

Sposób wykrywania i identyfikacji mięsa królika w produktach spożywczych, zestaw do wykrywania i identyfikacji mięsa królika w produktach spożywczych oraz jego zastosowanie

Przedmiotem wynalazku jest sposób wykrywania i identyfikacji mięsa królika w produktach spożywczych, zestaw do wykrywania i identyfikacji mięsa królika w produktach spożywczych oraz zastosowanie peptydów (występujących w zestawie) jako markerów do wykrywania mięsa z królika w produktach spożywczych.

Zafalszowanie żywności poprzez dodanie substancji zmieniających skład lub obniżających wartość odżywczą produktu stanowią poważny problem o charakterze ekonomicznym, etycznym i zdrowotnym. Raporty Inspekcji Handlowej donoszą o niewłaściwej jakości produktów spożywczych, w tym o produktach zafalszowanych. W 2016 roku najwięcej produktów o niewłaściwej jakości, w tym zafalszowanych stwierdzono w przypadku ryb mrożonych glazurowanych (32,3 proc. nie odpowiadało obowiązującym przepisom lub deklaracji producenta), wyrobów cukierniczych (20,1 proc.), drobiu i przetworów drobiowych (20 proc.), mięsa i przetworów mięsnych (16,1 proc.), olejów i tłuszczów jadalnych (13,4 proc.). Przykładowo do stwierdzanych nieprawidłowości w mięsie i przetworach mięsnych należały: obecność niezadeklarowanych surowców mięsnych lub ich brak [Sprawozdanie z działalności Inspekcji Handlowej w 2016 roku. Urząd Ochrony Konkurencji i Konsumentów, Warszawa, 2017]. Liczne dane wskazują na powszechne i w ciągu ostatnich 2-3 dekad wzmagające się występowanie alergii pokarmowych. Na alergię pokarmową cierpi do 10% populacji, przy czym niewspółmiernie większa liczba przypadków obserwowana jest w obszarach rozwiniętych, uprzemysłowionych, częściej też występują u dzieci niż u dorosłych [Scott H. Sicherer, Hugh A. Sampson, Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management, *J Allergy Clin Immunol* 2018, 141:41-5]. W ciągu ostatnich 20 lat zaobserwowano również wyraźny wzrost występowania alergii na czerwone mięso, zwłaszcza u dorosłych, które dawniej uważano za rzadkie [Wilson JM, Platts-Mills TAE, Red meat allergy in children and adults, *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2019, 19:229-235].

Mięso królika ma dużą wartość odżywczą, jest lekkostrawne, smaczne, delikatne i chude. Ze względu na znaczną (21%) zawartość białka o dobrej strawności, zawartości minerałów i witamin z grupy B oraz niski poziom tłuszczu i cholesterolu, jest szczególnie polecany kobietom w ciąży i dzieciom. Mięso królika rzadko alergizuje. Jest pierwszym mięsem wprowadzanym do diety niemowląt. Mięso królika jest również zalecane dla alergików. Mięso królika jest bardzo popularne wśród konsumentów w Europie, a jego spożycie w niektórych krajach sięga prawie 6 kg na mieszkańca. W 2014 r. światowa produkcja mięsa króliczego wyniosła 1,6 mln ton, a 25% mięsa króliczego zostało wyprodukowane w UE, w krajach takich jak Francja, Włochy i Hiszpania, które również mają najwyższy wskaźnik spożycia mięsa z królika. Polska dostarcza 10% światowej produkcji mięsa króliczego [Ewelina Bigoraj, Artur Rzeżutka, Application of ELISA *recomWell* HEV IgG (Human) for Detection of Virus-Specific Antibodies in Sera of Slaughtered Rabbits, *Food Analytical Methods*, 2018, 11:3576–3581]. Ze względu na walory smakowe, odżywcze i zdrowotne mięsa królika jego cena jest wyższa niż np. wieprzowiny czy kurczaka. Najczęstszym rodzajem oszustwa żywnościowego jest zastępowanie oryginalnego składnika podobnym tańszym składnikiem, który jest trudny do rozpoznania przez konsumenta i trudny do wykrycia rutynowymi technikami analitycznymi [Ouissam Abbas, Manuela Zadravc, Vincent Baeten, Tomislav Mikuš, Tina Lešić, Ana Vulić, Jelena Prpić, Lorena Jemeršić, Jelka Pleadin, Analytical methods used for the authentication of food of animal origin, *Food Chem* 2018, 246:6–17]. Konieczne jest rozwijanie szybkich i dokładnych technik analitycznych do wykrywania zanieczyszczeń żywności, zwalczania oszustw i potwierdzania autentyczności żywności, w tym rozwijanie narzędzi analitycznych do identyfikacji gatunku, aby wykrywać i zapobiegać celowemu, jak też niezamierzonemu zastępowaniu i dodawaniu składników, a także by egzekwować przepisy dotyczące oznakowania, zapewnić bezpieczeństwo i wiarygodność żywności oraz zdrowie konsumentów.

