

Jánosi Anna, Koppányné Szabó Erika, Némethné Szerdahelyi Emőke

Fehérje- és DNS-kimutatáson alapuló állatfaj-specifikus vizsgálati eljárások áttekintése

A szerzők elérhetősége

Jánosi Anna | tudományos főmunkatárs
janosi.anna@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0002-7200-4487> | levelező szerző

Koppányné Szabó Erika | tudományos főmunkatárs
koppanyne.szabo.erika@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0001-8321-7157>

Némethné Szerdahelyi Emőke | tudományos főmunkatárs
nemethne.szerdahelyi.emoke@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0003-2419-5802>

A szerzők munkahelye

MATE ÉTTI Élelmiszertudományi Kutatócsoport
Munkahely címe: 1118 Budapest, Villányi út 29-43.



Összefoglalás

A húsok és hústermékek vizsgálatában az élelmiszer-biztonság és a minőségbiztosítás szempontjait figyelembe véve fontos lehet az állatfajok azonosítása, és az idegen fehérjék (növényi és nem-hús eredetű állati fehérjék) kimutatása. Az eredetvizsgálat műszeres megközelítését indokolja, hogy darált húsok, fagyasztott tömbhúsok, különféle hústermékek esetén a fajok érzékszervileg sokszor már nem azonosíthatók. A gazdasági okok mellett a húsok azonosításának egészségi, vallási és állatvédelmi szempontból is nagy a jelentősége. A húsok faj-specifikus eredetének meghatározására az élelmiszeraanalitikai eljárások széles skálája alkalmazható, mely módszerek leggyakrabban a fehérjék vagy a DNS vizsgálatán alapulnak, cikkünkben ezeket tekintjük át.

Kulcsszavak: állatfaj azonosítás, fehérje kimutatás, DNS kimutatás

Bevezetés

Az állati eredetű élelmiszerek kedveltségük és áruk miatt gyakran célpontjai az élelmiszerhamisításoknak. Emellett azonban a tématerületnek egészségvédelmi (pl. vad fajok és haszonállatok eltérő mikrobiológiai állapota), export-import ellenőrzési, vallási fogyasztási tabuk figyelembe vétele, állatvédelmi és vadászati (védett fajok vadászata, illegális behozatala) vonatkozásai is lehetnek. A fogyasztók tájékoztatására, a minőségi termék-előállítás biztosítására szolgál a megfelelő jogszabályi környezetben a kötelező jelölések és nyomonkövethetőségi rendszerek kialakítása. A

dokumentáció mellett azonban szükséges olyan analitikai módszerek rendelkezésre állása és fejlesztése, melyekkel egy egyszerű/összetett vagy friss/feldolgozott termékben is megvalósítható a szelektív, faj és/vagy fajta-specifikus húseredet vizsgálat. A leggyakrabban használt módszerek általában specifikus fehérjék vagy DNS-szakaszok azonosításának elvén működnek. Az SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE), kétdimenziós elektroforézis (2DE), izoelektromos fókuszálás (IEF), kapilláris elektroforézis (CE) és az immunanalitikai technikák (ELISA, immunkromatográfia) általánosan használt fehérje kimutatáson alapuló módszerek. Ezek a technikák azonban nem minden esetben alkalmasak

vörösáruk és konzerv-típusú hústermékek vizsgálatára, mivel a legtöbb oldható fehérje a tartósítási eljárások során aggregálódik vagy degradálódik. A húsfehérjék és az ellenanyagok kovalens kötésű immunkomplexének kimutatásán alapuló immunanalitikai technikák (ELISA) egy része hőkezelt termékek esetében is működik.

Hátrányuk azonban, hogy egyes fajok egymás melletti kimutatása esetében (csirke-pulyka; sertés-vaddisznó; marha-birka-szarvas) a kifejlesztett immunszérumok keresztaktivitást mutathatnak.

A DNS kimutatásra alapozott technikák előnye, hogy a DNS szekvencia az adott élőlényre jellemző, minden sejtjében azonos. A polimeráz láncreakción alapuló DNS sokszorozás (PCR) technikájának kidolgozása (Mullis, 1987), illetve különböző változatainak elterjedése számos területen hozott jelentős újításokat a bűntények felderítésétől egészen az élelmiszer-analitikáig, orvosi diagnosztikáig. Az eljárás alapja egy adott DNS szekvenciasor *in vitro* felszaporítása 1 kópiáról, elméleti szinten akár 1 millió másolatra. A módszer számos változatát dolgozták ki hús-eredet meghatározásra, mint az egyszerű-PCR, multiplex-PCR, PCR-RFLP, real-time PCR. Legújabb fejlesztések közé tartozik az izotermális PCR eljárás, mely állandó hőmérsékleten történő vizsgálatot jelent, eltérően a korábbi ciklikus, hőprofilos PCR és real-time PCR eljárások helyett, így akár terepen is alkalmazható ún. field-tesztek alapozva meg.

