

Jenni Kannelsalo

DNA-viivakoodaus elintarvikkeiden aitous- tutkimuksissa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

1.12.2015

Tekijä(t) Otsikko	Jenni Kannelsalo DNA-viivakoodaus elintarvikkeiden aitoustutkimuksissa
Sivumäärä Aika	26 sivua + 1 liitettä 1.12.2015
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Ohjaaja(t)	Annikki Welling, FT, erikoistutkija Tiina Soininen, FL, lehtori
<p>Opinnäytetyön tarkoituksena oli ottaa käyttöön ja validoida DNA-viivakoodaus-menetelmä Elintarviketurvallisuusvirasto Eviralle. DNA-viivakoodaus oli alun perin ekologisiin tutkimuksiin kehitelty menetelmä, mutta pian siitä huomattiin olevan hyötyä myös muilla tutkimusalueilla, kuten elintarvikkeiden aitoustutkimuksissa. Elintarvikepetoksia ja etenkin mereneläviin kohdistuvia väärennöksiä paljastuu yhä enemmän maailmalla. Suomessa näitä väärennöksiä ei ole kovinkaan paljoa tutkittu aikaisemmin.</p> <p>DNA-viivakoodaus-menetelmä perustuu siihen, että genomista on valittu alue, jossa lajin sisällä emäsjärjestys vaihtelee mahdollisimman vähän ja eri lajien välillä suuresti. Lajit voidaan erottaa toisistaan viivakoodialueen sekvenssien perusteella. Eläinlajeilla käytetään usein mitokondriaalisen DNA:n <i>sytokromi c oksidaasi 1</i> -geeniä (<i>CO1</i>) ja kasveilla kloroplastin <i>maturaasi K (matK)</i>- ja <i>ribuloosi bisfosfaatti karboksylaasi iso alayksikkö (rbcl)</i> -geenejä.</p> <p>Opinnäytetyön laboratorio-osuus suoritettiin pääosin Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto FDA:n laatiman työohjeen mukaisesti. Kalanäytteestä eristettiin DNA, josta monistettiin PCR:llä tietty nukleotidijakso. PCR-tuote puhdistettiin ja sekvensoitiin. Sekvensoinnin tulokset käsiteltiin bioinformatiikan työkaluin ja saatuja sekvenssejä verrattiin sekvenssitietokantoihin, jolloin saatiin selville näytteen kalalaji.</p> <p>Menetelmän käyttöönotto onnistui hyvin. DNA-eristys onnistui, mikäli näytemäärä ei ollut liian suuri. Erilaiset matriisit, kuten savustettu tai suolattu kala, eivät aiheuttaneet ongelmia. Poikkeuksena olivat ainoastaan liian prosessoidut tuotteet, kuten öljyyn säilötty purkkikala. Työssä käytetyt alukkeet toimivat usealle lajille, ja lajintunnistus onnistui vähintään sukutasolle asti. Alustavien tutkimusten perusteella samat alukkeet ja menetelmä soveltuvat myös eläinlajien määrittämiseen.</p>	
Avainsanat	DNA-viivakoodaus, <i>CO1</i> , PCR, sekvensointi

Author(s) Title	Jenni Kannelsalo DNA barcoding in food authenticity researches
Number of Pages Date	26 pages + 1 appendices 1 December 2015
Degree	Bachelor of Laboratory Sciences
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructor(s)	Annikki Welling, phil. doc., Senior Researcher Tiina Soininen, phil. lic., Senior Lecturer
<p>The purpose of this Bachelor's thesis was to implement and validate a DNA barcoding method for Finnish Food Safety Authority Evira. DNA barcoding method was originally developed for ecological studies, but soon it was found to be useful in other areas of research as well, such as food authenticity studies. Increasing amount of food frauds, especially sea-food forgeries have been found around the world. In Finland, these forgeries have not been studied intensively until recently.</p> <p>DNA barcoding method is based on analysis of a selected area in the genome. The selected genome area should have as little sequence variety as possible within a species and as much as possible between different species. Species can be identified by the sequences of the barcode region. The <i>cytochrome c oxidase subunit 1</i> gene (<i>CO1</i>) from mitochondrial DNA is often used with animal identification, and <i>maturase K (matK)</i> and <i>ribulose biphosphate carboxylase large chain (rbcL)</i> genes from the chloroplast are used when researching plants.</p> <p>The laboratory work in this thesis was carried out mainly in accordance with the standard operating procedure made by the U.S. Food and Drug Administration FDA. The DNA was extracted from the fish sample, and a specific nucleotide sequence was amplified from the DNA. The PCR product was purified and sequenced. The results of the sequencing were processed with bioinformatics tools, and the gained sequences were compared to sequence databases to identify the species of the fish sample.</p> <p>The implementation of this method was successful. DNA extraction succeeded if the sample was not too large. Different matrices, such as smoked or salted fish, did not cause problems. The only exceptions were too far processed products, such as fish canned in oil. The primers used in this thesis were functional in many species and the identification of the species was successful until the family level at least. On the bases of the preliminary studies, the same primers and method are also suitable for the identification of several animal species.</p>	
Keywords	DNA barcoding, <i>CO1</i> , PCR, sequencing

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	2
2	Teoria	3
2.1	Elintarvikepetokset	3
2.2	Yleisesti DNA-viivakoodauksesta	4
2.3	DNA-viivakoodauksessa käytettävät geenit	6
2.4	DNA-viivakoodaus käytännössä	8
2.5	Validoinnista	9
3	Työn suoritus	11
3.1	Laboratorio-osuus	11
3.2	Bioinformatiikka-analyysit	13
3.2.1	Sekvenssin vertaaminen NCBI:n geenidatapankissa	14
3.2.2	Sekvenssin vertaaminen BOLD:n geenidatapankissa	15
4	Tulokset ja niiden käsittely	16
4.1	DNA-saanto ja PCR:n toimivuus eri matriisityypeillä	16
4.2	Mitokondrion <i>sytokromi c oksidaasigeeni 1</i> monistaminen eri kalalajeista	19
4.3	Menetelmän spesifisyys	21
5	Tulosten pohdinta ja yhteenveto	22
	Lähteet	24

Liitteet

Liite 1. Näytetaulukko

1 Johdanto

Opinnäytetyön tarkoituksena oli ottaa käyttöön DNA-viivakoodaus-tutkimusmenetelmä ja validoida se Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran käyttöön. Menetelmää käytetään elintarvikkeiden aitouden selvittämisessä siten, että sen avulla voidaan tunnistaa kalalajit elintarvikkeenäytteistä. Elintarvikevääreännösten määrät ovat kasvussa maailmalla, mutta Suomessa näitä petoksia ei juurikaan ole tutkittu. Lähtökohtaisesti ajatellaan, että elintarvikepetokset ovat mahdollisia ja aitoustutkimuksille on tarve.

Elintarvikkeiden vääreännöksissä tuotetta tai sen alkuperää on muutettu siitä ilmoittamatta. Vääreännösten yleisyyttä kuvaa se, että erään tutkimuksen mukaan 15 - 43 % kaikista Pohjois-Amerikassa markkinoilla olevista lajeista ovat vilpillisiä. Lajeja korvataan toisilla samankaltaisilla lajeilla, joko tahattomasti tai täysin tiedostaen. Esimerkiksi niilinahvenella on korvattu muita ahvenlajeja, mikä voi aiheuttaa terveysriskejä. Niilinahventa pyydetään Afrikan joista, jotka ovat saastuneet etenkin metyylielohopealla. Elintarvikevääreännöksillä on suuret vaikutukset ruuan turvallisuuteen, elintarviketeollisuuteen, eliöiden suojeluun ja pyyntialueiden kestävyYTEEN. [1; 5.]

Perinteisesti kalaelintarvikkeiden aitoutta on tutkittu morfologisten ominaisuuksien ja proteiineihin perustuvien tutkimusmenetelmien avulla. Korvatut kalalajit on kuitenkin vaikea tunnistaa, jos kyseessä on osa vaalealihaista lajia, kuten raaka filee, tai elintarvike on kypsennetty. Tällöin tulee hyödyntää DNA:han perustuvia tutkimusmenetelmiä. DNA-viivakoodaus kehitettiin alun perin ekologisiin tutkimuksiin, jotta eliölajeista saataisiin uutta tietoa. Kuitenkin pian huomattiin, että menetelmästä on hyötyä myös useilla muilla tutkimusalueilla, kuten elintarvikkeiden aitouden tutkimuksissa.

DNA-viivakoodiksi kutsutaan genomista valittua aluetta, jossa emäsjärjestys vaihtelee mahdollisimman vähän lajin yksilöiden välillä, mutta sen vaihtelevuus on suurta eri lajien välillä. Lajit pystytään erottamaan toisistaan tämän viivakoodialueen sekvenssin perusteella. Menetelmässä käytetään universaaleja alukkeita, jotka toimivat mahdollisimman monella lajilla. DNA-viivakoodauksen tavoitteena on kerätä digitaalinen kirjasto, jonka lajispesifisiin sekvensseihin voisi verrata tutkittavia näytteitä. [1.]