Do wykrywania mięsa często wykorzystuje się metodę PCR, czyli reakcję łańcuchową polimerazy.

Z wynalazku CN110106259A znane jest monitorowanie bezpieczeństwa żywności, w szczególności kombinacji markera SNP i metody identyfikacji świni i surowego produktu mięsnego z wykorzystaniem metody PCR.

Z opisu wynalazku EP06300943A znany jest wynalazek dotyczący metody identyfikacji z wykorzystaniem techniki RT-PCR w czasie rzeczywistym, hybrydyzacji znakowania cDNA z sondą oligonukleotydową i wykrywania kompleksów antygen-przeciwciało z zastosowaniem markera genomowego zawierającego sekwencję nukleotydową.

Znany jest z wynalazku CN104531891 zestaw do wykrywania składników pochodzących od królika w żywności oraz zastosowanie zestawu, gdzie zastosowano fluorescencyjną ilościową metodę PCR do wykrywania królika. Opisany w wynalazku zestaw składa się z praimerów PCR oraz sondy fluorescencyjnej. Zestaw zapewnia wykrywanie na poziomie 100 fg.

Z innego opisu CN105349653 znane są startery specyficzne dla królików, zestaw starterów i ich zastosowanie w identyfikacji składników z królika. Zestaw obejmuje startery specyficzne dla królików, odczynnik reakcyjny, kontrolę pozytywną i ślepą próbę kontrolną. Startery specyficzne dla królików można stosować do amplifikacji próbki DNA, analizy produktów amplifikacji PCR i ustalenia, czy próbka zawiera składniki pochodzące z królika.

Z wynalazku CN104017871A znane są testy papierkowe chromatograficzne do wykrywania składowych królika w żywności i paszy oraz ich zastosowanie. Wynalazek ujawnia sposób przygotowania i sposób stosowania zestawu do szybkiego wykrywania kwasu nukleinowego do wykrywania składników pochodzących z królika (*Leporidae*) w żywności i paszach, wynalazek należy do dziedziny biologii molekularnej i immunologii. Metoda PCR o wysokiej specyficzności i czułości do detekcji kwasu nukleinowego jest połączona z immunologiczną detekcją.

Także z publikacji znane jest wykorzystywanie PCR i ELISA do wykrywania i identyfikacji mięsa królika w produktach spożywczych [S. M. Abdel-Rahman, Ahmed Elmaghraby, Amany Haggag, Identification and differentiation among chicken's, duck's, quail's, rabbit's and Turkey's meat using PCR-RFLP technique, Biology 2015, DOI:10.2298/BAH1501101A].

Metody PCR opierają się na analizie DNA, pochodzącego ze składników produktu spożywczego, które mogą występować w bardzo niskich ilościach. Procesy obróbki mięsa podczas wytwarzania produktów prowadzą do degradacji DNA, przy małej ilości danego składnika w próbce, można stwierdzić brak DNA, a tym samym uzyskuje się fałszywie negatywny wynik. PCR jest również bardzo podatny na zanieczyszczenia krzyżowe prowadzące do fałszywie pozytywnych wyników. Oznaczenia oparte na reakcji PCR wymagają amplifikacji fragmentów DNA. W przypadku produktów przetworzonych istnieje ryzyko, że fragment, który ma być amplifikowany uległ degradacji, w efekcie otrzymuje się wynik fałszywie negatywny. Ponadto, metoda PCR wymaga zachowania warunków wykluczających zanieczyszczenie próbki w czasie jej przygotowywania. Potrzebne jest dostosowanie pomieszczeń dedykowanych pod poszczególne etapy przygotowania próbki – oddzielne pomieszczenie do izolacji DNA kolejne do amplifikacji. Najczęściej wykorzystywane obecnie metody identyfikacji gatunków oparte na analizie DNA są metodami jakościowymi, bardzo wrażliwymi na zanieczyszczenia krzyżowe dające wyniki fałszywie pozytywne. W przypadku metody ELISA dyskutuje się fakt, że białka ulegają degradacji podczas obróbki termicznej stosowanej w trakcie różnych procesów technologicznych podczas przygotowania produktów mięsnych (parzenie, gotowanie, wędzenie, suszenie, pieczenie, sterylizacja itp.). Efektem jest zaburzenie lub zniszczenie przestrzennej struktury białka, co wpływa na dostępność epitopów rozpoznawanych przez przeciwciała i/lub prowadzi do degradacji tychże epitopów, a w konsekwencji prowadzi do tego, że białko nie zostanie wykryte w teście i uzyskany zostanie fałszywie negatywny wynik. Z drugiej strony testy ELISA często prowadzą do fałszywie pozytywnych wyników, w skutek wystąpienia reakcji krzyżowych, ryzyko których, w

przypadku produktów mięsnych zawierających oprócz wielu składników pochodzenia zwierzęcego często również składniki pochodzenia roślinnego, jest wysokie.

