravena ředící řada (4x). Detekční limit byl při použití primerů MO stanoven na 0,1 ng DNA makrely obecné v reakci a 0,5 hm.% svaloviny makrely obecné v dvoudruhové směsi, pro primery Mac byly limity pro detekci DNA makrely obecné a makrely japonské v reakci stejné. V případě směsi svalovin v poměru 50:50 byl

spolehlivě detekován 1 ng DNA v jedné amplifikační reakci. V duplexní reakci (MO a Mac primery v jedné reakci) byly detekční limity stejné.

2.7.3 Robustnost metody a analýza rizik

Během vývoje a optimalizace metody byla ověřena rovněž robustnost metody. Výsledkem byla identifikace rizik, respektive fází pracovního postupu, které by mohly výrazně ovlivnit výsledek stanovení:

- I) V rámci operací **přípravy vzorku pro analýzu** je nutné:
 - a. provést oplach rybí svaloviny z výrobku vodou, pokud je to možné (odstranění potenciálních inhibitorů) a tuto svalovinu důkladně homogenizovat;
 - b. dbát na úklid pracovních prostor, nástrojů a čistotu oděvu, aby nedošlo ke křížové kontaminaci mezi vzorky, a to po celou dobu přípravy vzorku;
 - c. vzorky důkladně popisovat od příjmu až po navážení nezbytného množství pro izolaci.
- II) Během **izolace DNA**:
 - a. je nezbytné důkladné označení vzorků, aby nedošlo k jejich záměně;
 - b. lze teoretické riziko křížové kontaminace vzorků snížit použitím špiček s filtrem a důslednou dekontaminací pracovních prostor i nástrojů 1% roztokem Sava a/nebo 96% ethanolem.
- III) qPCR analýza:
 - a. Před začátkem analýzy vzorků je nutné izolovanou DNA dobře promíchat a nechat stočit při otáčkách max. 4000 x g.
 - b. Teoretické riziko křížové kontaminace vzorků lze snížit použitím špiček s filtrem a důslednou dekontaminací pracovních prostor i nástrojů 1% roztokem Sava a/nebo 96% ethanolem.
 - c. Je třeba dodržet uvedené reakční podmínky. Při použití jiných reakčních podmínek, například změny teploty nasedání primerů nebo složení reakční

směsi, může dojít k ovlivnění specifity reakce a změny teploty tání detekovaného PCR produktu (například posun T_m makrely obecné na teplotu $76,4 \pm 0,07$ °C při použití reakční směsi 5x HotFire EvaGreen qPCR MasterMix, Solis Biodyne). Použití jiného termocykleru je možné.

- d. Při hodnocení výsledku qPCR je nutno zohlednit stanovený mezní cyklus (Ct) pro každý analyzovaný vzorek. Pokud je $Ct \geq 35$, výsledek je považován za negativní, a to i v případě, že by hodnota teploty tání (T_m) odpovídala DNA makrely obecné.

3. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Kontrola kvality potravin je, s ohledem na způsob jejich zpracování, složitým procesem. Dnes běžně používané techniky založené na analýze proteinů jsou limitovány často nevratným stupněm denaturace u tepelně ošetřených potravin. Slibným přístupem je tak molekulárně-genetická analýza využívající relativně stabilní biomakromolekulu DNA, která je schopná renaturace při snížení teploty po tepelném ošetření provedeném v rámci technologického postupu. Výhodou analýzy DNA je také fakt, že se jedná o molekulu přítomnou ve většině buněk živočišného organismu a analýza je tak nezávislá na typu tkáně ve vzorku. Zároveň je DNA díky své termostabilitě vhodnou molekulou pro analýzu tepelně či mechanicky opracovaných svalovin, a tedy i komerčně prodávaných výrobků jako jsou konzervy či pomazánky.

Pokud je nám známo, byla dosud identifikace DNA makrely obecné prováděna s využitím PCR-RFLP nebo qPCR s využitím TaqMan sondy, a to především s využitím mitochondriálních (mt) genů. Rozvoj metod detekujících úsek jaderného genu umožňuje v porovnání s mtDNA provádět přesnou kvantifikaci zastoupení cílové DNA v reakci, a tak i stanovit množství detekovaného organismu v analyzovaném vzorku.