Fehérje alapú vizsgálatok

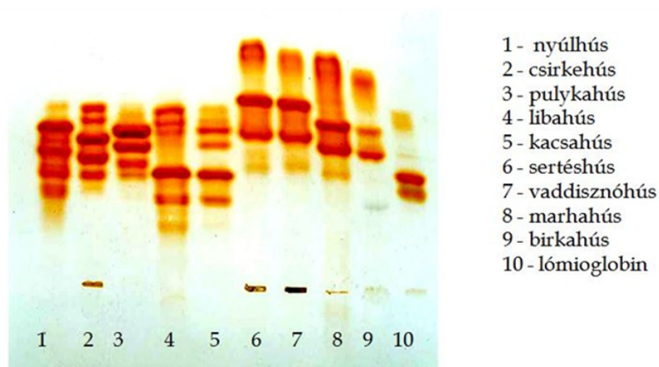
Az élelmiszeranalitika területén az utóbbi évtizedekben igen nagy szerepet kaptak az elektroforetikus és kromatográfiai módszerek a fehérjék izolálásában és tisztításában, valamint az állati és növényi eredetű fehérjék jellemzésében.

A húsfehérjék kutatásában az elektroforetikus vizsgálatok – az állatfajok azonosításán és az idegen fehérjék kimutatásán túl – alkalmazhatóak a fehérjemintázatra ható különféle tényezők, (pl. fajta, tartási mód, érlelés, fagyasztás, hőkezelés stb.) nyomon követésére is. Az izomfehérjékben bekövetkező változások tanulmányozása szempontjából előnyös, hogy az elektroforézist követően az általánosan alkalmazott fehérje festéseken kívül más, nagyobb érzékenységgű és különféle specifitású detektálási módszerek is használhatók. A fehérjék elektroforetikus szeparálása alapul szolgálhat további, pl. immunológiai vagy enzimes vizsgálatok elvégzéséhez is. A hús fehérjéi közül a szarkoplazma fehérjékre jellemző, hogy fajspecifitással rendelkeznek. A miofibrilláris fehérjék kevésbé fajspecifikusak, másrészt a tárolás során részben bomlást szenvednek. Ezért az állatfajok

azonosítására elsősorban a szarkoplazma fehérjék használhatók, míg az egy állatfajon belül, a fehérje szerkezetében az élelmiszeripari technológiák hatására bekövetkező, a termék minőségét befolyásoló változások nyomon követésére a miofibrilláris fehérjék megfelelőbbek.

A nátrium-dodecilszulfát (SDS) poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) módszerrel molekulatömeg szerint szeparáljuk a fehérjéket, így az egyes fajokra jellemző mintázat a fehérjék molekulatömegének eltérésein alapul. Ekici (2008) sertéshús és birkahús fehérjemintázatát hasonlította össze, és megállapította, hogy a módszer alkalmas 5% hozzáadott sertéshús kimutatására keverékekből is. Ezt az eljárást sikeresen alkalmazták halfajok azonosítására is. Tajvani kutatók számos murénafaj fehérjéit hasonlították össze, és a miofibrilláris fehérjék esetén az alacsony molekulatömeg tartományban (< 30.0 kD) olyan mintázatot kaptak, ami lehetővé tette az ételmérgezést okozó fajok elkülönítését (Chen és mtsai, 2010).

Az izoelektromos fókuszálás (IEF) az egyes fehérjék izoelektromos pontjának eltérésén alapul. Az IEF egy igen nagy felbontóképességgel rendelkező analitikai módszer, különösen akkor, ha a vékonyrétegben immobilizált pH-gradienst alkalmaznak. A makromolekulák ilyen körülmények között már 0,001 pH izoelektromos pont különbséggel is elválaszthatók. (Hajós, 1993). A fajok azonosítására a szarkoplazma fehérjék közül a mioglobinnak vizsgálata különösen előnyös, mivel az egyes mioglobinnak sávok izoelektromos pontja jellemző a fajokra. Mivel a mioglobin önmagában is színes, a mintázat nagy mioglobin tartalmú húsok esetén festés nélkül is felismerhető. A mioglobin frakciók azonban a hemfehérjék peroxidáz aktivitása alapján az elektroforetikus elválasztást követően pszeudoperoxidáz festéssel specifikusan és érzékenyen detektálhatók, így a világosabb húsrészekből is kimutathatók (**1. ábra**). Az egyes élelmiszeripari technológiák azonban megnehezíthetik a fajok azonosítását, erősen hőkezelt