Nieoczekiwanie okazało się, że peptydy o sekwencji od 1 do 48 określone w załączniku mogą być stosowane do identyfikacji gatunkowej mięsa królika w próbce w szczególności w mieszankach wielogatunkowych produktów spożywczych.

Wynalazek dotyczy zestawu do określania obecności mięsa królika (*Oryctolagus cuniculus*) w produktach spożywczych zawierającego co najmniej jeden peptyd o sekwencji wybranej z grupy sekwencji: Sekwencja nr: 1, Sekwencja nr: 2, Sekwencja nr: 3, Sekwencja nr: 4, Sekwencja nr: 5, Sekwencja nr: 6, Sekwencja nr: 7, Sekwencja nr: 8, Sekwencja nr: 9, Sekwencja nr: 10, Sekwencja nr: 11, Sekwencja nr: 12, Sekwencja nr: 13, Sekwencja nr: 14, Sekwencja nr: 15, Sekwencja nr: 16, Sekwencja nr: 17, Sekwencja nr: 18, Sekwencja nr: 19, Sekwencja nr: 20, Sekwencja nr: 21, Sekwencja nr: 22, Sekwencja nr: 23, Sekwencja nr: 24, Sekwencja nr: 25, Sekwencja nr: 26, Sekwencja nr: 27, Sekwencja nr: 28, Sekwencja nr: 29, Sekwencja nr: 30, Sekwencja nr: 31, Sekwencja nr: 32, Sekwencja nr: 33, Sekwencja nr: 34, Sekwencja nr: 35, Sekwencja nr: 36, Sekwencja nr: 37, Sekwencja nr: 38, Sekwencja nr: 39, Sekwencja nr: 40, Sekwencja nr: 41, Sekwencja nr: 42, Sekwencja nr: 43, Sekwencja nr: 44, Sekwencja nr: 45, Sekwencja nr: 46, Sekwencja nr: 47 i Sekwencja nr: 48, określonych w tabeli w załączniku.

Korzystnie, gdy zestaw zawiera co najmniej dwa lub więcej peptydów wybranych z grupy sekwencji od 1 do 48.

Korzystnie, gdy zestaw zawiera peptydy o sekwencji nr od 1 do 48.

Wynalazek dotyczy także zastosowania co najmniej jednego peptydu o sekwencji wybranej z grupy sekwencji nr od 1-48 (wyżej wskazanych), określonych w tabeli w załączniku, do wykrywania i identyfikacji mięsa królika (*Oryctolagus cuniculus*) w produktach spożywczych.

Zastosowanie korzystnie obejmuje co najmniej dwa lub więcej peptydów o sekwencji wybranej z grupy sekwencji nr od 1 do 48.

Zastosowanie korzystnie obejmuje peptydy o sekwencji nr od 1 do 48.

Korzystnie, gdy peptydy stosuje się do określania obecności mięsa z królika w jedno i wieloskładnikowych produktach spożywczych, zarówno zawierających mięso surowe jak i poddane obróbce technologicznej w czasie wytwarzania produktu spożywczego takich jak m.in. homogenizacja, sterylizacja, gotowanie, pieczenie, suszenie, wędzenie, grillowanie.

Wynalazek dotyczy także sposobu wykrywania i identyfikacji obecności mięsa królika w produktach spożywczych, który obejmuje:

- izolację peptydów z ekstraktu z mięsa lub ekstraktu z produktów spożywczych poprzez poddanie ekstraktu z mięsa lub ekstraktu z produktów spożywczych obróbce proteolitycznej polegającej na trawieniu białek przez enzymy proteolityczne;
- analizę uzyskanych peptydów z ekstraktu z mięsa lub ekstraktu z produktów spożywczych przy wykorzystaniu znanej metody wykrywania peptydów, korzystnie kombinacji chromatografii cieczowej i spektrometrii mas pod kątem występowania co najmniej jednego peptydu o sekwencji wybranej z grupy sekwencji nr od 1-48 wymienionych w tabeli w załączniku, we wspomnianym ekstrakcie, poddanym obróbce proteolitycznej poprzez porównanie czasów retencji, masy peptydu oraz fragmentacyjnego widma mas peptydu obecnego w ekstrakcie z czasem retencji, masą peptydu i fragmentacyjnym widmem mas peptydu o sekwencji z grupy sekwencji od 1-48;

- wykrycie, że mięso z królika jest obecne w wspomnianym ekstrakcie, jeśli co najmniej jeden peptyd o sekwencji z grupy sekwencji o numerze 1-48 wymienionych wyżej został zidentyfikowany w ekstrakcie.