Opinnäytetyössä kartoitetaan DNA-viivakoodaus-menetelmän toimivuus eri kalalajeille ja matriiseille. Menetelmän käyttökelpoisuudelle Evirassa on kriittistä se, että alukkeilla

pystytään monistamaan *CO1*-geeni mahdollisimman monesta kalalajista. DNA-viivakoodauksen tulisi onnistua eri tavoin valmistetuista kalaelintarvikkeista, esimerkiksi savustetusta ja suolatusta kalasta, ja menetelmän toimivuus erilaisille matriiseille tulee selvittää. Lisäksi työssä käytettyjen alukkeiden tulee toimia kahteen suuntaan sekvensoitaessa ja näytteestä tulee saada linjattua konsensussekvenssi.

2 Teoria

2.1 Elintarvikepetokset

Elintarvikkeiden laatu ja turvallisuus ovat nykyään huolenaiheina maailmalla. Elintarvikkeiden väärennöksissä tuotetta tai sen alkuperää on muutettu siitä ilmoittamatta. Kala-elintarvikehujauksissa sorrutaan vaikkapa liialliseen tuotteiden glaseeraukseen tai leivitykseen, alikanttiin punnitukseen tai suurempana petoksena jopa tietyn lajin korvaamiseen toisella samankaltaisella lajilla. Esimerkki laittomasta ja hengenvaarallisesta lajin korvaamisesta maailmalla on merikrotin tilalla käytetty myrkyllinen pallokala. Elintarvikeväärennöksillä on suuret vaikutukset ruuan turvallisuuteen, elintarviketeollisuuteen, eliöiden suojeluun ja pyyntialueiden kestävyYTEEN. [1; 5.]

Merenelävät ovat yksi useimmiten väärennetyistä tuotteista. Niiden kulutuksen kasvu ja markkinoiden globaalius ovat johtaneet siihen, että kauppareittejä ja elintarviketeollisuuden prosesseja on vaikea kontrolloida. Lajipetokset voivat johtua siitä, että fileenä useat vaalealihaiset kalat ovat morfologisesti kovin samankaltaisia (kuva 1) ja väärän lajin joutuminen tuotteeseen voi olla vahinko. Kuitenkin kyseinen toiminta voi olla myös tahallista, jolloin saatetaan käyttää eri alkuperää olevaa tuotetta tai jopa eri lajia kuin pakkausmerkinnät kertovat. Petoksen tarkoituksena on korvata erot tuotteen laadussa tai hinnassa sekä pyydystystavassa. [1; 3.]



Kuva 1. Vaalealihaisia kaloja ei helposti erota toisistaan, kuvassa esimerkkeinä turska, meriahven ja valkotonnikala [21].

Kalojen lajintunnistus on tärkeää, jotta voidaan taata ruokateollisuuden korkeat laatu-standardit. Viranomaistahot, kuten Euroopan unioni, ovat julkaisseet asetuksen elintarvikelainsäädäntöä koskevista yleisistä periaatteista ja vaatimuksista (EY 178/2002), koskien merenelävien jäljitettävyyttä muun muassa tuotannossa, sekä alkuperän ja lajin tunnistusta. Perinteiset lajintunnistukseen käytetyt laboratoriomenetelmät perustuvat proteiinimäärytyksiin, mutta niillä on alhainen tehokkuus prosessoiduissa tuotteissa. DNA:han perustuvat menetelmät ovat tehokkaampia, sillä DNA on informatiivisempaa kuin proteiinit, eikä se hajoa elintarviketeollisuuden prosesseissa yhtä helposti. [1; 2.]

2.2 Yleisesti DNA-viivakoodauksesta

Vuonna 2003 Guelphin yliopistossa Kanadassa kehiteltiin uusi menetelmä lajien identifiointiin: DNA-viivakoodaus. Se muotoutui jo olemassa olevien menetelmien pohjalta, eikä täten ollut täysin uusi innovaatio. Alun perin menetelmää oli tarkoitus käyttää ekologian tutkimuskäytössä, mutta nykyään sitä sovelletaan myös moniin analyyseihin, mukaan lukien elintarviketutkimukset. DNA-viivakoodaus perustuu emäsjärjestyksen vaihtelevuuden analysointiin genomista valitulla alueella, ns. ”viivakoodialueella”. Jokaisella eliöllä on tietty DNA-sekvenssi, jonka emäsjärjestys vaihtelee lajin sisällä vähän. Eri la-

jien välillä nukleotidijärjestys vaihtelee paljon. Näin ollen lajit on mahdollista erottaa toisistaan. Lajin jäsenen voi identifioida vertaamalla sen viivakoodisekvenssiä geenidatapankin lajispesifisiin sekvensseihin. [1.]

Menetelmän tavoitteena on tuottaa laadukas, yhtenäinen, noin 700 bp kokoinen sekvenssi. Jos DNA on vaurioitunut, saadaan tulokseksi lyhyempiä sekvenssejä. Jopa lyhyillä sekvensseillä (100 - 200 bp) voidaan onnistua selvittämään laji-identiteetti, mutta menetelmä ei toimi, jos DNA on liian vaurioitunut. Vaurio voi tapahtua elintarvikkeen käsittelyvaiheessa, esimerkiksi lämmön vaikutuksesta, liian alhaisesta pH:sta tai nukleaaasien aiheuttamasta entsyymaattisesta hajoamisesta. [2; 4.]

Tutkittujen lajien DNA-sekvenssit kerätään genomidatapankkeihin. Nämä digitaaliset kirjastot ovat tutkijoiden vapaassa käytössä ilmaisten Internet-ohjelmien avulla. Tutkijat määrittävät sovittujen ohjeiden mukaisesti lajien viivakoodit ja lataavat ne sekvenssikirjastoon. [1.] Esimerkiksi FISH-BOL (The Fish Barcode of Life Initiative) on kansainvälinen tutkijoiden ryhmä, jonka pääperiaatteena on kerätä DNA-viivakoodien referenssikirjasto kaikista maailman kalalajeista [5]. BOLD (The Barcode of Life Data Systems) ja NCBI (The National Center for Biotechnology Information) ovat tietokantoja, joista voi löytää kaikkien viivakoodattujen lajien sekvenssit. BOLD:iin on tarkoitus kerätä kaikkien maailman lajien DNA-viivakoodit iBOL:in (the International Barcode of Life) mission mukaisesti. iBOL on jakautunut eri toimintayksikköihin, kuten FISH-BOL tai Suomen lajistoa kartoittava FinBOL (Finnish Barcode of Life). NCBI:hin voi ladata sekvenssejä kuka tahansa tutkija mistä päin maailmaa tahansa. [9; 10; 11; 12; 13.]

DNA-viivakoodaus on hyvä valinta merenelävien identifiointiin elintarviketeollisuuden tuotteista, koska muut menetelmät eivät ole yhtä käytännöllisiä, esimerkiksi prosessoituja valmisteita tutkittaessa. Muihin eläimiin verrattaessa merenelävien lajikirjo on suurempi ja merenelävistä saatavilla sekvenssitiedoilla voidaan määrittää jopa alueellisia eroja lajin sisällä. Tällä tavalla voidaan saada selville kalavalmisteen alkuperä. [1.]

Menetelmä on yleistynyt elintarviketutkimuksissa, koska molekyylianalyysien, kuten sekvenssoinnin, hinnat ovat alentuneet, rinnastukseen sopivat sekvenssit ovat vapaasti saatavilla datapankeista ja kuluttajien vaatimukset ovat kasvaneet elintarvikkeiden laadun suhteen. DNA-viivakoodaus on luotettava, halpa ja nopea metodi elintarvikkeiden aitouden tunnistamiseen ja alkuperän jäljittämiseen. Menetelmän vahvuutena on sekvenssikirjasto, jonka data ei vanhennu. Yhtenäisten olosuhteiden mukaisesti luodut kirjastot

mahdollistavat datan laajan kansainvälisen käytön. Muita hyviä puolia ovat esimerkiksi, että menetelmä toimii kaikille elämän muodoille ja taksonomisella tasolla sen avulla kerätään talteen hyvin tärkeää tietoa maailman lajeista. Sekvenssien pohjalta voidaan myös luoda fylogeneettisiä puita, joilla kuvataan lajien sukulaisuussuhteita. DNA-viivakoodauksen rajoitteena on, ettei se toimi useaa lajia sisältäville matriiseille, ja on vaikeaa erottaa toisistaan lajit, joilla on vain vähän molekulaarista eroavaisuutta. [1; 4; 6.]