- 1 - nyúlhús
- 2 - csirkehús
- 3 - pulykahús
- 4 - libahús
- 5 - kacsahús
- 6 - sertéshús
- 7 - vaddisznóhús
- 8 - marhahús
- 9 - birkahús
- 10 - lómioglobin

1. ábra: Mioglobin atlasz (szerzők saját eredménye)

termékek, pl. konzervek esetén a mioglobinnal mintázott alapján az állatfajok azonosítása már nem lehetséges. Csehi és munkatársai (2016) a nagy hidrosztatikus nyomáskezelés (HHP) hatását tanulmányozva húsminták mioglobinnal mintázataira azt tapasztalták, hogy a sertéshúsból származó mioglobin 300 MPa nyomáson jelentős mértékben denaturálódott, míg a marhahús mioglobinja 500 MPa-ig is natív maradhat.

Szilárd fázisú immunanalitikai módszerek (ELISA)

Az immunkémiai módszerek élelmiszer-analítika területén történő alkalmazásának az első publikációja 1974-es, Ludström és munkatársainak kutatásáról jelent meg, amely a vágósertésekben és vaddisznóban előforduló *Trichinella spiralis* parazita kimutatását taglalja. A nyers húskok faj-szerinti azonosításához elsősorban nagy molekulású vérérumfehérjéket, albuminokat, globulinokat használnak. Itt probléma lehet, hogy a húsból a maradék vértartalom függhet a vágás minőségétől (Griffith és Bellington, 1984), valamint felmerül a keresztreakció kérdése is, amennyiben a termék vérféhrjét, illetve nem hús-eredetű fehérjét, mint tej- vagy tojásfehérjét tartalmaz (Goodwin, 1992). Alkalmazásuk hátránya, hogy nem specifikusak és keresztreakciókat mutathatnak használatuk során. Ilyen keresztreakciókat adhatnak faj-specifikus meghatározás esetében a sertés és vaddisznó; a marha, szarvas és birka, valamint a különböző baromfi fajok mintái. A későbbiekben a módszerfejlesztések során igyekeztek felváltani a sérérumfehérjéket vízoldható húsféhrjékkel. A további érzékenység növelésére „szendvics” elrendezésű módszereket fejlesztettek. Emellett az immunsérérum-specifitás növelésére a keresztaktivitást fehérje kimerítéssel szüntették meg a mérés előtt. Ezt a technikát alkalmazták Martin és munkatársai (1988a, b, c) sertés, ló és csirke húskok kimutatására nyers húskeverékekből. A hibridóma technika terjedésével, antigénként megtartva az oldható izomfehérjéket a monoklonális ellenanyag előállításának irányába tolódott el a kutatás.

Ennek segítségével dolgoztak ki csirke (Martin és mtsai, 1991), sertés (Morales és mtsai, 1994) azonosítására alkalmas mérőrendszereket, melyeket nyers húskok meghatározásához tudtak igen jól felhasználni. Eközben mind nagyobb igény volt arra, hogy az azonosítás hőkezelt, feldolgozott termékekből is megvalósítható legyen. Hőstabil antigének alapuló ELISA rendszerek kidolgozásában Sherikar és munkatársai (1993) indirekt ELISA rendszert dolgoztak ki húszonosítás céljából. Saját fejlesztésű hőstabil

fehérjekomponenst használtak specifikus immunsérérumok előállítására. A poliklonális sérérumban jelenlévő a keresztreakciók kivédésére a keresztreakgáló fehérjékkel kimerítették a sérérumokat, így téve azokat mono-specifikussá. Jelenleg a kereskedelmi forgalomban is vannak olyan ELISA tesztek, melyekkel állatfaj kimutatási vizsgálatok elvégezhetők.