Korzystnie, gdy peptydy stosuje się do określania obecności mięsa z królika w jedno i wieloskładnikowych produktach spożywczych, zarówno zawierających mięso surowe jak i poddane obróbce technologicznej w czasie wytwarzania produktu spożywczego takich jak m.in. homogenizacja, sterylizacja, gotowanie, pieczenie, suszenie, wędzenie, grillowanie.

Korzystnie, gdy mieszanek ekstraktów można uzyskać w procesie ekstrakcji produktu spożywczego roztworem wodorowęglanu amonu, zwłaszcza w stężeniu 100 mmol/l.

Korzystnie, gdy proces obróbki proteolitycznej obejmuje co najmniej jedną proteazę, korzystnie: trypsynę i/lub chymotrypsynę i/lub elastazę i/lub endoproteinazę Glu-C, endoproteinazę Asp-N i/lub endoproteinazę Lys-C i/lub endoproteinazę Pro-C.

Stosowane określenie dla celów niniejszego wynalazku „peptyd” oznacza cząsteczkę zawierającą liniowy układ reszt D- lub L- aminokwasowych połączonych ze sobą w sztyku liniowym wiązaniem peptydowym. Stosowany tu termin „aminokwas” obejmuje w szczególności 20 naturalnie występujących aminokwasów (tj. alanina, arginina, asparagina, cysteina, fenyloalanina, glicyna, glutamina, histydyna, izoleucyna, kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, leucyna, lizyna, metionina, prolina, seryna, treonina, tryptofan, tyrozyna i walina), ale także aminokwasy niosące modyfikacje postranslacyjne, które można znaleźć *in vivo*, takie jak hydroksyprolina, fosfoseryna i fosfotreonina; i inne nietypowe aminokwasy, w tym między innymi kwas 2-aminoadypinowy, hydroksylizyna, izodesmozyrna, norwalina, norleucyna i ornityna.

Sekwencje nr: 1-48 są fragmentami białek *Oryctolagus cuniculus* (Tabela 1).

Stosowane tu określenie „mieszanka” odnosi się do dowolnej mieszanki, która może zawierać ekstrakt z tkanek królika.

Pojęcie „ekstrakt” w niniejszym opisie oznacza ekstrakt z tkanek mięśniowych królika. Korzystne jest, aby ekstrakt zawierał białka wyizolowane z mięsa królika, takie jak: Miozyna-4, łańcuch ciężki miozyny mięśnie szkieletowe, Białko C wiążące miozynę typu szybkiego (szybkokurczliwy), Miomezyna-2, Nebulina, Obskuryna, Titina, α -aktylina, Albumina surowicza, łańcuch A, Kinaza pirogronianowa izoforma 2, Beta-enolaza, Hemoglobina podjednostka beta, Hemoglobina podjednostka beta izoforma 1x, ATP-zależna fosfofruktokinaza typ mięśniowy, Dehydrogenaza L-mleczanowa łańcuch A izoforma X1, Izomeraza glukozy-6-fosforanu łańcuch A, Aldolaza A difosforanu fruktozy izoforma X1, Białko zawierające domenę LIM, Lizosomalna alfa-mannozydaza, Fosfoglukomutaza-1, S-transferaza glutationowa Mu 1, Enzym rozgałęziający glikogen. Ekstrakt taki można uzyskać w procesie ekstrakcji tkanek mięśniowych królika roztworem wodorowęglanu amonu, w szczególności w stężeniu 100 mmol/l.

Zestaw w niniejszym wynalazku należy rozumieć jako mieszanek analityczną (wzorcową) przeznaczoną do stosowania w celu wykrywania, identyfikowania, potwierdzania obecności i ilościowego oznaczania mięsa królika. Mieszanka analityczna przeznaczona jest do ustalania składu gatunkowego produktów mięsnych. Mieszanek analityczną można sporządzić w dowolnej formulacji, takiej jak: proszek, roztwór, lub lizolat oraz do dowolnego sposobu stosowania, takiego jak: wzorzec zewnętrzny, wzorzec wewnętrzny, izotopowo znakowany wzorzec, analog, dodatek wzorca, próba kontrolna. Jednakże preferowaną drogą stosowania mieszanki analitycznej jest izotopowo znakowany wzorzec.

Peptyd w wynalazku może być wykryty za pomocą każdej metody znanej w sztuce. Preferowana jest kombinacja chromatografii cieczowej i spektrometrii mas.