2.3 DNA-viivakoodauksessa käytettävät geenit

Sytokromi c oksidaasi (kuva 2) on bakteereilla ja eukaryooteilla esiintyvä transmembraaniproteiini. Se on elintärkeä proteiini, joka toimii kaikilla eläimillä ja löytyy siten kaikilta lajeilta. Sytokromi c oksidaasi on oksidatiiviseen fosforylaatioon kuuluvan elektroninsiirtoketjun viimeinen entsyymi ja sen tehtävänä on vastaanottaa elektroni neljältä sytokromi c -molekyyliltä. Elektronit siirretään happimolekyylille, mikä tuottaa 2 vesimolekyyliä. Elektronien siirron kanssa samanaikaisesti poistetaan 4 protonia mitokondriaalisesta aineksesta, jotta protonigradientti säilyy tasapainossa. [30.]

Sytokromi c oksidaasi on kalvoproteiinikompleksi, joka on jaettu neljään osaan, eli alaindeksiin ("subunit"). Alaindeksit I ja IV sijaitsevat kompleksin päissä ja toimivat aloituskohtina, joihin lisätään hemimolekyylit, eli sytokromi a ja sytokromi a₃, sekä kuparikofaktorit Cu_A ja Cu_B. Tärkein alaindekseistä on sytokromi c oksidaasi I, joka on ainoa alaindeksi, joka esiintyy kaikissa hemi-Cu-oksidaasi-respiraatioissa. Sytokromi c oksidaasi I on proteiini, jota koodaa *CO1*-geeni. Tämä alue mitokondriaalisessa aineksessa on konservoitunut lajille ominaiseksi ja sen on todettu sopivan DNA-viivakoodaukseen. [30.]



Kuva 2. Sytokromi c oksidaasi -kompleksi, jossa pinkki osa kuvaa alaindeksiä 1 eli *CO1*-geenin koodaamaa aluetta [29].

Eläinlajeille DNA-viivakoodiksi on vakiintunut tämä mitokondriaalisen DNA:n *sytokromi c oksidaasi 1* -geeni, joka voidaan merkitä myös *COI*, *CO1*, *cox1* tai *co-1*. Se on 648 emäsparin pituinen alue, joka alkaa läheltä *sytokromi c oksidaasi* -geenin 5'-päätä. Mitokondriaalinen DNA toimii paremmin lajintunnistuksessa kuin genominen DNA, sillä mitokondriaalinen DNA on yksinkertaisempaa, eikä siinä ole esimerkiksi introneja. Se ei myöskään maternaalisesti perittyinä käy läpi niin paljoa geneettisiä muutoksia, jolloin sekvenssien epäselvyydet ovat paremmin vältettävissä. *CO1*-geeni toimii myös kasvilajien identifiointissa, mutta sitä käytettäessä kasveilla ei ole riittävästi emäsjärjestyksen vaihtelua lajin tunnistamiseen. [2; 3; 4.]

Kasveja viivakoodattaessa käytetään muun muassa kloroplastin *maturaasi K* (*matK*)- ja *ribuloosi bisfosfaatti karboksylaasi iso alayksikkö* (*rbcL*) -geenejä. Kasvilajeilla mitokondriaalisessa DNA:ssa muutokset ovat olleet hitaampia, joten eri lajeilla on vähemmän molekulaarista eroa. Identifiointissa on siis huono resoluutio, eli lajit ovat molekulaarisesti liian lähellä toisiaan. Tästä syystä kasveille on ehdotettu eri geenejä kloroplastista ja 2-lokuisia yhdistelmiä. [1; 26.]

2.4 DNA-viivakoodaus käytännössä

Menetelmän suoritus perustuu seuraaviin työvaiheisiin: näytteenottoon, DNA-eristykseen, PCR-reaktioon, PCR-tuotteen puhdistukseen ja Sanger-sekvensointiin. Lisäksi saadut sekvensointituotteet analysoidaan erilaisia bioinformatiikkaohjelmia avuksi käyttäen. [7.]

Näytteenottovaiheessa on tärkeää varmistaa, ettei näyte kontaminoidu muulla kuin näytteestä peräisin olevalla DNA:lla. Kontaminaatio voi olla toisesta näytteestä aiheutuva riskikontaminaatio tai välineistä tarttuvaa DNA:ta. On myös huomioitava, että menetelmä toimii ihmisperäisellekin DNA:lle. [7.]

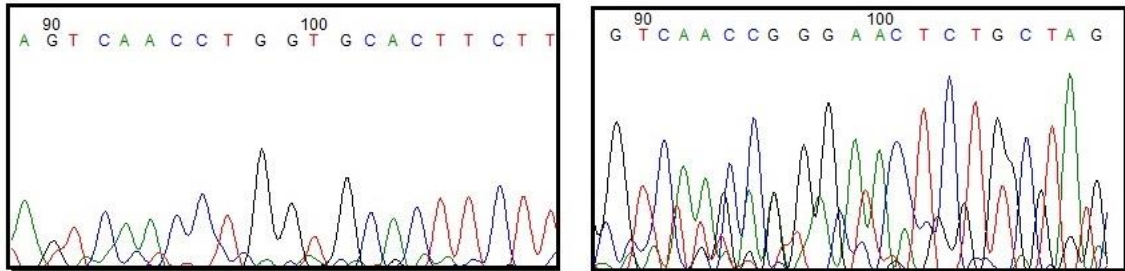
DNA eristetään kokonais-DNA:sta, joka sisältää sekä kromosomaalisen että mitokondriaalisen DNA:n. Aitoustutkimuksissa käytetään usein mitokondriossa sijaitsevaa DNA:ta, sillä mitokondriot periytyvät maternaalisesti, eikä niissä tapahdu rekombinaatiota. Viivakoodauksessa tavoitteena on, että lajin sisällä nukleotidijärjestyksen vaihtelu on vähäistä, mutta lajien välillä suurta. Mitokondriaalisen DNA:n käyttö mahdollistaa tämän. DNA:sta monistetaan PCR:llä viivakoodaukseen tarkoitettua *sytokromi c oksidaasi 1* -geeniä. [7; 16.]

Sekvensointia varten PCR-tuotteesta täytyy puhdistaa jäämät alukkeista, ylimääräisistä nukleotideista, entsyymeistä ja suoloista. Puhdistus perustuu yleensä siihen, että puhdistettavaan näytteeseen lisätään reagenssia, joka hajottaa entsyymireaktioilla ylimääräiset alukkeet ja dNTP:t. [19; 25.]

Perinteisessä Sanger-sekvensoinnissa tulee käyttää yksijuosteista DNA:ta, mutta PCR:ään yhdistettynä voidaan käyttää suoraan kaksijuosteista DNA:ta. Tällöin käytetään vain yhtä aluketta per reaktio, jotta saadaan syntetisoitua yhtä juostetta kerrallaan. Saadut fragmentit erotellaan sekvensointilaitteessa geelielektroforeesin avulla pienenevän kokonsa mukaiseen järjestykseen, jolloin laite voi mitata dideoksinukleotidien eri aallonpituuksilla ilmenevät fluoresenssit. Templaatin nukleotidijärjestys saadaan tietokoneavusteisesti elektroferogrammista.

Sekvensoinnin jälkikäsitteilyn tavoitteena on muodostaa kattava ja eheä sekvenssi, jota voidaan verrata datapankin sekvenssikokoelmiin. Analyysissä käytetään Internetistä vapaasti saatavilla olevia ohjelmia, joita ovat esimerkiksi MEGA6, BOLD ja NCBI:n BLAST.

Elektroferogrammista tarkastellaan sekvensoinnin onnistumista; siitä tulee löytyä riittävän pitkä alue, jossa emäkset erottuvat hyvin toisistaan (kuva 3, vasen puoli) eikä epävarmoja kohtia saa olla liikaa (kuva 3, oikea puoli). DNA-viivakoodauksessa ideaalita-pauksen sekvenssin *CO1*-geenille tulisi olla yli 500 bp pitkä [7]. Jos PCR-reaktiossa alukkeet ovat sitoutuneet epäspesifisesti ja siinä on monistunut useampaa geeniä, tai temp-laattina käytetty DNA sisältää useampaa lajia, elektroferogrammissa on todennäköisesti paljon epävarmoja emäksiä, eikä sekvenssiä voida käyttää lajinmääritykseen.



Kuva 3. Esimerkki sekvensoinnista saaduista elektroferogrammeista. Vasemmalla on onnistunut sekvensointireaktio, jossa emäkset erottuvat hyvin toisistaan. Oikeanpuoleisen kuvan sekvensointitulos on epäselvä; siinä on paljon päällekkäisiä emäksiä.

Avatuista ab1-muotoisista tiedostoista laaditaan rinnastusta varten identtinen konsensussekvenssi. Reverse-sekvenssi muunnetaan käänteiskomplementaariseksi ja se linjataan forward-sekvenssin kanssa. Konsensussekvenssin molemmista päistä editoidaan pois linjauksen ulkopuolelle jäävä osa sekä alukesekvenssit. Pitää huomioida, että konsensussekvenssin tulisi olla 648 bp pitkä, ja jos sekvenssi on tätä paljon pidempi, siihen ovat saattaneet jäädä sekvensoinnin alukkeet mukaan.