Předkládaná metodika komplexně zpracovává problematiku identifikace druhů makrel s využitím nového genetického markeru, úseku jaderného genu pro parvalbumin. Obsahuje popis standardizovaných metodických a analytických postupů od přípravy vzorku, jeho zpracování, až po samotné vyhodnocení analýzy. Novost postupu pak spočívá v zavedení

vysoce efektivní metody pro jednoznačnou a rychlou autentikaci DNA makrely obecné a zároveň nepřímý průkaz přítomnosti významného alergenu ryb – parvalbuminu.

Vyvinutá metodika pro analýzu DNA využívá techniku PCR s fluorescenční detekcí v reálném čase prostřednictvím interkalačního barviva SYBR Green. To umožňuje rychlou a citlivou detekci cílové DNA, aniž by bylo potřeba dalších vybavení, jako je například elektroforetická vana, či chemikálie nebo enzymy, jako je tomu například při využití restričního štěpení PCR produktu (metoda PCR-RFLP). Zároveň se jedná o metodu levnější v porovnání s qPCR využívající fluorescenční sondy, robustní a vysoce specifickou. Kromě toho je nepochybně výhodou snadné provedení reakce.

Vývoj duplexní reakce umožňující průkaz přítomnosti DNA makrel a zároveň identifikaci DNA makrely obecné umožňuje autentizaci více živočišných druhů v jedné reakci, a tak i urychluje a zlevňuje analýzu vzorku.

4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Parametry a pracovní charakteristiky uvedené analytické metody, která je založená na principu PCR, jsou vhodné pro získání rychlé informace o přítomnosti DNA makrely obecné ve vzorku.

Metodika byla vyvinuta pro účely projektu MZe č. QK1910231 „**Nové přístupy k průkazu falšování rybího masa pomocí genomové DNA**“. Aplikace metody v rámci tohoto projektu významně přispěje k odlišení makrely obecné od jiných druhů ryb, což bývá obtížné hlavně v případě analýz rybích výrobků v důsledku zpracování svaloviny.

Smluvním uživatelem metodiky je Státní veterinární ústav (SVÚ), který je moderní veterinární laboratoří nabízející kompletní paletu diagnostických a preventivních vyšetření v oblasti zdravých zvířat a vyšetřování potravin, surovin, krmiv, stěrů, kosmetických výrobků, bioodpadů, ovzduší a prostředí včetně stanovení cizorodých a přídatných látek.

Metoda může být využita i pro rutinní analýzy např. v kontrolních laboratořích. Uvedenou metodiku je vzhledem k jednoduchosti a rychlosti postupu také možné aplikovat v dalších státních i soukromých laboratořích a výzkumných centrech.

5. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Předkládaná certifikovaná metodika byla vypracována v rámci projektu QK1910231. Výsledky metodiky umožňují ověřování pravosti makrely obecné, což může sloužit nejen ke kontrole trhu, ale také ochraně životního prostředí a biodiverzity. V souladu s doporučením Rady vlády pro výzkum jsou poznatky, které metodika přináší, poskytovány všem oprávněným osobám zdarma.

Ekonomická efektivnost využití dané metodiky se projevuje zejména při potřebě hodnocení autenticity rybích výrobků se zaměřením na makrelu obecnou. Díky navrženým PCR metodikám je možné provádět rychlý screening velkého počtu vzorků. PCR metoda je relativně rychlá (analýza DNA trvá přibližně 1 h) a v porovnání s jinými metodami běžně používanými pro autentizaci potravin, například chromatografické či imunologické přístupy, je méně finančně nákladná. Pořizovací cena termocykleru pro real-time PCR se pohybuje přibližně od 270 tisíc Kč výše (termocykler bez fluorescenční detekce již od 70 tisíc Kč), zatímco hmotnostní spektrometr stojí obvykle více než milion. Také cena za reakci, zahrnující jednoduchou přípravu vzorků, vychází v případě qPCR mnohem nižší než u chromatografických metod (přibližně 3000 Kč na vzorek). Cena za reakci se liší na základě použitých chemikálií; v případě qPCR analýzy dle předkládané metodiky se jedná přibližně o 1000 Kč za vzorek. Úspora na analýzu 1 vzorku s využitím PCR metody je tak v porovnání s chromatografickými technikami přibližně 2000 Kč; pokud by bylo analyzováno 500 vzorků za rok, mohla by tak být roční úspora nákladů na analýzu souboru vzorků až jeden milion korun českých. V případě aplikace PCR metodiky po dobu 5 let lze odhadovat snížení nákladů na kontrolu rybích výrobků přibližně o 5 mil. Kč.