„Chromatografia cieczowa” odnosi się do techniki rozdzielania mieszaniny. Zwykle obejmuje ona przepuszczenie mieszaniny rozpuszczonej w ciekłej fazie ruchomej przez fazę stacjonarną, która oddziela analit do pomiaru od innych cząsteczek w mieszaninach i pozwala na jego izolację. Podczas HPLC (wysokosprawnej chromatografii cieczowej) pod wysokim ciśnieniem wymusza się przejście próbki przez kolumnę wypełnioną cząstkami o nieregularnym lub sferycznym kształcie lub porowatą warstwę monolityczną (faza stacjonarna) za pomocą cieczy (faza ruchoma).

Techniki spektrometrii mas w zakresie wynalazku obejmują w szczególności MALDI-TOF (desorpcja/ionizacja laserem wspomagana matrycą - pomiar czasu przelotu jonów) lub LC-ESI-MS/MS (chromatografia cieczowa - jonizacja przez elektrorozpylanie- spektrometria mas/spektrometria mas).

Stosowane w sposobie działania proteolityczne ekstraktu oznacza ukierunkowaną degradację (trawienia) peptydów.

Dzięki zestawowi peptydów według wynalazku możliwe jest wykrywanie i identyfikacja mięsa królika w produktach spożywczych, z dużą czułością i ekscyplonalną selektywnością, przy wykorzystaniu do detekcji gatunku spektrometrii mas i specyficznych dla gatunku peptydów o zdefiniowanej sekwencji według wynalazku. Przedłożony zestaw peptydów jest efektywnym narzędziem analitycznym do wykrywania zafalszowań żywności i uwierzytelniania żywności z grup żywności najbardziej narażonej na zafalszowania. Efektywnie przyczyni się do ochrony interesów producentów, dostawców oraz konsumentów, ekonomicznych i zdrowotnych oraz skutecznej kontroli produktów przez organizacje odpowiedzialne za kontrolę produktów trafiających na rynek a także do skutecznego egzekwowania przepisów prawa dotyczącego jakości i znakowania produktów żywnościowych.

Przykłady

Przykład sposobu określania obecności mięsa królika w próbkach produktów spożywczych.

Ekstrakty z tkanki mięśniowej królika

Tkankę mięśni szkieletowych królika (0.3g) ekstrahowano przez 2 min za pomocą roztworu wodorowęglanu amonu w stężeniu 100 mmol/l przy użyciu homogenizatora kulkowego stosując kulkę metalową o średnicy 5 mm. Ekstrakt został następnie zatężony i liofilizowany.

W drugim etapie, w celu potwierdzenia swoistości markerów zidentyfikowanych dla królika, przygotowano również ekstrakty z tkanki mięśni szkieletowych świni, krowy, kurczaka, owcy, indyka, perliczki, kaczki, i gęsi, analogicznie jak powyżej.

Analiza techniką spektrometrii mas

W celu potwierdzenia identyfikacji peptydów specyficznych dla królika, ekstrakty z tkanki mięśniowej z królika, zbadano techniką spektrometrii mas (MS) pod kątem detekcji peptydów uzyskanych w trawieniu trypsyną.

Próbka ekstraktu z tkanki mięśni szkieletowych królika (około 5 mg) została rozpuszczana w roztworze wodorowęglanu amonu (100 mmol/l) i poddana redukcji mostków disiarczkowych z 5µl ditiotreitolu (DDT, odczynnik Clelanda). Po inkubacji termicznej powstałe reszty cysteinowe były alkilowane jodoacetamidem, a następnie poddane całonocnemu trawieniu trypsyną. Produkty trawienia tryptycznego uzyskane z mięśni szkieletowych królika były następnie analizowane za pomocą LC-ESI-MS/MS (chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas z zastosowaniem jonizacji poprzez elektrorozpylanie) celem charakterystyki składu (rys. 1).

Szczegółowy protokół obejmował homogenizację próbki – tkanki mięśni szkieletowych królika (0.3g) w 1 ml roztworu wodorowęglanu amonu (100 mmol/l) przy użyciu homogenizatora kulkowego Mini-Mill PULVERISETTE 23 (FRITSCH GmbH, Niemcy) z zastosowaniem kulki o średnicy 5 mm i częstotliwości homogenizacji 3.000 oscylacji/min. Homogenizację prowadzono w czasie 2 min. Uzyskany homogenat suszono w temperaturze 37°C w próżni przy użyciu koncentratora miVac Duo (Genevac Ltd., Suffolk, UK). Wysuszoną próbkę (około 5 mg) rozpuszczano w 100 µl wodorowęglanu amonu o stężeniu 100 mmol/l i poddawano redukcji mostków disiarczkowych z 5µl ditiotreitolu (DDT, odczynnik Clelanda). Próbkę inkubowano w temperaturze 56 °C przez 1 h z zastosowaniem termobloku. Po inkubacji termicznej powstałe reszty cysteinowe alkilowano z zastosowaniem 20 µl jodoacetamidu i inkubowano przez 30 min w ciemności w temperaturze pokojowej. Pozostały jodoacetamid neutralizowano przez dodanie 20 µl ditiotreitolu (DDT, odczynnik Clelanda) i inkubację w temperaturze pokojowej przez 30 min. Trawienie białka prowadzono przy użyciu roztworu wodorowęglanu amonu