Saatu konsensussekvenssi rinnastetaan vähintään kahdessa geenidatapankissa, jotta tulos olisi luotettava. Tulokseksi toivottaisiin yhtä, selkeää kalalajia, mutta jotkin lajit voidaan tunnistaa vain sukutasolla, sillä niiden *CO1*-geenissä ei ole tarpeeksi vaihtelua, jolla lajien väliset erot saataisiin näkyviin. Näitä kalalajeja ovat esimerkiksi jotkin tonnikalalajit [20].

2.5 Validoinnista

DNA-viivakoodaus on menetelmänä valmiiksi validoitu. Validointia ohjeistaa esimerkiksi EN ISO 22118:2011 (E) -standardi ”Microbiology of food and animal feeding stuffs - Pol-

ymerase chain reaction (PCR) for the detection and quantification of food-borne pathogens - Performance characteristics” [27]. Standardin ohjeita voidaan soveltaa tämän työn kaltaiselle kvalitatiiviselle metodille. Validoinnissa voidaan mitata useita parametreja, mutta ne kaikki eivät päde jokaisen menetelmän kohdalla.

PCR:ään pohjautuvaa menetelmää validoitaessa tulisi ottaa huomioon seuraavat parametrit: havaitsemisraja (LOD), herkkyys, häiriöalttius, oikeellisuus, resoluutio, selektiivisyys, spesifisyys, täsmällisyys, uusittavuus ja toistettavuus. Tässä kontekstissa havaitsemisraja tarkoittaa alinta DNA:n konsentraatiota, jolla saadaan monistettua PCR-tuote ja identifioitua laji. Herkkyttä kuvaa eri pitoisuuksien vaikutus menetelmän toimivuuteen. Häiriöalttiuden kohdalla kartoitetaan, miten pienet muutokset metodissa vaikuttavat siihen. Oikeellisuus kuvaa odotetun tuloksen ja todellisen arvon yhteneväisyyttä, eli saadaanko menetelmällä se kalalaji, joka näytteessä on, eli antaako menetelmä oikean tuloksen. Resoluution voisi ajatella kuvaavan sitä, kuinka paljon lähilajeilla on molekulaa-rista eroavaisuutta keskenään. Selektiivisyys viittaa siihen, että menetelmä määrittää useiden komponenttien seasta oikean, eli tässä tapauksessa PCR:n tulisi monistaa oikeaa geeniä. Spesifisyys tässä menetelmässä tarkoittaa, että oikea kohde tunnistetaan verrattaessa sekvenssejä sekvenssikirjastoon. Täsmällisyys kuvaa tuloksen paikkansapitävyyttä. Uusittavuudella viitataan siihen, että samasta näytteestä saadaan sama tulos eri laboratorioissa. Toistettavuudella tarkoitetaan samoissa olosuhteissa tutkittuja näytteitä, joista saadaan sama tulos. [4; 5; 27.]

DNA-viivakoodaukseen on kehitelty valmiiksi validoitu menetelmä, joten tässä opinnäytetyössä oli tarpeen vain verifiointityyppinen käyttöönotto. Lähteenä [4] käytetyssä artikkelissa tutkittiin neljän vertailulaboratorion kesken lähes sataa kalanäytettä rinnakkaisnäytteineen. Toisessa artikkelissa [5] testattiin menetelmään parhaiten toimivat alukkeet useiden vaihtoehtojen joukosta. Menetelmää voi sanoa täsmälliseksi, sillä neljästä rinnakkaisnäytteestä saatiin samaan, oikeaan, lajiin viittaava viivakoodi. Menetelmän spesifisyys on hyvä, sillä jokainen saatu viivakoodisekvenssi oli ainutlaatuinen, kuitenkin tunnistuen oikean kohteen. DNA-viivakoodauksen voi sanoa olevan luotettava menetelmä, sillä neljä laboratoriota saivat artikkelissa samat lajit tuloksiksi rinnakkaisnäytteistään. Menetelmä on näiden tulosten nojalla myös toistettava. [4; 5.]

3 Työn suoritus

Työ suoritettiin pääosin Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto FDA:n (U.S. Food and Drug Administration) SOP:n (Standard operating procedure): "DNA Barcodes for Fish Identification" mukaisesti. SOP perustuu validointitutkimukseen: "A single laboratory validated method for the generation of DNA barcodes for the identification of fish for regulatory compliance". [4; 7.]

Menetelmän toimivuus testattiin erilaisilla kalaa sisältävillä elintarvikkeilla. Näytteiksi valittiin raakaa kalaa tai eri tavoin valmistettuja kalatuotteita. Tarkoituksena oli testata, kuinka hyvin eri matriiseista saatiin eristettyä DNA:ta ja kuinka hyvin käytetyt alukkeet pystyivät monistamaan *CO1*-geenin eri kalalajeista. Lisäksi testattiin, kuinka menetelmä toimii eläinlajitunnistuksessa lihanäytteitä käyttäen.

3.1 Laboratorio-osuus

Kudosnäytettä käsiteltiin steriileillä pinseteillä ja leikkausveitsillä nukleaasivapaan alustan päällä ja leikattiin siten, että joka puolelle saatiin uusi puhdas pinta. Valmis näytepala siirrettiin nukleaasivapaaseen putkeen ja näytteestä punnittiin tarkasti noin 25 mg:n koinen. Punnittuja näytteitä voitiin säilyttää - 20 °C:ssa ennen käyttöä.

DNA eristettiin Qiagenin Blood & Tissue -kitin (Cat# 69504) työvaiheiden mukaisesti. Kudosnäyte lyysattiin proteinaasi K:n avulla 56 °C:n lämpötilassa. Näytteen DNA sidottiin silikapylvääseen ja siitä pestiin epäpuhtaudet. Puhdas DNA liuotettiin pylväästä ja sen nukleiinihappokonsentraatio mitattiin NanoDropilla spektrofotometrisesti.

PCR-reaktiossa käytettiin aluke"cocktailia" (taulukko 1), jossa Y-kirjaimilla tarkoitetaan pyrimidiinejä (C tai T) ja R-kirjaimilla puriineja (A tai G). Työvaiheessa tarvittava mastermix valmistettiin taulukon 2 mukaisesti. Yhden reaktion reagenssien määrä kerrottiin PCR-ajoon menevien näytteiden lukumäärällä ja tähän lisättiin pari ylimääräistä reaktiota pipetointihävikin varalle. Taulukon esimerkkinä on mastermix 10 reaktiolle, joka riittää noin kahdeksalle näytteelle.

Taulukko 1. PCR-reaktiossa käytetyt alukkeet

F_FISHCOILBC_ts	5' CACGACGTTGTAAAACGACTCAACYAATCAYAAAAGATA-TYGGCAC 3'
R_FISHCOIHBC_ts	5' GGATAACAATTTACACAGGACTTCYGGGTGRCCRAA-RAATCA 3'

Taulukko 2. PCR-reaktion tarvittavien reagenssien määrät

reagenssi	lopullinen konsentraatio	µl / reaktio	µl / 10 reaktiota
10 % trehaloosi	5 %	12,5	125
nukleaasivapaa vesi	ad 25	6,4	64
10 X puskuri	1 X	2,5	25
50 nM MgCl ₂	2,5 nM	1,25	12,5
Forward ja Reverse aluke (10 µM molemmat, samassa putkessa)	0,1 µM	0,25	2,5
10 mM dNTP	0,05 nM	0,125	1,25
Platinum Taq (5 U/ µl)	0,024 U	0,06	0,6
DNA:ta 2 µl yhteen reaktioon			
kokonaisreaktiotilavuus		25 µl	250 µl

Mastermixiä pipetoitiin 23 µl PCR-stripin jokaiseen käytettävään kaivoon ja niihin lisättiin 2 µl DNA:ta. Liuos spinnattiin stripin pohjalle. PCR-ajo suoritettiin taulukon 3 mukaisesti.

Taulukko 3. PCR-ajon ohjelma

+ 94 °C	2 min	← 34 sykliä
+ 94 °C	30 s	
+ 55 °C	40 s	
+ 72 °C	1 min	
+ 72 °C	10 min	
+ 4 °C	∞	

PCR-ajon tuotteet analysoitiin 1 % agarosigeelillä. Se ajettiin 120 V reilun tunnin ajan ja kuvattiin UV-valoa käyttäen. Jos geelillä oli erotettavissa vain yksi bändi, ja se oli noin 700 emäsparin kokoinen, voitiin jatkaa PCR-tuotteen puhdistukseen.

Mahdollinen uusinta-PCR tehtiin vain, jos geelillä oli todella heikko bändi ja arvioitu pitoisuus oli kovin alhainen. Uusinta-PCR suoritettiin kuten aiempi PCR, mutta DNA:n sijaan templaattina käytettiin saman verran saatua PCR-tuotetta. Uusinta-PCR:n jälkeen ajettiin AGE ja tulokset tulkittiin kuten normaalisti.