DNS kimutatásra épülő technikák

A polimeráz láncreakción alapuló eljárások, röviden PCR-technikák a sejtek genetikai információját meghatározó DNS kimutatásán alapulnak, melynek lépései: a DNS izolálása, a DNS-szakaszok enzim reakcióval történő megsokszorozása, és a kapott termék/termékek azonosítása. Az 1970-es évek elején Khorana és mtsai. írták le elsőként a DNS oligonukleotidok és DNS polimeráz enzim segítségével történő, „in vitro” megsokszorozását, a DNS felsokszorozásnak (amplifikáció) láncreakcióvá fejlesztését Kary Mullis dolgozta ki, aki munkásságának elismeréseként 1993-ban Nobel-díjat kapott. A PCR-módszer felhasználásával, néhány óra lefutása alatt néhány molekulából milliárdos kópiaszámú fragmens állítható elő, mely már alkalmas a kimutatásra.

A dezoxiribonukleinsav (DNS) kimutatásán alapuló módszerek élelmiszer-analitikai célokra történő alkalmazásának kritikus pontja azonban a technikák egyik alaplépése a minta DNS tartalmának kivonása. Élelmiszerek vagy a húskok érése során ugyanis átlagos DNS láncméret csökkenéssel és mátrixhatással (élelmiszer sokkomponensű összetétele) is számolni kell. A friss húsból izolálható DNS-lánc hossza 20-50 kilobázispár, mely néhány napos érlelés és tárolás során is 15-20 kilobázispárra csökken, és két hét után már a 100-300 bázispár tartomány felé való eltolódás figyelhető meg. Szintén fragmens méret csökkenés tapasztalható a fermentációs úton előállított szalámik és kolbászfélék esetében. A hőkezelés, különösen a 121 °C-on való sterilizálás pedig drasztikus fragmensméret csökkenést okoz, és az átlagos bázispár méret 400 bázispár alá esik vissza (Teletchea, 2005). Emellett az élelmiszerminta bármiféle fizikai vagy kémiai kezelése (pl. pH, hőmérséklet, nyíró erők) a DNS károsodásához, fragmens méretének csökkenéséhez vezet és a különböző helyeken bekövetkező lánctörések miatt, előfordulhat, hogy a kimutatás lehetetlenné válik. Másrészt a technika mennyiségi mérésre alkalmassá tétele sem teljesen megoldott probléma, pl. a mintának megfelelő technológiailag „kezelt” standardok megközelítésében. Állatfajok vizsgálata esetében, pedig pl. az emlősök és madarak eltérő genomhossza okozhat problémát. Szintén kevésbé tanulmányozott terület az is, hogy az élelmiszer-mátrixból történő izolálást követően

a kapott minta (izolálási eljárástól függően) hogyan reprezentálja a termék eredeti összetételét.

Az egyszerű PCR és a PCR-RFLP a DNS alapú állatfaj azonosítás legegyszerűbb változatainak tekinthetők. A specifikus vizsgálatokban egyszerű PCR esetében csak a kapott állatfaj mintájának jelenléte esetében kapunk jelet a mintából, melyet gélelektroforézises elválasztást és festést követően teszünk láthatóvá. Egyszerű és pontos módszer, sikeres alkalmazásáról nagy számú publikáció található meg emlősök és madarak vonatkozásában. Kezdetben genomiális géneket használtak, a későbbiekben, a 2000- res években megjelent anyagokban, a mitokondriális gének alkalmazását írják le, mivel ezek esetenként nagy, sejtenként akár 1000- es kópiaszámban találhatóak a sejtekben, így a kimutatás sikeresebb. Cytokróm b, D loop illetve 12S RNS-t kódoló szekvenciákat használnak a szerzők (Farag és mtsai., 2015)