zawierającego 0,083 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ trypsyny. Próbkę inkubowano w temperaturze 37°C przez 18 godzin. Po zakończonej inkubacji produkty trawienia tryptycznego oczyszczano przy użyciu gotowych zestawów Sep-Pak C18 Plus (masa sorbentu 360 mg/0.7 mL) firmy Waters (Milford, MA, USA) zgodnie z instrukcją producenta. Oczyszczone produkty trawienia tryptycznego suszono w temperaturze 37°C w próżni przy użyciu koncentratora miVac Duo (Genevac Ltd., Suffolk, UK) a następnie rozpuszczano w 1 ml 5% roztworu acetonitrylu zawierającego 0,1% kwasu mrówkowy i poddawano analizie LC-MS/MS.

W czasie analizy LC-ESI-MS/MS 10 μL roztworu peptydów tryptycznych wstrzykuje się na kolumnę do chromatografii cieczowej, takiej jak chromatografia oddziaływań hydrofobowych, RP-HPLC (wysokosprawna chromatografia cieczowa z układem faz odwróconych), chromatografia jonowymienna, chromatografia wykluczania i chromatografia powinowactwa wykorzystując Agilent 1290 HPLC. Spektrometr mas Q-TOF (Agilent) jest podłączony do HPLC w celu dokładnego pomiaru masy. Urządzenie zbiera i rejestruje dane w trybie jonów dodatnich. Kalibracja przyrządu przeprowadzana jest przy użyciu mieszaniny związków o zdefiniowanych masach (Agilent LC/MS tuning mix).

W przypadku identyfikacji specyficznych dla gatunku królik peptydów stanowiących przedmiot wynalazku analizy prowadzono przy pomocy chromatografu cieczowego Agilent Technologies 1290 Infinity sprzężonego z spektrometrem mas wysokich rozdzielczości Agilent Technologies 6550 iFunnel QTOF LC-MS wyposażonego w źródło jonów ESI Agilent Technologies Jet Stream. Rozdział chromatograficzny prowadzono na kolumnie Agilent RRHD Eclipse Plus column (2.1x 150 mm 1.8 μm). Jako fazę ruchomą stosowano 0.1% kwas mrówkowy w wodzie (A) i w acetonitrylu (B). Zastosowano elucję gradientową: 0–2 min, 3% B; 2–40 min, 35% B; 40–45 min, 40% B; 45–50 min, 90% B; 50–55 min, 90% B, kondycjonowanie kolumny 3%B przez 5 min, szybkość przepływu fazy ruchomej 0.3 ml/min. Objętość nastrzyku wynosiła 10 μl , temperatura kolumny 40 °C. Zbierano jony dodatnie w trybie skan MS oraz MS/MS w zakresie mas m/z od 100 do 3000. Parametry pracy MS: temperatura gazu rozpylającego 250°C, przepływ gazu rozpylającego 14 L/min, ciśnienie nebulizatora 35 psi, temperatura gazu osłonowego 250°C, przepływ gazu osłonowego 11 L/min, napięcie kapilary 3500 V. Monitorowano dwa jony referencyjne: m/z 121.0509 oraz m/z 922.0098.

Opis rysunków

Fig. 1 przedstawia chromatogramy LC-ESI-Q/TOF EIC czterdziestu ośmiu peptydów markerowych królika uzyskanych po trawieniu trypsyną białek w ekstrakcie z mięsa królika.

Fig. 2 obrazuje przykładowe spectra LC-ESI-QTOF-MS/MS (fragmentacyjne widma mas) specyficznych peptydów markerowych królika: (a) SSVFVADPK (475.2533²⁺) i (b) AFFGHYLYEVAR (491.5828³⁺) uzyskanych po trawieniu trypsyną odpowiednio miozyny 4 i albuminy w ekstrakcie z mięsa królika.

Rysunek 3. Chromatogramy LC-ESI-Q/TOF peptydów markerowych królika wykrytych w dwóch przykładowych pasztetach zawierających mięso królika; (a) pasztet zawierający 85% mięsa królika, (b). pasztet zawierający i 25 % mięsa królika.

Identyfikacja specyficznych dla gatunku królik peptydów:

Analizowano trzy niezależne partie ekstraktów z mięsa królika przetworzonego termicznie, aby potwierdzić specyficzność tych peptydów (rysunek 1).