PCR-tuotetta puhdistettaessa PCR-striippien kannet avattiin varoen räiskyttämästä näytteitä sekaisin. Puhdistus suoritettiin Thermo Scientificin GeneJET PCR Purification -kitin (Cat# K0701) mukaisesti, käyttäen sitomispuskurin tilavuutena 22,5 µl:aa eli samaa määrää kuin tuotetta oli jäljellä. Puhdistetusta PCR-tuotteesta mitattiin nukleiinihappokonsentraatio NanoDropilla, jonka nollaukseen käytettiin kitin uuttopuskuria.

Puhdistetusta PCR-tuotteesta tehtiin nukleaasivapaata vettä käyttäen 5 ng/µl -laimennos 55 µl:n tilavuuteen. Sekvensointipalvelun sekvensoitaviksi lähetettäviin näytteisiin laitettiin 15 µl 5 ng/µl -laimennosta sekä 2 µl 10 µM:sta aluketta (joko F tai R; taulukko 4) per putki. Sekvensointi tehtiin kahteen suuntaan, eli omissa putkissaan sekä forward että reverse. Sekvensoinnin tavoitteena oli määrittää CO1-amplikonin emäsjärjestys.

Taulukko 4. Sekvensoinnissa käytetyt alukkeet

M13F (-29)	5' CACGACGTTGTAAAACGAC 3'
M13R	5' GGATAACAATTTACACAGG 3'

3.2 Bioinformatiikka-analyysit

Sekvensointitulokset analysoitiin bioinformatiikan työkaluin. MEGA 6.06 -ohjelmaa apuna käyttäen ab1-muotoa olevista raakasekvensseistä tehtiin konsensussekvenssi. Reverse-alukkeella sekvensoitu tiedosto muunnettiin käänteiskomplementaariseksi.

Molemmat linjattavat sekvenssit valittiin ja linjattiin oletusarvoilla "Alignment/Align by ClustalW". Se osa linjauksesta, jossa sekvenssien emäkset ovat samat, on merkitty tähdellä. Konsensussekvenssin molemmista päistä editoitiin ulkopuolelle jäävät osat pois. Tarkistettiin, että mukana ei ole sekvensointialukkeita. Sekvenssi tallennettiin fastamuodossa. Fastamuodossa sekvenssin ensimmäinen rivi on nimirivi, merkittynä >, jonka jälkeen seuraavalta riviltä alkaa sekvenssi. Esimerkkinä kuvassa 4 on punakampelan (*Pleuronectes platessa*) fastamuotoinen konsensussekvenssi.


```
>Pleuronectes platessa_konsensus
TCTATCTCGTATTTGGTGCCTGAGCCGGAATAGTGGGGACGGGCCTAAGTCTGCTCATT
GGGCAGAGCTAAGCCAACCTGGGGCTCTCCTGGGAGACGACCAAATTTATAATGTAATCG
TCACCGCACACGCCTTTGTAATAATCTTCTTTATAGTAATACCAATTATGATTGGAGGGT
TTGGAAACTGACTTATCCCATTAATAATTGGGGCCCCCGATATGGCCTTCCCTCGAATAA
ATAATATGAGCTTCTGACTTCTACCCCCATCCTTTCTGCTTCTCCTGGCCTCTTCAGGTG
TTGAAGCCGGGGCGGGAACAGGGTGAACCGTATACCCCCATTAGCTGGAAACCTAGCAC
ACGCTGGGGCATCCGTAGACCTCACAATTTTCTCTCTCCACCTTGCCGGAATTCATCAA
TTCTAGGGGCAATCAACTTCATTACTACCATCATCAACATGAAGCCTACAGCAGTCACTA
TGTACCAAATCCCACACTATTTGTTTGAGCCGTACTAATTACCGCCGTTCTTCTCCTTT
CCCTTCCCGTTTTAGCCGCTGGCATTACAATACTACTAACAGACCGCAACCTAAACACAA
CCTTCTTTGACCCTGCTGGAGGGGGTGACCCCATCCTCTACCAACACCTATA
```

Kuva 4. Punakampelan (*Pleuronectes platessa*) konsensussekvenssi

3.2.1 Sekvenssin vertaaminen NCBI:n geenidatapankissa

Avattiin NCBI:n sivusto (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Valittiin ”BLAST” (Basic local alignment search tool), josta valittiin ”nucleotide blast”, eli että rinnastus tehtiin nukleiinihapposekvenssejä vastaan. ”Enter Query Sequence” -kenttään syötettiin saatu konsensussekvenssi fasta-muodossa. Kohdasta ”Choose Search Set” valittiin ”Database others”, koska kyseessä oli jokin muu laji kuin ihminen tai hiiri. Kohdassa ”Program Selection” valittiin ”highly similar sequences”, koska haluttiin mahdollisimman täsmävä blastaus tulos. Tietojen syötön jälkeen valittiin ”BLAST”.

Rinnastuksen tulos näyttää geenidatapankin lähimmäksi osuneet sekvenssitiedot järjestyksessä (kuva 5). ”Description”-kenttä kertoo hakutuloksen tieteellisen nimen, mistä lajista on kyse sekä geeniä tarkentavan kuvauksen. ”Query cover” kuvaa, kuinka monta prosenttia haetusta sekvenssistä löytyy. ”E-value” perustuu tilastotieteelliseen analyysiin ja näyttää todennäköisyyden sille, että 0-hypoteesin hylkääminen johtaa väärään tulokseen. 0-hypoteesi on yleensä konservatiivinen, eli tässä tapauksessa ”sekvenssit ovat samanlaisia”. Pieni E:n arvo viittaa siis siihen, että kyse on samasta lajista. ”Ident” kertoo kuinka monta prosenttia emäksistä on identtisiä. ”Accession”-kohdasta saa avattua hakutuloksen tarkemmat tiedot.

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Esox lucius haplotype 14 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1203	1203	99%	0.0	100%	HM563701.1
<input type="checkbox"/>	Esox lucius isolate PP218 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1201	1201	100%	0.0	99%	FJ890069.1
<input type="checkbox"/>	Esox lucius cytochrome c oxidase subunit I gene, partial cds; mitochondrial	1201	1201	100%	0.0	99%	JX238439.1
<input type="checkbox"/>	Esox lucius voucher ROM:ICH:BCF-0041-1 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1199	1199	99%	0.0	99%	EU524010.1
<input type="checkbox"/>	Esox lucius haplotype 3 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1197	1197	99%	0.0	99%	HM563690.1
<input type="checkbox"/>	Esox lucius voucher Ex53E9 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1197	1197	99%	0.0	99%	KM286640.1
<input type="checkbox"/>	Esox lucius voucher ROM:ICH:BCF-0457-1 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1195	1195	99%	0.0	99%	EU524579.1
<input type="checkbox"/>	Esox lucius isolate BOMothPP65 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1195	1195	100%	0.0	99%	FJ890071.1
<input type="checkbox"/>	Esox lucius voucher BRO5 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1195	1195	99%	0.0	99%	KM224815.1
<input type="checkbox"/>	Esox lucius voucher ROM:ICH:BCF-0457-2 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1194	1194	99%	0.0	99%	EU524578.1

Kuva 5. NCBI:n blastaus näyttää hakutuloksen tieteellisen nimen ja osuman tarkkuuden.

3.2.2 Sekvenssin vertaaminen BOLD:n geenidatapankissa

Avattiin BOLD:n sivusto (<http://www.boldsystems.org/>). Käytettiin ”Animal Identification CO1” -välilehteä ja valittiin ”Species Level Barcode Records”. Konsensussekvenssi liitettiin fasta-muodossa sille varattuun kenttään ja painettiin ”submit”.

Jos tulos on mitä todennäköisimmin tietty laji, saadaan kuvassa 6 esitetty näkymä. Jos kyseessä on epäselvä tapaus, BOLD antaa tulokseksi lähimpänä olevat kaksi lajia. Tarkempi haku voidaan tehdä ”Identification”-sivulla kohdasta ”Public Record barcode”, jolloin haku rajoittuu julkaistuun sekvenssidataan. Silloin haku voi selventyä ja tulokseksi saadaan vain yksi laji.

Jos BOLD antaa tulokseksi ”No matching records”, kyseinen näyte voi olla peräisin harvinaisesta lajista, josta ei ole olemassa sekvenssidataa. Haku voidaan laajentaa koko BOLD-tietokantaan valitsemalla ”All Barcode Records on BOLD”. Jos tulos on edelleen epäselvä, voidaan rakentaa fylogeneettinen puu ja tarkastella lajin sukulaisuussuhteita. Valitaan ”Tree based identification” ja ”Download Tree”. Tutkittava sekvenssi näkyy punaisella, ja sen sijoittuminen sukupuulla antaa lisävahvistusta lajintunnistukseen.