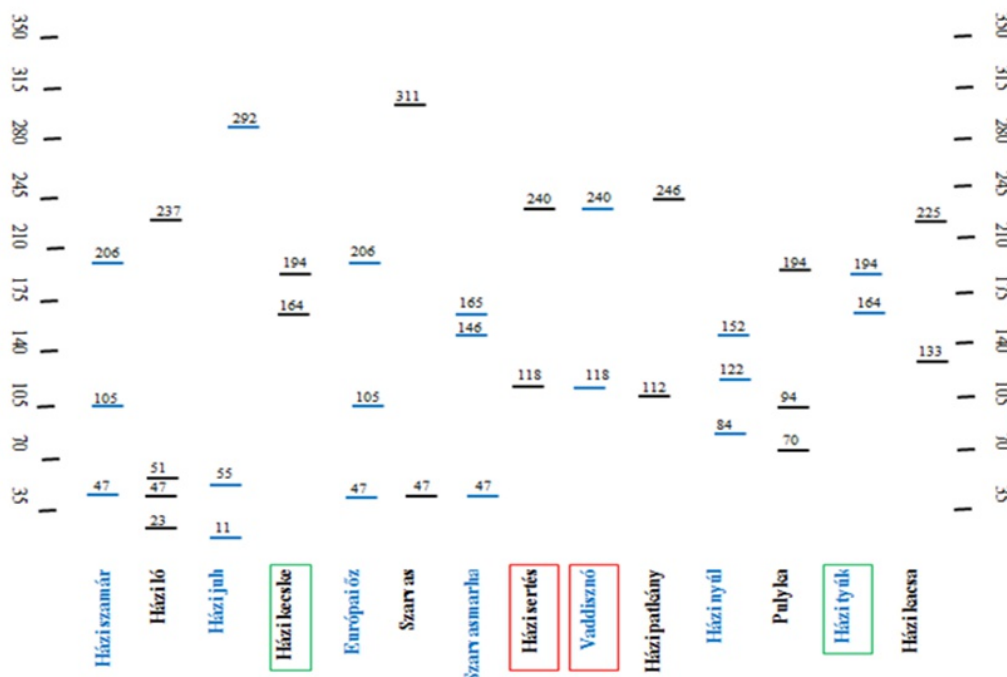
PCR-RFLP változat alkalmazásakor a PCR reakció követően egy restrikciós enzim kezelés következik, így az elválasztó gélen egy sávmintázat jön létre, mely fajtajellemző, hasonlóan a fehérje miogloblin atlaszéhoz (2. ábra). A restrikciós enzimek specifikus, 4-8 nukleotid hosszú szekvenciát ismernek fel a DNS- láncon és azt annak meghatározott pontja mentén hasítják el. Az ezzel az eljárással nyert DNS- fragmensek mérete és száma lesz fajra jellemző. Állatfajok PCR- RFLP alapú azonosítására leggyakrabban mitokondriális eredetű gének, közülük is a citokróm b fehérjét kódoló gén rövidebb- hosszabb szakaszait sokszorozzák fel. A legtöbb ezirányú kutatás alapja Meyer és mtsai. (1995) által publikált citokróm b fehérjét kódoló gén

359 bázispár hosszú szakaszának PCR- RFLP vizsgálata. Kutatásuk során meghatározták a sertés, marha, vaddisznó, bölény, birka, kecske, ló, csirke, pulyka és emberi génszakasz mintegy hat (AluI, RsaI, TaqI, HinfI, HaeIII és MboI) restrikciós enzim hasítás utáni fragmenshossz eloszlását. Munkájuk érdeme volt az is, hogy haszonállatok (sertés, baromfi és birka) húskeverékeit is elemezve, arra a következtetésre jutottak, hogy maximum három fajkeverékből álló minta elemezhető eredményesen a mintázat összetétele miatt.

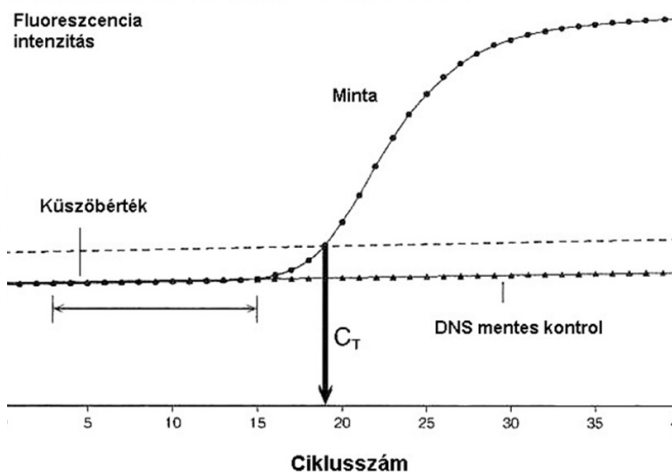
A területen számos publikáció jelent meg, haszonállatok (kérődzők, sertés), vadászható nagyvadak (szarvasfélék) és baromfi fajták elkülönítésének témakörében (Mane, 2016)

A real-time PCR eljárások kidolgozása során létrejött rendszerrel a futási időben nyomonkövethető grafikusan is a sokszorozott DNS (3. ábra). Ezzel a rendszerrel kiváltható a termék futtatás-festés folyamata, a berendezés beruházási és fenntartási költsége viszont jelentősen nagyobb lehet, mint az egyszerű PCR rendszerekben. Ennek ellenére a módszer széles körben elterjedt, különösen a GM növények mérésében, mely megköveteli a kvantitatív eredményeket, illetőleg az orvosi diagnosztikában.