Stosując opisany sposób działania, z powodzeniem zidentyfikowano specyficzne peptydy królika (ze ściśle zdefiniowaną odrębną masą cząsteczkową i sekwencją aminokwasów) dla gatunku królik (tabela 1).

Specyficzność markerów oceniano przy pomocy Protein BLAST Alignment Search Tool i blastp algorithm, USA National Library of Medicine, baza: non-redundant protein sequences, link: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

Tabela 1. Zestawienie specyficznych markerów peptydowych dla gatunku królik.

Białko	Masa (Da)	Intensywność	Czas retencji (min)	Specyficzna sekwencja aminokwasowa peptydu	Sekwencja nr:	
Miozyna-4	950.06	7400437.5	11.05	SSVFFADPK	1	
	1812.98	7872120.0	26.63	TLAFLFTGTAAAEAGGGK	2	
Łańcuch ciężki miozyny mięsnie szkieletowe	1885.00	20892509.0	24.2	TLAFLFSGAQTGEEGGGGK	3	
Białko C włączące miozynę typu szybkiego (szybkokurczliwy)	1210.26	2078025.0	14.03	GDEVFTVTEGR	4	
Miomezyna-2	1222.45	1536361.5	24.82	ASGIEMVMDR	5	
	1556.77	1564652.5	26.52	NYVVLWPEPPVR	6	
	1843.05	3489816.0	28.35	FLSELAQLEESVHLAR	7	
Nebulina	1426.67	920646.5	27.6	GIGWVPIGSLEVAK	8	
Obskuryna	1312.47	609022.0	11.43	QEGAVCELHIR	9	
Titina	1309.55	1186663.0	13.92	IHFVLVHNCR	10	
	1657.83	974561.5	14.15	TEIVSTDNHTVLTVK	11	
	2025.21	1463936.0	17.4	VCAVAVTGLSSGHEYQFR	12	
	2040.33	1374862.5	18.72	LQAHEPFLHEGMELEMK	13	
	1536.74	1390655.5	21.78	HILELANLTIQDR	14	
	1473.81	2046681.5	25.5	VLPIDLSMMPOK	15	
	2665.97	594883.0	29.02	VTVGDAASLQCQLAGTPEIAVSWYK	16	
	945.09	846625.5	7.08	VVENVGTK	17	
	2534.72	671388.0	21.22	NFNASIHILNVDSDDIGEYHCK	18	
	2096.39	1146460.0	29.78	SVILESTYGTLPISVTWK	19	
	2999.33	946042.0	30.87	IMSENFILSIHILNVDSADIGEYQCK	20	
	α-aktynina	4339.68	9864069.5	97.3	AAPFNWLDGAIEDLQDVVWLVHVSVEETQSLTAHQDFK	21
	Albumina surowicza, łańcuch A	1126.23	1241078.5	6.88	CCSESLVDR	22
1433.49		1541738.5	7.77	DTYGDVADCCCK	23	
1473.64		10496219.5	21.55	AFFGHVLYEVAR	24	
2529.69		3532326.5	25.02	EFNAETFTFHADICTLPETER	25	
1677.93		5856031.5	32.2	LPCVEDYLSVVLNR	26	
2699.02		6982244.0	43.3	FNDVGEHFHIGLVLITFSQYLQK	27	
Kinaza pirogronianowa izoforma 2	3276.60	15078314.0	25.23	SHSEAGSAFIQTQQLHAAMADTFLEHMCR	28	
Beta-enolaza	3049.36	13064375.0	26.15	HIADLAGNHDLVLPVPAFNVINGGSHAGNK	29	
Hemoglobina podjednostka beta	1714.93	3148554.5	24.47	VLAASFEGLSHLDNLK	30	
	1747.10	1431388.0	31.57	LLGNVLVIVLSHHFGK	31	
Hemoglobina podjednostka beta izoforma 1x	2072.26	1609692.5	22.65	FFESFGDLSSAHAVMSNPK	32	
	1741.95	2556885.0	23.35	VLAASFEGLSHLDNLK	33	
ATP-zależna fosfofruktokinaza typ mięśniowy	1885.05	5108072.0	18.93	ITEIVDAITTAQSHQR	34	
	2273.47	6247098.5	24.15	ALVFQPVTELQNTDFEHR	35	
	4192.60	1517662.0	34.83	HCGYLALVTSLSGADWVFPECPDDNVEDHLCR	36	
Dehydrogenaza l-mleczanowa łańcuch A izoforma X1	3659.11	15353921.0	27.42	LGVHALSCHGWILGEHGSSVPVWSGMNVAGVSLK	37	
Izomeraza glukozy-6-fosforanu łańcuch A	3928.51	3446311.5	45.47	NAPVLLAMLGIWYINCFGCETQAVLPYDQYLHR	38	
Białko zawierające domenę LIM	1053.18	1240703.5	13.47	SLASETFVAK	39	
Lizosomalna alfa-mannozydaza	1424.63	1072166.5	18.22	TGFLMQIEDLEK	40	
Fosfoglukomutaza-1	1504.52	893398.5	11.65	YDYEVEAEGATK	41	
S-transferaza glutationowa Mu 1,	1197.39	2356479.5	22.43	LQLYSQFLGK	42	
S-transferaza glutationowa Mu 1	1746.94	1701074.0	24.4	FQLVNVYCSPDFEK	43	
	2162.45	3949940.5	34.68	FTLGLDFPNLPYLIDGTHK	44	
	1930.13	1910618.0	37.93	ITFADFLVYDVLQNR	45	
Enzym rozgązłający glikogen	2384.74	913021.5	26.88	VGADNHMLHLDCVTLQTFIAK	46	
	1447.69	911777.0	29.12	LTLAEINQILYR	47	
	2789.14	1189229.0	32.63	YFTFPFEMPVSTEETMIHLPNK	48	