Query: E15-0076899 Top Hit: Chordata - Esociformes - Esox lucius (100%)

Search Result:

The submitted sequence has been matched to *Esox lucius*. This identification is solid unless there is a very closely allied congeneric species that has not yet been analyzed. Such cases are rare.

A species page is available for this taxon: [Species Page](#)

Closest matching BIN (within 3%): [BIN Page](#)

For a hierarchical placement - a neighbor-joining tree is provided: [Tree Based Identification](#)

Identification Summary:

Taxonomic Level	Taxon Assignment	Probability of Placement (%)
Phylum	Chordata	100
Class	Actinopterygii	100
Order	Esociformes	100
Family	Esocidae	100
Genus	Esox	100
Species	Esox lucius	100

Similarity Scores of Top 99 Matches:

TOP 10 Matches:

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Chordata	Actinopterygii	Esociformes	Esocidae	Esox	<i>lucius</i>	100	Published ↗
Chordata	Actinopterygii	Esociformes	Esocidae	Esox	<i>lucius</i>	99.85	Published ↗
Chordata	Actinopterygii	Esociformes	Esocidae	Esox	<i>lucius</i>	99.85	Published ↗
Chordata	Actinopterygii	Esociformes	Esocidae	Esox	<i>lucius</i>	99.85	Published ↗
Chordata	Actinopterygii	Esociformes	Esocidae	Esox	<i>lucius</i>	99.85	Published ↗
Chordata	Actinopterygii	Esociformes	Esocidae	Esox	<i>lucius</i>	99.85	Published ↗
Chordata	Actinopterygii	Esociformes	Esocidae	Esox	<i>lucius</i>	99.85	Published ↗
Chordata	Actinopterygii	Esociformes	Esocidae	Esox	<i>lucius</i>	99.85	Published ↗
Chordata	Actinopterygii	Esociformes	Esocidae	Esox	<i>lucius</i>	99.85	Published ↗
Chordata	Actinopterygii	Esociformes	Esocidae	Esox	<i>lucius</i>	99.85	Published ↗

Display option: [Top 10](#)

Kuva 6. Jos BOLD antaa tulokseksi yhden lajin, tulosikkuna näyttää tältä.

4 Tulokset ja niiden käsittely

4.1 DNA-saanto ja PCR:n toimivuus eri matriisityypeillä

DNA:ta eristettiin useista erityyppisistä kalamatriiseista, kuten raaka kala, graavisuolattu, reilusti suolattu, savustettu, uunipaistettu, tölkitetty säilyke, keitetty kala ja mäti. DNA:n eristyksessä käytettiin noin 25 mg näytettä, lukuun ottamatta mätinäytteitä, joiden painot olivat 152 mg, 932 mg ja 1287 mg, 1:lle, 5:lle ja 10 mätimunalle, tässä järjestyksessä. Taulukkoon 5 on kerätty matriiseittain DNA:n eristämisen tuloksia. Siinä kuvataan DNA:n pitoisuuksia, sekä 648 bp kokoisen *CO1*-geenin PCR-tuotteen ilmenemistä (näky / ei näy, +/-) tai vaihtoehtoisesti monistetun DNA:n konsentraatiota PCR-tuotteen puhdistuksen jälkeen.

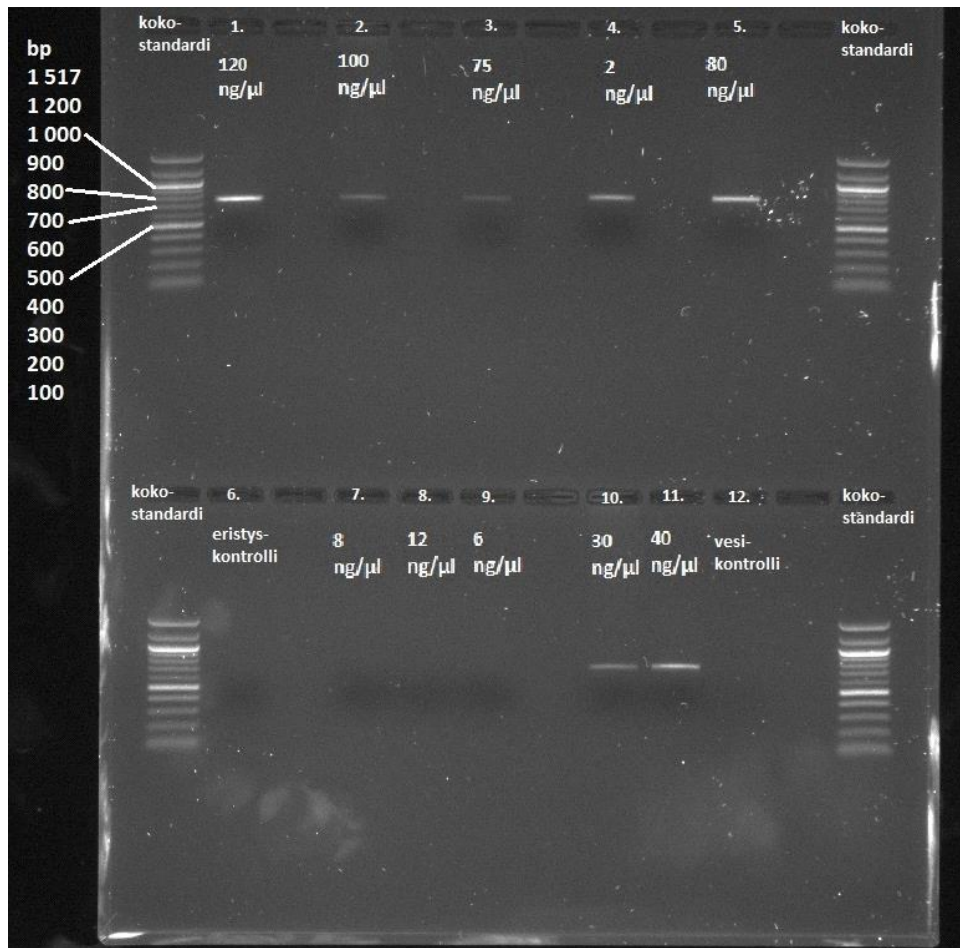
Taulukko 5. DNA:n eristäminen eri tavalla käsitellyistä kalamatriiseista Qiagenin DNeasy Blood & Tissue -kitillä.

matriisi- tyyppi	näyte	DNA:n kon- sentraatio ng/μl	DNA:n puhtaus A ₂₆₀ /A ₂₈₀	kokonais- saanto μg DNA / g näytettä	PCR monistus (+/-) tai PCR-tuotteen konsentraatio ng/μl
raaka kala	ahven	40	2,05	430	22
	seiti	140	2,15	1160	13
	lohi	110	2,20	831	23
graavisuo- lattu	lohi	125	2,20	962	26
suolattu	silli	2	2,20	16	16
savustettu	lämminsavu- kirjolohi	50	2,10	406	15
uunipaistettu	silakka	95	2,10	784	17
tölkitetty kala	savusärki	5	1,50	43	-
	tonnikala	8	2,00	64	-
	tonnikala	12	2,10	104	-
keitetty	lohikeitto	65	2,10	534	15
mäti	lohi (1 muna)	9	1,12	15,2	15
	lohi (5 mu- naa)	10	1,50	1,9	+
	lohi (10 mu- naa)	12	1,40	1,6	+

Taulukon 5 mukaan DNA:n saanto vaihteli 2 ja 125 ng/μl välillä ja kokonaissaanto vaihtaisi korreloivan saannon kanssa. Ainoastaan mätinäytteiden kokonaissaanto oli reilusti alhaisempi, mikä johtunee siitä, että lähtömateriaalia on ollut liikaa, eikä pylväspuhdistus ole toiminut toivotulla tavalla. Pylväspuhdistuksen kehnosta toiminnasta mätinäytteille kertoo myös A₂₆₀/A₂₈₀ -suhdeluvun avulla arvioitu DNA:n puhtaus, joka oli reilusti alhaisempi kuin muilla (mädeillä A₂₆₀/A₂₈₀ ~ 1,5 ja muilla A₂₆₀/A₂₈₀ ~ 2,0).

Taulukosta 5 huomataan, että tölkitetyistä kaloista saatiin reilummin DNA:ta kuin suolasta sillistä, mutta silti vain sillistä onnistui PCR-monistus. Tölkitetyissä kaloissa DNA on todennäköisesti valmistusprosessien takia kovin hajonnutta, eikä PCR onnistu monistamaan suhteellisen pitkää, 648 bp:n geeniä. Toisaalta CO1-geeni sijaitsee mitokondrioissa, ja vaikka NanoDropilla mitattu DNA:n konsentraatio olisi alhainen, näyte saattaa sisältää useita kopioita CO1-geeniä. Näin on luultavasti sillinäytteen suhteen.