Állatfaj azonosításban is jó eredményeket értek el vele, viszont a mennyiségi analízisben továbbra is sok a nyitott kérdés, így pl. sejtanyag vagy mitokondriális eredetű több kópiás géneket használunk, a DNS mennyisége hogyan konvertál a fehérje illetőleg az izomszövet, zsírszövet mennyiségéhez (Ballin és mtsai., 2009).



2. ábra: Különböző haszon- és vadállatok cytb1-cytb2 primerrel sokszorozott PCR-RFLP mintázata (AluI; HinfI. és MseI restrikciós enzimes emésztést követően) (Meyer és mtsai 1995)



3. ábra: A real-time polimeráz láncreakció során kapott grafikus görbe (Forrás: Applied Biosystem)

Real-time PCR (Q-PCR), kvantitatív analízisben történő használata során leggyakrabban relatív mennyiségeket származtatnak, melyet az ismert standardból kapott vonatkoztatási és keresett gén küszöb ciklus értékének (C_t) különbsége alapján az ismeretlen minta C_t érték különbségéből számítanak. A mérés szempontjából az ún. C_t érték a meghatározó, mely az a küszöb ciklusszám, mely esetében a jel szignifikáns eltérést mutat. Minél nagyobb egy minta C_t értéke, annál kisebb mennyiségű vizsgált összetevőt tartalmaz.

A kvantitatív analízishez azonban a minta összetételének és előállítási technológiájának megfelelő standard referencia anyag, illetve ismert kópiaszámú, fajon belül kevésbé variálódó szekvenciára, mint vonatkoztatási génszakaszokra van szükség. A módszert Sawyer és mtsai. (2003) eredményesen adaptálták marhahús mennyiségi kimutatására birkahús mellett (0,1%-100% nyershús keverékekben). Munkájuk során a viszonyítási alap egy univerzális, emlősökre specifikus primerpárral sokszorozott jel volt, ehhez hasonlították a marhaspecifikus primerekkel kapott jeleket. A módszer a felhasznált modellrendszerben megfelelően működött, de a szerzők a későbbiekben szükségesnek tartották az összetöredezett DNS-tartalmú minták elemzését, valamint szövetekben és állatfajokban mitokondriális génkópiák eltérőségének vizsgálatát.

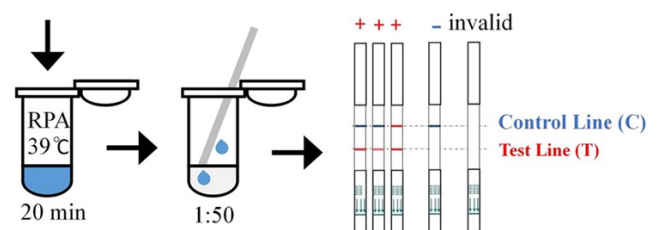
Rodriguez és mtsai. (2005) kvantitatív PCR módszert fejlesztettek ki sertéshús mennyiségi mérésére marhahús mellett, TaqMan próba alkalmazásával, mitokondriális 12S riboszóma RNS-gének alapján. A módszer regressziós paramétereit, linearitását és érzékenységét vizsgálva a 0,5-5%-os tartományban nyers, sterilizált modellek és plazmidba integrált standard sort használtak és hasonlították össze. Mindhárom kalibráció megfelelőnek bizonyult azonban

egymástól eltérő paraméterekkel rendelkeztek, így ez az eredmény is megerősíti azt a tényt, hogy az adott hústermék csak az adott technológiának megfelelően felépített kalibráló sor mellett kvantifikálható.

Izotermális PCR rekombinááz polimeráz enzim felhasználásával (RPA)

Egy újabb típusú, DNS alapú vizsgálati módszer az úgynevezett izotermális PCR, amely egyesíti a PCR szelektivitását és érzékenységét, a mérési eljárás jelentős egyszerűsítésével és minimális műszerhasználattal. Ez utóbbi lehetővé teszi, hogy akár terepen (szántóföld, üzemcsarnok) elvégezhető vizsgálatok legyenek fejleszthetők az alkalmazásával. Vegyszereköltsége jelenleg még jelentős, a primerek és próbák tervezése gyakorlatot igényel. A DNS-rekombinááz enzimet alkalmazva a DNS sokszorozás 37-40 °C-on, állandó hőmérsékleten történik, ez teszi lehetővé, hogy a reakció 30-40 perc alatt végbemenjen a korábbi ciklikus hőmérsékletet igénylő, hosszadalmas nagyműszeres analízis helyett. Az izotermális PCR abban is különbözik a hagyományos PCR módszertől, hogy speciális, legalább 30-35 bp hosszú primerek szükségesek hozzá. A vizsgálatokhoz ezen kívül szükség van egy 50-55 bp hosszúságú próba szekvencia használatára is, amelyet úgy kell megtervezni, hogy a próba 5' végétől 29-30 bp távolságra lévő timin bázist tetrahydrofuranra cserélünk. A sokszorozás során ugyanis a DNS-rekombinááz enzim ezen a helyen tud kötődni az egyszálú DNS-hez és innentől kezdi meg a komplementer szakasz sokszorozását. A DNS-sokszorozást követően az eredmények kiértékelése egyszerű módon tesztcsikkal vagy Sybr green festékkel tehető láthatóvá (**4. ábra**).

