

12. História, súčasnosť a budúcnosť autentifikácie potravín na úrovni DNA. Základné predpoklady pre použiteľnosť genetických dát

Dnešná téma bude venovaná histórii, súčasnosti a budúcnosti autentifikácie potravín na úrovni DNA, prednáška je súčasťou modulu číslo 1 – genetika živočíchov, ktorý je súčasťou projektu ISAGREED. Táto prezentácia bola podporená grantom Erasmus plus KA2 partnerstva pre spoluprácu - inovácia štruktúry a obsahu študijných programov v oblasti manažmentu živočíšnych genetických a potravinových zdrojov z využitím digitalizácie.

Autentifikácia potravín je proces, ktorým sa overuje pravosť, pôvod a kvalita potravinárskych produktov. Je to dôležitý nástroj na boj proti falšovaniu a podvodom v potravinovom reťazci. Autentifikácia potravín pomáha chrániť spotrebiteľov, výrobcov a obchodníkov pred zdravotnými, ekonomickými a environmentálnymi rizikami. Autentifikácia potravín sa môže vykonávať pomocou rôznych metód, ako sú analytické, molekulárne, senzorické alebo digitálne techniky.

Každá bunka v tele obsahuje genetickú informáciu o celom organizme. Táto informácia je uložená v DNA, ktorá sa nachádza v jadre bunky. Na to aby sme dokázali zistiť množstvo informácií o organizme nám teda stačí nahliadnuť do jadra bunky a analyzovať rôzne úseky DNA. Na základe skúmania DNA môžeme zistiť množstvo informácií, ktoré sa dajú využiť v procese autentifikácie potravín.

Sangerovo sekvenovanie je metóda sekvenovania DNA, ktorá bola prvýkrát použitá v roku 1977. Táto metóda je založená na použití modifikovaných dideoxy-nukleotidov a stala sa štandardom molekulárno-biologického výskumu na nasledujúcich 30 rokov. V roku 1996 dala na trh firma Applied Biosystems prvý komerčný automatický sekvenátor. Avšak už ďalší rozvoj automatických sekvenátorov nedokázal viac dosiahnuť stanovený cieľ: sekvenovať celý ľudský genóm pod hranicu 1000 dolárov. Obdobie monopolu klasického Sangerovho sekvenovania sa nazýva aj I. generáciou sekvenovania a trvá približne do roku 2005.

Mikrosatelity sú krátke repetitívne sekvencie DNA, ktoré sa nachádzajú v genóme každého jedinca. Využitie mikrosatelitov v procese identifikácie potravín na úroveň jedinca je založené na PCR analýze a následnej fragmentovej analýze. Pri fragmentačnej analýze sa využívajú rôzne variabilné lokusy ako napríklad AHT4 alebo LEX3 v ktorých je pozorovaná výrazná variabilita v dĺžke opakujúcej sa sekvencie ktorú možno identifikovať samotnou dĺžkou, alebo u štandardizovaných systémov písmenom.

Kapilárová elektroforéza je separačná metóda, ktorá umožňuje rozdelenie mikrosatelitných fragmentov na základe ich veľkosti a náboja. Fragmenty sú vložené do kapiláry naplnenej gélovým médiumom a následne vystavené elektrickému poľu. Fragmenty sa pohybujú v kapiláre na základe ich náboja a veľkosti. Menšie fragmenty sa pohybujú rýchlejšie ako väčšie fragmenty a preto sa fragmenty rozdelia podľa ich veľkosti. V prípade, že sa na identifikáciu fragmentov využíva sekvenátor, fragmenty sú fluorescenčne značené a pri priechode cez optický senzor je identifikovaný nárast fluorescencie, ktorý je priradený konkrétnemu času, ktorý zároveň slúži na identifikáciu veľkosti fragmentu.

Microarray je technológia, ktorá umožňuje súčasné meranie expresie génov pre tisíce génov v jednom experimente. Táto technológia sa používa na štúdium genetických variantov a ich vzťahu k rôznym chorobám. Pre potreby autentifikácie potravín bola alternovaná na

identifikáciu rôznych potravinových zvierat a zjednodušenie postupov analýzy. Zástupcom upravenej technológie „makroarray“ je spoločnosť CHIPRON.

Autentifikácia potravín pomocou čipu MEAT5 spoločnosti CHIPRON má štyri fázy.

Prvá fáza používa izolovanú DNA z potraviny ako templát pre PCR reakciu v ktorej sú primery využívané pre zacielenie značené biotínom. Biotín sa v PCR reakcii používa ako značka pre detekciu produktu amplifikácie. Biotínový primer sa naviaže na jedno vlákno DNA a po amplifikácii sa na produkt naviaže streptavidínový enzým, ktorý je spojený s detekčným systémom. Čip ktorý sa pri analýze používa má na konkrétnych miestach imobilizované úseky DNA komplementárne k jednotlivým živočíšnym druhom. V procese hybridizácie sa spoja biotinizované produkty PCR reakcie s komplementárnymi vláknami DNA imobilizovanými na čipe. Následné postupy farbenia tieto spojenia zafarbí a odhalia tak vo vzorke DNA konkrétnych živočíšnych druhov na ktoré čip cieľi. Pri následnej analýze je možné podľa pozície farebnej zmeny odhaliť prítomnosť viacerých druhov potravinových zvierat naraz.

Genomika zmenila spôsob autentifikácie potravín tým, že umožnila výrobcovi ako aj inštitúciám úradnej kontroly identifikovať zdroj surovín a zistiť, či sú potraviny falšované alebo autentické. Genomika sa používa na identifikáciu rastlinných druhov a odrôd, ako aj na identifikáciu živočíšnych druhov a plemien. Taktiež sa používa na identifikáciu mikroorganizmov v potravinách. Vďaka genomike sa dnes môže výrobca potravín presne určiť, ktoré druhy rastlín alebo zvierat boli použité pri výrobe potravín a či sú tieto potraviny autentické alebo falšované.

NGS (next generation sequencing) a metabarkóding sa používajú v autentifikácii potravín na identifikáciu druhu a pôvodu potravín. NGS umožňuje analýzu veľkého objemu dát v jednom teste a je schopné detekovať zloženie potravín na molekulárnej úrovni. Metabarkóding je metóda identifikácie druhu potravín na základe DNA sekvencií. Miniaturizácia prístrojového vybavenia a vývoj najnovších metód semikonduktorového sekvenovania tieto metódy výrazne zlacnila a zjednodušila, a preto je ich možné využiť aj v rutinnej diagnostike potravín.

Postup metabarcodingu sa zvyčajne skladá z niekoľkých krokov: extrakcia DNA, PCR amplifikácia, sekvenovanie a analýza dát.

- Extrakcia DNA zahŕňa izoláciu DNA z potravín. Väčšinou sa používa metóda extrakcie na báze CTAB alebo komerčného kitu na izoláciu DNA.
- PCR amplifikácia zahŕňa amplifikáciu cieľovej DNA pomocou PCR (polymerázovej reťazovej reakcie). Používajú sa špecifické primerové sady na amplifikáciu cieľovej DNA ktoré cieľia na najvariabilnejšie úseky genómu rastlín a zvierat.
- Sekvenovanie zahŕňa sekvenovanie amplifikovaných produktov pomocou NGS (next generation sequencing). Ide o paralelné sekvenovanie viac ako 100 000 fragmentov v rovnakom čase.
- Analýza dát je zameraná na vytvorenie skupín rovnakých alebo podobných fragmentov DNA, čistenie a normalizáciu dát a následnú identifikáciu fragmentov na základe interných štandardov, alebo externých databáz.