

# Zavedení a validace PCR metody ke stanovení vybraných producentů aflatoxinů a ochratoxinu A izolovaných z potravin

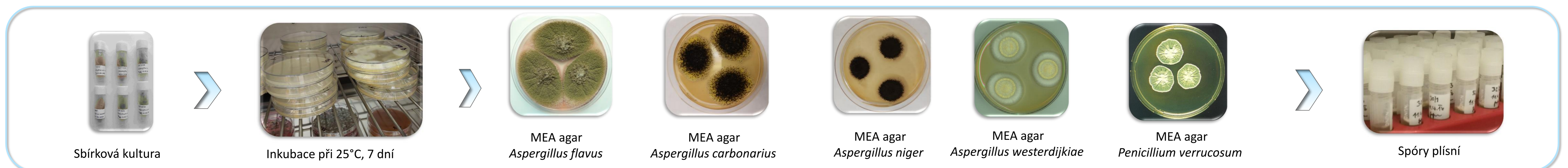
Veronika Kýrová, Vladimír Ostrý, Jiří Ruprich  
Státní zdravotní ústav v Praze, Centrum zdraví, výživy a potravin v Brně  
veronika.kyrova@szu.cz

## Úvod

- Toxinogenní vláknité mikroskopické houby (toxinogenní plísně) mají schopnost produkovat mykotoxiny.
- Význam v potravinách má asi 70 druhů toxinogenních plísní z celkového počtu více než 120 druhů.
- K detekci se nejčastěji využívají klasické mykologické metody. V posledních letech jsou také využívány molekulárně-biologické metody.
- Cílem studie je zavedení, optimalizace a validace kvalitativní PCR metody k identifikaci vybraných druhů producentů aflatoxinů (*Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*) a ochratoxinu A (*Aspergillus niger*, *A. carbonarius*, *A. westerdijkiae*, *Penicillium verrucosum*).

## Materiál a metody

### Klasické mykologické kultivační metody



### Izolace DNA



### Druhá identifikace metodou PCR

#### PCR amplifikační podmínky

- PCR reakce prováděna v celkovém objemu 25 µL obsahující 30 ng DNA, 1X of Combi PPP mastermix (Top Bio, Czech Republic) and 0,8-1 µmol/L každého primeru.
- Amplifikace byla provedena v termocykleru GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer).
- PCR produkty byly verifikovány na 2% agarózovém gelu pomocí elektroforézy (2% agarózový gel v 1x TAE pufru) (40 mmol/L Tris-HCl and 1 mmol/L EDTA, pH 8.0).
- Velikost PCR produktu byla porovnána s délkovým standardem DNA- length standard Ready-to-use 100 bp ladder (Biotium, USA).
- DNA fragmenty vizualizovány pomocí barvičky GelRed stain (Biotium, USA).
- Vizualizace byla provedena na transiluminátoru (BIO-Print set, Vilbert Lourmat, France).



### Detekce druhů producentů aflatoxinů

### Detekce druhů producentů ochratoxinu A

**Aspergillus flavus**

- PCR metoda detekuje sekvenci ITS regionu, specifickou pro *Aspergillus flavus* za použití specifických primerů:  
FLA1: gta ggg ttc cta ggc agc c  
FLA2: gga aaa aga ttg att tgc gtt c
- Amplikon o velikosti ~500 bp
- Teplotní cyklus: 1. 95 °C 5 min  
2. 95 °C 30 sec  
3. 58 °C 30 sec  
4. 72 °C 45 sec  
5. 72 °C 5 min  
6. 4 °C ∞

**Aspergillus carbonarius**

- PCR metoda detekuje sekvenci β-ketosyntasy a acyltransferasy, specifickou pro *Aspergillus carbonarius* za použití specifických primerů:  
AcKS10R: ccc tga tcc tgc tat gat agc  
AcKS10L: ccc gcc tta gat ttc tcc cac
- Amplikon o velikosti 161 bp
- Teplotní cyklus: 1. 95 °C 2 min  
2. 95 °C 40 sec  
3. 52 °C 40 sec  
4. 72 °C 40 sec  
5. 72 °C 3 min  
6. 4 °C ∞

**Aspergillus westerdijkiae**

- PCR metoda detekuje sekvenci genu β-tubulinu, specifickou pro *Aspergillus westerdijkiae* za použití specifických primerů:  
Bt2Aw-F: tga tac ctt ggc get tgt gac g  
Bt2Aw-R: cgg aag cct aaa aaa tga aga
- Amplikon o velikosti 347 bp
- Teplotní cyklus: 1. 95 °C 5 min  
2. 95 °C 30 sec  
3. 62 °C 30 sec  
4. 72 °C 30 sec  
5. 72 °C 5 min  
6. 4 °C ∞

**Aspergillus parasiticus**

- PCR metoda detekuje sekvenci ITS regionu, specifickou pro *Aspergillus parasiticus* za použití specifických primerů:  
PAR1: gtc atg gcc gcc ggg ggc gtc  
PAR2: cct gga aaa aat ggt tgt ttt gcg
- Amplikon o velikosti ~430 bp
- Teplotní cyklus: 1. 95 °C 5 min  
2. 95 °C 30 sec  
3. 69,3 °C 30 sec  
4. 72 °C 30 sec  
5. 72 °C 5 min  
6. 4 °C ∞

**Aspergillus niger**

- PCR metoda detekuje sekvenci ITS regionu, specifickou pro *Aspergillus niger* za použití specifických primerů:  
ITS1: tcc gta ggt gaa cct ggc g  
NIG: cgc gag aga ggg gac ggc
- Amplikon o velikosti 420 bp
- Teplotní cyklus: 1. 95 °C 4 min  
2. 95 °C 30 sec  
3. 66 °C 25 sec  
4. 72 °C 40 sec  
5. 72 °C 5 min  
6. 4 °C ∞

**Penicillium verrucosum**

- PCR metoda detekuje sekvenci genu polyketidsyntázy ochratoxinu A, specifickou pro *Penicillium verrucosum* za použití specifických primerů:  
pkcCT-Mp3\_for: cca agc ggc gga cag tg  
pkcCT-Mp3\_rev: tgc agc agg gga agt agg
- Amplikon o velikosti 415 bp
- Teplotní cyklus: 1. 95 °C 5 min  
2. 95 °C 30 sec  
3. 60 °C 40 sec  
4. 72 °C 30 sec  
5. 72 °C 5 min  
6. 4 °C ∞

## Výsledky a diskuze

- Zavedeny validované PCR metody ke kvalitativní druhové identifikaci kmenů toxinogenních plísní *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. westerdijkiae*, *Penicillium verrucosum*.
- Specifita primerů byla ověřena na sbírkových kmenech ze Sbírkovy kultur hub (CCF) – *Aspergillus flavus* (CCF1624), *A. parasiticus* (CCF3058), *A. westerdijkiae* (CCF6107), *A. ochraceus* (CCF0512), *A. niger* (CCF5598), *A. nomius* (CCF3086), *Penicillium verrucosum* (CCF1636), *P. expansum* (CCF1221).

## Závěr

Na základě literární rešerše byly vybrány, optimalizovány a validovány metody ke kvalitativní identifikaci izolovaných kmenů toxinogenních plísní z potravin. Metody budou využity při analýze vzorků potravin v rámci realizace studie „HYGIMON – Toxinogenní plísně v potravinách“, která je dlouhodobě realizována v rámci Systému monitoringu zdravotního stavu obyvatelstva ve vztahu k životnímu prostředí (MZSO) na SZU-CZVP v Brně.