A módszert elsőként virológiai, mikrobiológiai, vizsgálatokra használták, de gyorsan elterjedt élelmiszeripari használata is a 2010-es évektől, többek között állatfaj azonosításra. A területen sikerrel alkalmazták nagyvágó állatok (sertés /Mangalica, marha, ló, birka) és baromfi húskimutatására (kacsa, csirke) (Szántó-Egész és mtsai, 2016.; Cao és mtsai, 2018.; Zhu és mtsai, 2018; Kissenkötter és mtsai, 2020).



4. ábra: Tesztcsikk kiértékeléssel végzett RPA vizsgálat menete (Lin és mtsai, 2021)

Irodalomjegyzék

- Ballin, N.Z., Vogensen, F.K., Karlsson, A.H. (2009): Species determination – Can we detect and quantify meat adulteration? *Meat Science*, 83:165–174. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.06.003>
- Cao, Y., Zheng, K., Jiang, J., Wu, J., Shi, F., Song, X., Jiang, Y. (2018): A novel method to detect meat adulteration by recombinase polymerase amplification and SYBR green I. *Food Chem.*, 266:73–78. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.115>
- Chen, T.Y., Chen, N.H., Lin, W.F., Hwang, K.L., Huang, Y.C., Hwang, D.F. (2010): Identification of causative fish for a food poisoning in Taiwan by using SDS-PAGE technique. *Journal of Marine Science and Technology*, 18:593–596. <https://doi.org/10.51400/2709-6998.1924>
- Cseh, B., Szerdahelyi, E., Pásztor-Huszár, K., Salamon, B., Tóth, A., Zeke, I., Jónás, G., Friedrich, L. (2016): Changes of protein profiles in pork and beef meat caused by high hydrostatic pressure treatment. *Acta Alimentaria*, 45:565–571. <https://doi.org/10.1556/066.2016.45.4.14>
- Ekici, K. (2008): The species identification of raw meat with sds-page technique. *Indian Vet. J.*, 85:1193–1195.
- Farag, M.R., Imam, T.S., Dhama, K. (2015): Identification of some domestic animal species (camel, buffalo and sheep) by PCR-RFLP analysis of the mitochondrial cytochrome b gene. *Adv. Anim. Vet. Sci.*, 3(2): 136–142. <https://doi.org/10.14737/journal.aavs/2015/3.2.136.142>
- Goodwin, P. (1992): Immunoassay methods for animal specification. 33–39. p. In Morgan M.A., Smoith C.J., Williams P.A. (eds) *Food safety and quality assurance: application of immunoassay system*. London: Elsevier Sci.Publ.
- Griffiths, N.M., Billington, M.J. (1984): Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay beef blood serum to determine indirectly the apparent beef content of beef joints and model mixtures. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 35:909–914. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740350816>
- Hajós, Gy. (1993): Elektroforézis és alkalmazása az élelmiszerfehérjék elválasztásában. *Élelmiszer-vizsgáló Közlemények*, 39:6–26.
- Khorana, H.G. (1971): Study on polynucleotides: repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *Journal of Molecular Biology*, 56:341. [https://doi.org/10.1016/0022-2718\(71\)90031-6](https://doi.org/10.1016/0022-2718(71)90031-6)
- Kissenkotter, J., Bohlken-Fascher, S., Forrest, M.S., Piepenburg, O., Czerny, C.P., Abd El Wahed, A. (2020): Recombinase polymerase amplification assays for the identification of pork and horsemeat. *Food Chem.*, 322:126759. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126759>
- Lungström, I., Engvall, E., Ruitenbergh, E.J. (1974): ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay – in serological diagnosis of *Trichinella spiralis* infection. In: *Proceedings of third international congress of parasitology, Vol I. II. III. Vienna: Facta Publications, 1204–1205.*
- Mane, B.G., Mendiratta, S.K., Tiwari, A.K. (2009): Polymerase chain reaction assay for identification of chicken in meat and meat products. *Food Chem.*, 116(3):806–810. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.030>
- Martin, R., Azcona, J.I., Casas, C., Hernandez, P.E., Sanz, B. (1988a): Sandwich ELISA for detection of pig meat in raw beef using antisera to muscle soluble proteins. *Journal of Food Protection*, 51:790–794. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-51.10.790>
- Martin, R., Azcona, J.I., Casas, C., Hernandez, P.E., Sanz, B. (1988b): A sandwich ELISA for detection of horse meat in raw meat mixtures using antisera to muscle soluble proteins. *Meat Science*, 22:143–153. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(88\)90088-5](https://doi.org/10.1016/0309-1740(88)90088-5)
- Martin, R., Azcona, J.I., Tirmo, J., Hernandez, P.E., Sanz, B. (1988c): Detection of chicken meat in raw meat mixtures by a sandwich enzyme immunoassay. *Int. Journal of Food Science and Technology*, 23:303–310. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb00584.x>
- Martin, R., Wardale, R.J., Jones, S.J., Hernandez, P.E., Patterson, R.L.S. (1991): Monoclonal antibody sandwich ELISA for the potential detection of chicken meat in mixtures of raw beef and pork. *Meat Science*, 30:23–31. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(91\)90031-k](https://doi.org/10.1016/0309-1740(91)90031-k)
- Meyer, R., Höfelein, C., Lüthy, J., Candrian U. (1995): PCR-RFLP: A simple method for species identification in food. *Journal of AOAC*, 78(6):1542–1551. <https://doi.org/10.1093/jaoac/78.6.1542>
- Morales, P., Garcia, T., Gonzales, I., Martin, R., Sanz, B., Hernandez, P.E. (1994): Monoclonal antibody detection of porcine meat. *Journal of Food Protection*, 54:146–149. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-57.2.146>
- Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987): Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. 335–350 p. In: Wu, R. (ed.): *Methods in Enzymology. Recombinant DNA. Part F*. New York: Elsevier Inc., 628 p. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6)
- Rodríguez, M.A., Garcia, T., Gonzales, I., Hernandez, P.E., Martin, R. (2005): TaqMan real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures. *Meat Science*, 70:113–120. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.12.005>