Podobnie analizowano osiem niezależnych partii ekstraktów dla innych gatunków zwierząt, ekstrakty z mięsa pochodzącego od świni, krowy, kurczaka, owcy, indyka, perliczki, kaczki, i gęsi, aby potwierdzić specyficzność powyższych peptydów.

Analizy te wykazały, że spektrometria mas może być zastosowana do identyfikacji specyficznych peptydów królika, o dokładnej masie i sekwencji, stanowiących markery molekularne dla gatunku królik.

Peptydy specyficzne dla królika nie zostały wykryte w ekstraktach z mięsa pochodzącego od świni, krowy, kurczaka, owcy, indyka, perliczki, kaczki, i gęsi.

Identyfikacja gatunkowa królika w mieszaninach wielogatunkowych, mięsnych produktach spożywczych

Po zidentyfikowaniu specyficznych dla gatunku królik peptydów zbadano, czy takie peptydy można wykryć w ekstraktach z mieszanin wielogatunkowych mięsnych produktów spożywczych. Metodę LC-MS/MS (przy użyciu spektrometru masowego LC-Q/TOF z Agilent Technologies) zastosowano do wykrywania specyficznych dla gatunku królik peptydów. Obecność specyficznych peptydów można wykryć w tych próbkach metodą LC-MS/MS. Przy czym liczba wykrytych peptydów zmniejsza się wraz ze zmniejszającą się ilością mięsa królika w produkcie spożywczym, z którego uzyskano ekstrakt.

Jako przykład, stosując tę metodę, peptydy królika zostały wykryty w ekstrakcie wykonanym z pasztetu zawierającego mięso królika, wieprzowe i kurczaka (Fig. 3). Podobne wyniki uzyskano dla innych ekstraktów z mięsnych produktów spożywczych o różnym składzie gatunkowym i różnej zawartości mięsa królika w produkcie. Peptydy specyficzne dla królika nie zostały wykryte w ekstraktach z produktów mięsnych nie zawierających tego mięsa.

Dzięki sposobowi wykrywania według wynalazku wszystkie z czterdziestu ośmiu specyficznych peptydów dla królika można jednoznacznie wykryć w ekstraktach z mięsa królika oraz mieszankach analitycznych do wykrywania, identyfikowania, potwierdzania obecności i ilościowego oznaczania mięsa królika w oparciu o skład peptydowy.

Niniejszy wynalazek dostarcza skuteczny test do identyfikacji i potwierdzenia obecności gatunku królik w produktach spożywczych zwłaszcza w mieszaninach zawierających wiele gatunków mięsa.

Niniejszy wynalazek dostarcza również czuły test identyfikacyjny, do udokumentowania obecności specyficznych peptydów królika w mieszankach analitycznych wytwarzanych z ekstraktów z mięsa królika lub syntetycznych peptydów.

Peptydy specyficzne dla królika zidentyfikowano najpierw ze względu na ich specyficzne masy i charakterystykę sekwencji aminokwasowych, które można użyć jako markery molekularne dla gatunku. Stosując metodę LC-MS/MS, osiągnięto wysoki poziom swoistości wykrywania przy łączeniu (1) sygnałów MS/MS, (2) pomiarów masy w wysokiej rozdzielczości i (3) czasów retencji chromatograficznej. Zatem wykazano, że powyższe peptydy są specyficzne dla gatunku królik, co potwierdzono dla trzech różnych prób oraz ośmiu różnych negatywnych (nie zawierających mięsa królika) prób – ośmiu gatunków mięs innych niż królik.

Rzecznik patentowy

Anna Belz