Kuvassa 7 on esimerkki PCR:llä monistetun, noin 700 emäsparin kokoisen *CO1*-geenin analyysistä 1 % agarosigeelielektroforeesilla. Templaattina käytettiin 1. - 3. raaka kala, 4. silli, 5. savukala, 7. - 8. tölkitetty kala, 10. ja 11. einesruuassa oleva kala. Eristyskontrolli tarkoittaa negatiivista näytettä, eikä siitä tai vesikontrollista saa näkyä PCR-tuotetta. Kuvaan on merkitty templaattina käytetyn DNA:n konsentraatio. Lopputuotteen määrä on sitä suurempi, mitä kirkkaampi bändi geelillä näkyy.



Kuva 7. Esimerkki PCR:llä monistetun *CO1*-geenin analyysistä agarosigeelielektroforeesilla. Templaattina käytettiin 1. - 3. raaka kala, 4. silli, 5. savukala, 7. - 8. tölkitetty kala, 10. ja 11. einesruuassa oleva kala. Eristyskontrolli on negatiivinen näyte, eikä siitä tai vesikontrollista saa ilmetä bändiä.

Jos PCR-tuotteen määrä on niin vähäinen, että sitä ei riitä sekvensointiin (esimerkiksi näyte 3. kuvassa 8) tai PCR-tuotetta ei näy ollenkaan agarosigeelillä (kuva 8 näytteet 7-9), PCR voidaan uusia käyttäen templaattina aikaisempaa PCR-reaktiotuotetta (kuva 9). Jos tuotetta ei edelleenkään näy (kuva 9, näytteet 7-9), näytteessä ei todennäköisesti

ole PCR:ssä monistuvaa DNA:ta. Kuvassa 9 oleva näyte 3 kuvaa onnistunutta uusinta-PCR.



Kuva 8. Aiemmistä PCR-tuotteista tehty uusinta-PCR. Templaattina oli käytetty 1. - 3. raaka kala, 4. silli, 5. savukala, 7. - 8. tölkitetty kala, 10. ja 11. einesruuassa oleva kala.

Näiden tulosten perusteella DNA-viivakoodaus-menetelmällä pystytään eristämään DNA:ta eri tavoin käsitellyistä kalamatriiseista sekä mädistä. Tölkitetyissä kaloissa DNA on luultavasti niin pitkälle hajonnutta, ettei sitä voida käyttää DNA-viivakoodaukseen. DNA-eristys on onnistunut hyvin silloin, kun DNA:n konsentraatio on vähintään noin 40 ng/μl, ja todennäköisesti PCR onnistuu silloin ongelmitta. Kun DNA:ta on vähän tai sen puhtaus on huonoa, CO1-geenin monistaminen PCR:llä voi edelleenkin onnistua, mutta monistumisesta pitää varmistua sekvensoinnilla. Näytteen käsittelyssä on huomioitava, että lähtömateriaalia ei saa olla liikaa.

4.2 Mitokondrion *sytokromi c oksidaasigeeni 1* monistaminen eri kalalajeista

DNA-viivakoodaus-menetelmän toimivuudelle on tärkeää, että se monistaa CO1-geenin eri kalalajeista. Menetelmässä käytetään alukeseosta, joka on suunniteltu siten, että sen

avulla voidaan tunnistaa useita kalalajeja. Alukkeita testattiin lähdeartikkelissa [4] menestyksekkäästi 23 kalalajilla (taulukko 6) ja tässä opinnäytetyössä testattiin toimiviksi lisäksi 23 suomalaisille markkinoille tyypillistä kalalajia (taulukko 7).

Taulukko 6. Lähdeartikkelissa [4] toimiviksi testatut 23 kalalajia

Tieteellinen nimi	Nimi
<i>Rhomboplites aurorubens</i>	eng. Vermillion snapper
<i>Morone saxatilis</i>	Juovabassi
<i>Paralichthys lethostigma</i>	Etelänkampela
<i>Morone americana</i>	eng. White perch
<i>Centropristis striata</i>	eng. Black sea bass
<i>Oreochromis niloticus</i>	Niilin tilapia
<i>Urophycis chuss</i>	eng. Red hake
<i>Merluccius bilnearis</i>	eng. Silver hake
<i>Micropogonias undulatus</i>	eng. Atlantic croaker
<i>Salmo salar</i>	Lohi
<i>Leiostomus xanthurus</i>	eng. Spot
<i>Stenotomus chrysops</i>	eng. Scup
<i>Pomatomus saltatrix</i>	eng. Bluefish
<i>Ictiobus cyprinellus</i>	eng. Bigmouth buffalo
<i>Ocyurus chrysurus</i>	eng. Yellowtail snapper
<i>Scomberomorus regalis</i>	eng. Cero
<i>Mugil cephalus</i>	eng. Striped mullet
<i>Peprilus paru</i>	eng. American harvestfish
<i>Haemulon plumieri</i>	eng. White grunt
<i>Lagodon rhomboides</i>	eng. Pinfish
<i>Archosargus probatocephalus</i>	eng. Sheepshead
<i>Sciaenops ocellatus</i>	eng. Red drum
<i>Ictalurus punctatus</i>	eng. Channel catfish

Taulukko 7. Opinnäytetyössä toimiviksi testatut 23 kalalajia

Tieteellinen nimi	Nimi
<i>Perca fluviatilis</i>	Ahven
<i>Sander lucioperca</i>	Kuha
<i>Pollachius virens</i>	Seiti
<i>Esox lucius</i>	Hauki
<i>Clupea harengus</i>	Silli
<i>Coregonus albula</i>	Muikku
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Kirjolohi
<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	Kyttyrälohi
<i>Gadus chalcogrammus</i>	Alaskanseiti
<i>Merluccius productus</i>	Tyynenmeren kummeliturska
<i>Limanda aspera</i>	Hietakampela
<i>Argentina silus</i>	Kultakuore
<i>Theragra chalcogramma</i>	Alaskanseiti
<i>Gadus morhua</i>	Turska
<i>Pleuronectes platessa</i>	Punakampela
<i>Platichthys flesus</i>	Kampela
<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	Grönlanninpallas
<i>Coregonus lavaretus</i>	Siika
<i>Zeus faber</i>	Pietarinkala
<i>Salmo salar</i>	Lohi
<i>Sebastes alutus</i>	Puna-ahven
<i>Macruronus novaezelandiae</i>	Sinihoki
<i>Solea solea</i>	Meriantura

4.3 Menetelmän spesifisyys

Alukkeiden käyttökelpoisuus kalalajeille testattiin vielä sekvensoimalla PCR-tuotteet. Jos kahteen suuntaan sekvensoidusta PCR-tuotteesta ei saatu luotua konsensussekvenssiä, se oli merkki siitä, että alukkeet eivät olleet monistaneet oikeaa tuotetta tai tuotteita oli useampia.

Kaikista testatuista kalalajeista (ylempänä taulukko 7) saatiin linjattua konsensussekvenssi, joka todettiin CO1-geeniksi rinnastuksessa. Tulosten perusteella menetelmää

pystytään käyttämään lajintunnistukseen taulukossa mainituilla kalalajeilla. Jos tutkittava kalalaji on jokin muu, mutta sen konsensussekvenssiä geenidatapankkiin verrattaessa rinnastuksen tuloksena on ko. kalan *CO1*-geeni, voidaan päätellä menetelmän toimivan myös tälle uudelle lajille. Jos PCR:ssä on monistunut jokin muu tuote, alukkeet eivät ole toimineet niin kuin niiden pitäisi, eikä rinnastustuloksia voida käyttää lajin tunnistukseen.

Validoinnissa testattiin kokeilun vuoksi menetelmän soveltuvuutta myös muutamalle eläinlajille. Kaikkien eläinnäytteiden PCR-tuotteet näkyivät agarosigeelillä toivotussa kohtaa ja sekvensoitaviksi päätyneistä hirvestä, kanasta ja kalkkunasta saatiin oikea laji tulokseksi (Liite 1).

5 Tulosten pohdinta ja yhteenveto

DNA-viivakoodaus-menetelmä toimii usealle eri kalalajille. Jos lajia ei pystytä määrittämään, onnistuu lajintunnistus ainakin sukutasolle saakka. DNA-eristyksen saannot ovat onnistuneita, kun konsentraatio on vähintään noin 40 ng/μl. Tällöin myös PCR:n tulisi onnistua ongelmitta ja näyte saada vietyä sekvensointiin asti. Näytteen lähtömateriaalia ei saa olla liikaa, sillä muuten DNA:n saanto on heikko. Lähtömateriaaliksi ei kelpaa liian prosessoitu kalavalmiste, jossa DNA on hajonnutta, esimerkkinä öljyyn säilytetty purkkikala.