- Sawyer, J., Wood, C., Shanahan, D., Gout S., Mcdowell D. (2003): Real-time PCR for quantitative meat species testing. *Food Control*, 14:579-583. [https://doi.org/10.1016/s0956-7135\(02\)00148-2](https://doi.org/10.1016/s0956-7135(02)00148-2)
- Sherikar, A.T., Karkare, U.D., Khot, J.B., Jayaras, B.M., Bhilegaonkar, K.N. (1993): Studies on thermostable antigens production of species-specific antiadrenal sera and comparison of immunological techniques in meat speciation. *Meat Science*, 33:121-136. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(93\)90099-4](https://doi.org/10.1016/0309-1740(93)90099-4)
- Szántó-Egész, R., Jánosi A., Mohr, A., Szalai, G., Koppányné Szabó, E., Micsinai, A., Sipos, R., Rátky, J., Anton, I., Zsolnai, A. (2016): Breed-specific detection of mangalica meat in food products. *Food Anal. Methods.*, 9:889-894. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0261-0>
- Teletchea F., Maudet C., Hanni C. (2005): Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends in Biotechnology*. 23(7):359-366. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.05.006>
- Zhu, P., Gao, W., Huang, H., Jiang, J., Chen, X., Fan, J., Yan, X. (2018): Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by real-time recombinase polymerase amplification. *Food Analytical Methods*. 11(8):2076-2084. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1188-z>

Overview of animal species-specific testing procedures based on protein and DNA detection

Jánosi A., Koppányné Szabó E., Némethné Szerdahelyi E.

Abstract

In the investigation of meat and meat products, the identification of animal species and the detection of foreign proteins (plant-derived and non-meat animal proteins) may be important, taking into account food safety and quality assurance considerations.

The instrumental approach to origin testing is justified by the fact that in the case of minced meat, frozen block meat and various meat products, the species can often no longer be identified organoleptically. In addition to economic reasons, the identification of meat is also important from health, religious and animal welfare points of view. A wide range of food analytical methods can be used to determine the species-specific origin of meats. Commonly used methods are based on the analysis of proteins or DNA, which we review in our article.

Keywords: *animal species identification, protein detection, DNA detection*