Náklady na PCR byly sníženy především díky postupu izolace DNA, kdy využívaný protokol vychází významně levněji než v případě využití komerčních kitů. Nevýhodou zvoleného protokolu pak je jeho časová náročnost, která se může promítnout do nákladů potřebných na lidské zdroje. Izolace jednoho vzorku trvá přibližně 5 hodin (včetně času potřebného pro vysušení pelety DNA od ethanolu). Dalším přístupem, jak snížit cenu za analýzu 1 vzorku, je využití duplexního uspořádání PCR, jelikož je v jedné reakci analyzováno více cílových úseků. Zároveň může vést k úspoře času.

Ačkoliv byla ověřena možnost detekce PCR produktů i prostřednictvím horizontální elektroforézy na agarózovém gelu, s ohledem na časovou úsporu se doporučuje analýza

s využitím termocykléru s fluorescenční detekcí amplifikačních produktů. Pořizovací náklady jsou v tomto případě sice vyšší, avšak není vyžadováno další vybavení, jako je elektroforetická vana, zdroj elektrického napětí pro elektroforézu a další.

Kromě uvedených termocyklerů je k samotnému provedení analýzy potřebné běžné vybavení laboratoře, viz kapitola 2.3 a 2.4, další investice proto nejsou zapotřebí.

Implementace použité metody zahrnuje zjištění aktuálních pracovních charakteristik, zejména ověření limitů detekce a opakovatelnosti metody. Za předpokladu, že by bylo provedeno 30 verifikačních a kontrolních analýz, přičemž provozní náklady na jednu analýzu by byly méně než 300 Kč, celkové náklady na implementaci by byly nižší než 10 tis. Kč.

6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

1. Froese, R., Pauly, D. FishBase. Available online: <https://www.fishbase.se/summary/118> (accessed on 7. 8. 2023)
2. Catanese, G., Manchado, M., Infante, C. (2010). Evolutionary relatedness of mackerels of the genus *Scomber* based on complete mitochondrial genomes: Strong support to the recognition of Atlantic *Scomber colias* and Pacific *Scomber japonicus* as distinct species. *Gene*, 452 (1), 35-43.
3. Sun, S., Wang, S., Lin, R., Cheng, S., Yuan, B., Wang, Z., Tan, M. (2020). Effect of Different Cooking Methods on Proton Dynamics and Physicochemical Attributes in Spanish Mackerel Assessed by Low-Field NMR. *Foods*, 9(3), 364.
4. Sotelo, C.G., Pérez-Martín, R.I. (2007). Fish and seafood authentication. ACS Publications.
5. Čížková, H., Ševčík, R., Rajchl, A., Pivoňka, J., Voldřich, M. (2012). Trendy v autenticitě potravin a v přístupech k detekci falšování. *Chemické listy*, 106(10), 903–910.
6. OECD, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2021). *OECD-FAO Agricultural Outlook 2021–2030*.
7. FAO (2020). *The state of world fisheries and aquaculture (SOFIA)*. FAO: Rome, Italy; p. 244.
8. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2022). European Price Report - January 2022.
9. Collette, B.B.; Reeb, C.; Block, B.A. (2001). Systematics of the tunas and mackerels (Scombridae). *Fish Physiology*, 19, 1–33.
10. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2022). The European Fish Price Report. Italy.
11. Prado, M., Boix, A., von Holst, C. (2013). Development of a real-time PCR method for the simultaneous detection of mackerel and horse mackerel. *Food Control*, 34(1), 19–23.
12. Velasco, A., Sánchez, A., Martínez, I., Santaclara, F.J., Pérez-Martín, R.I., Sotelo, C.G. (2013). Development of a Real-Time PCR method for the identification of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). *Food chemistry*, 141(3), 2006–2010.
13. Anklam, E., Gadani, F., Heinze, P., Pijnenburg, H., Van Den Eede, G. (2002). Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *European Food Research and Technology*, 214, 3–26.

7. SEZNAM PUBLIKACÍ PŘEDCHÁZEJÍCÍCH METODICE

Publikace

- Cermakova, E., Lencova, S., Mukherjee, S., Horka, P., Vobruba, S., Demnerova, K., Zdenkova, K. (2023). **Identification of Fish Species and Targeted Genetic Modifications Based on DNA Analysis: State of the Art.** *Foods*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/foods12010228>.
- Mukherjee, S., Horka, P., Zdenkova, K., Cermakova, E. (2023). **Parvalbumin: A Major Fish Allergen and a Forensically Relevant Marker.** *Genes*, 14(1). <https://doi.org/10.3390/genes14010223>.
- Mukherjee, S., Bartoš, O., Zdeňková, K., Hanák, P., Horká, P., Musilova, Z. (2021). **Evolution of the Parvalbumin Genes in Teleost Fishes after the Whole-Genome Duplication.** *Fishes*, 70(6). <https://doi.org/10.3390/fishes6040070>
- Lencová, S., Zdeňková, K., Akhatova, D., & Demnerová, K. (2019). **Aktuální trendy druhové identifikace rybího masa pomocí molekulárně-biologických metod.** *Chemické listy*, 113(5).

Závěrečné práce

- Justová, N. (2023). **Druhová identifikace makrely obecné: porovnání qPCR a LAMP.** Bakalářská práce, VŠCHT Praha, Česká republika.
- Kodešová, K. (2022). **Vliv potravinářských přídatných látek na izolaci DNA z ryb a rybích výrobků.** Bakalářská práce, VŠCHT Praha, Česká republika.
- Vávrová, A. (2020). **Analýza DNA sekvencí parvalbuminového genu papskoploutvých ryb.** Bakalářská práce, VŠCHT Praha, Česká republika.
- Štefancová, E. (2019). **Vývoj metodiky analýzy DNA na odhalování falšování ryb z čelade makrelovitých.** Diplomová práce, VŠCHT Praha, Česká republika.

Přednášky přednesené na sympoziích, konferencích či vědeckých setkáních:

- Čermáková, E., Mukherjee, S., Šnábl, J., Zdeňková, K., Demnerová, K. (2023). **Parvalbumin: alergen i genetický marker pro autentizaci rybích produktů.** 51. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin, Skalský Dvůr, 22. – 24. 5. 2023. Sborník abstraktů: http://www.czechfoodchem.cz/Sbornik_abstraktu_2023.pdf.

- Čermáková, E., Mukherjee, S., Šnábl, J., Zdeňková, K., Demnerová, K. (2023). **Parvalbumin: alergen i genetický marker pro identifikaci ryb**. Konference RANK, Pardubice, 29. – 30. 3. 2023. Sborník abstraktů: ISBN 978-80-87436-20-2 (www.rank.cz/files/sbornik-RANK-2023.pdf).
- Zdeňková, K., Čermáková, E., Jílková, D., Šnábl, J., Mukherjee, S., Demnerová, K. (2022). **Parvalbumin as a genetic marker for fish DNA identification**. 4th International Congress on Food Safety and Quality „One Health“, 9. – 12. 11. 2022. <https://www.foodsq.eu/e-posters/>

Prohlášení předkladatele metodiky

Předkladatel metodiky prohlašuje, že zpracovaná metodika nezasahuje do práv jiných osob z oblasti průmyslového nebo jiného duševního vlastnictví.

Předkladatel souhlasí s uveřejněním práce na webových stránkách certifikačního orgánu i s uveřejněním metodiky na webových stránkách MZe.

Název: Využití polymerázové řetězové reakce pro autentizaci makrely obecné
(*Scomber scombrus*)

Autoři: Ing. Eliška Čermáková (podíl na vzniku metodiky: 45 %)
Ing. Farkas Kerényi, Ph.D. (podíl na vzniku metodiky: 15 %)
Mgr. Subham Mukherjee (podíl na vzniku metodiky: 10 %)
Ing. Kamila Zdeňková, Ph.D. (podíl na vzniku metodiky: 20 %)
prof. Ing. Kateřina Demnerová, CSc. (podíl na vzniku metodiky: 10 %)

Oponenti: Ing. Veronika Kýrová, Ph.D., SZÚ Brno, Palackého 3a, 612 42 Brno

Ing. Martin Kubík, Ph.D., Inspektorát SZPI v Praze, Za Opravnou 300/6, 150 00
Praha 5

ISBN: 978-80-7592-224-3

Zpracováno za podpory MZe ČR, grant NAZV QK1910231: „Nové přístupy k průkazu
falšování rybího masa pomocí genomové DNA“

Eliška Čermáková, Farkas Kerényi, Subham Mukherjee, Kateřina Demnerová,
Kamila Zdeňková, 2023

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Využití polymerázové řetězové reakce pro autentizaci makrely obecné
(*Scomber scombrus*)

Vydala: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6

Oponenti: Ing. Veronika Kýrová, Ph.D. a Ing. Martin Kubík, Ph.D.

Rok vydání: 2023

Počet stran: 31

Elektronická verze publikace ve formátu PDF.