Tässä opinnäytetyössä ei ollut mahdollista käyttää vertailtua referenssimateriaalia, joten tulosten oikeellisuutta ei voi virallisesti todentaa. Kun näytteenä käytettiin raakaa kalaa, jossa oli tallella lajille ominaiset tuntomerkit, voitiin tällaisen näytteen sekvensoinnin onnistumista ja oikean lajin tunnistamista pitää osoituksena menetelmän oikeellisuudesta. Toistettavuus voitiin määrittää rinnakkaisnäytteillä, mutta uusittavuudelle eri laboratorio-olosuhteissa ei ollut mahdollisuutta. Kuitenkin havaittiin, että näytteiden säilytyksessä toistuva sulatus-jääditys heikentää DNA:n saantoa, mikä johtuu lämpötilavaikutteisesta DNA:n hajoamisesta.

Työn tavoitteet saavutettiin mainiosti. Kelpo tulokset olivat melko odotettavissa, sillä tarkoituksena oli lähinnä ottaa FDA:n valmiiksi validoima menetelmä käyttöön. DNA-viivakoodaus on menetelmänä helppokäyttöinen sekä nopea, ja se toimii. Valmiit tulokset saadaan muutamassa päivässä riippuen sekvensointipalvelun aikatauluista. Tässä

työssä saatujen tulosten pohjalta DNA-viivakoodaus-menetelmää voisi tulevaisuudessa lähteä soveltamaan kohti eläinperäisiä elintarvikkeita.

Lähteet

- 1 Galimberti, A., De Mattia, F., Losa, A., Bruni, I., Federici, S., Casiraghi, M., Martellos, S., Labra, M. 2013. DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Research International*. 30/2013, s. 55-63.
- 2 Rasmussen, R., Morrissey, M. 2007. DNA-Based Methods for the Identification of Commercial Fish and Seafood Species. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 7/2008, s. 280-295.
- 3 Di Pinto, A., Di Pinto, P., Terio, V., Bozzo, G., Bonerba, E., Ceci, E., Tantillo, G. 2013. DNA barcoding for detecting market substitution in salted cod fillets and battered cod chunks. *Food Chemistry*. 141/2013, s. 1757-1762.
- 4 Handy, S., Deeds, J., Ivanova, N., Hebert, P., Hanner, R., Ormos, A., Weigt, L., Moore, M., Yancy, H. 2011. A Single-Laboratory Validated Method for the Generation of DNA Barcodes for the Identification of Fish for Regulatory Compliance. *Journal of AOAC International Vol 94*. 1/2011, s. 201-210.
- 5 Ivanova, N., Zemlak, T., Hanner, R., Hebert, P. 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*. 7/2007, s. 544-548.
- 6 Ali, M., Gyulai, G., Hidvégi, N., Kerti, B., Al Hemaïd, F., Pandey, A., Lee, J. 2014. The changing epitome of species identification – DNA barcoding. *King Saud University Saudi Journal of Biological Sciences*. 21/2014, s. 204-231.
- 7 Handy et al. 2011. FDA SOP: DNA Barcodes for Fish Identification. <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodScienceResearch/UCM238026.pdf>. Luettu 4.5.2015.
- 8 Verkkodokumentti. <http://www.genome.jp/kegg/catalog/codes1.html>. Luettu 4.5.2015.
- 9 BOLD:in internetsivusto. <http://boldsystems.org/>. Luettu 6.5.2015.
- 10 iBOL:in internetsivusto. <http://ibol.org/>. Luettu 6.5.2015.
- 11 FinBOL:in internetsivusto. <http://www.finbol.org/fi/finbol.html>. Luettu 6.5.2015.
- 12 FishBOL:in internetsivusto. <http://www.fishbol.org/index.php>. Luettu 6.5.2015.
- 13 NCBI:n internetsivusto. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Luettu 6.5.2015.

- 14 Verkkodokumentti. DNeasy® Blood & Tissue Handbook 07/2006.
<https://www.giagen.com/fi/resources/resourcedetail?id=6b09dfb8-6319-464d-996c-79e8c7045a50&lang=en>. Luettu 22.5.2015.
- 15 Verkkodokumentti. <http://www.worthington-biochem.com/PROK/>. Luettu 22.5.2015.
- 16 Suominen, I., Pärssinen, R., Haajanen, K., Pelkonen, J. 2013. Geenitekniikka. 2. painos. Saarijärvi: Turun ammattikorkeakoulu.
- 17 Verkkodokumentti. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>. Luettu 9.10.2015.
- 18 Verkkodokumentti. <https://www.neb.com/products/n3231-100-bp-dna-ladder>. Luettu 9.10.2015.
- 19 Verkkodokumentti. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0701>. Luettu 9.10.2015.
- 20 Botti, S., Giuffra, E. 2010. Oligonucleotide indexing of DNA barcodes: identification of tuna and other scombrid species in food products. BMC Biotechnology. 2010 10:60.
- 21 Verkkodokumentti. <http://www.ryot.org/oceana-study-reveals-widespread-sea-food-fraud/83405>. Luettu 9.10.2015.
- 22 Verkkodokumentti. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0831>. Luettu 9.10.2015.
- 23 Verkkodokumentti. http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/sangerin_menetelma/2/. Luettu 9.10.2015.
- 24 Tirri, R., Lehtonen, J., Lemmetyinen, R., Pihakaski, S., Portin, P. 2001. Biologian sanakirja. Uudistetun laitoksen 1. painos. Keuruu: Otava.
- 25 Verkkodokumentti. http://www.affymetrix.com/catalog/131310/USB/ExoSAP-IT+For+PCR+Product+Cleanup#1_2. Luettu 28.10.2015.
- 26 Jaakola, L., Suokas, M., Häggman, H. 2010. Novel approaches based on DNA barcoding and high-resolution melting of amplicons for authenticity analyses of berry species. Food Chemistry. 123/2010, s. 494-500.
- 27 EN ISO 22118:2011 (E) -standardi "Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection and quantification of food-borne pathogens — Performance characteristics"

- 28 The Labelfish Consortium. 2014. Standard operating procedure for the genetic identification of fish species using DNA barcoding (mitochondrial cytochrome-c-oxidase I sequencing). <http://labelfish.eu/wp-content/uploads/Labelfish-SOP.pdf>. Luettu 4.5.2015.
- 29 Verkkodokumentti. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbimage.fcgi?uid=79398&type=1&unm=1>. Luettu 28.10.2015.
- 30 Verkkodokumentti. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=238833>. Luettu 28.10.2015.

1 (3)

Näyte	Tutkittava laji	Lajin nimi	DNA-eristys konsentraatio (ng/μl)	PCR ja geeliajo (+/-)	PCR-tuote puhdistus konsentraa- tio (ng/μl)	sekvensoinnin tulos	nimi suomeksi
Ahven	<i>Perca fluviatilis</i>	ahven	43,76	+	22,30	<i>Perca fluviatilis</i>	ahven
Kuha	<i>Sander lucioperca</i>	kuha	39,61	+	20,40	<i>Sander lucioperca</i>	kuha
Seiti	<i>Pollachius virens</i>	seiti	144,20	+	12,75	<i>Pollachius virens</i>	seiti
Hauki	<i>Esox lucius</i>	hauki	149,10	+	14,93	<i>Esox lucius</i>	hauki
Uunipaistettu silakka	<i>Clupea harengus membras</i>	silakka	96,71	+	16,57	<i>Clupea harengus</i>	silli
Muikku	<i>Coregonus albula</i>	muikku	62,14	+	15,98	<i>Coregonus albula</i>	muikku
Lohi	<i>Salmo salar</i>	lohi	111,37	+	22,60	-----	-----
Kirjolohi	<i>Oncorhynchus my- kiss</i>	kirjolohi	80,52	+	22,48	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	kirjolohi
Lämminsavukirjolohi	<i>Oncorhynchus my- kiss</i>	kirjolohi	53,07	+	14,92	-----	-----
Graavilohi	<i>Salmo salar</i>	lohi	126,00	+	25,57	-----	-----
Hirvi	<i>Alces alces</i>	hirvi	35,78	+	25,35	<i>Alces alces</i>	hirvi
Poro	<i>Rangifer tarandus</i>	poro	38,08	+	22,57	-----	-----
Broileri	<i>Gallus gallus do- mesticus</i>	kana	132,73	+	19,27	-----	-----
Kalkkuna	<i>Meleagris gallo- pavo</i>	kalkkuna	52,61	+	22,11	<i>Meleagris gallopavo</i>	kalkkuna
Lammas	<i>Ovis aries</i>	lammas	34,55	+	22,67	-----	-----
Sika	<i>Sus scrofa domes- tica</i>	sika	67,62	+	23,27	-----	-----
Nauta	<i>Bos taurus</i>	nauta	56,19	+	20,56	-----	-----

2 (3)

Näyte	Tutkittava laji	Lajin nimi	DNA-eristys konsentraatio (ng/μl)	PCR ja geelijaio (+/-)	PCR-tuote puhdistus konsentraa- tio (ng/μl)	sekvensoinnin tulos	nimi suomeksi
Lohikuutiot	<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	kyttyrälohi	122,37	+	17,33	<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	Kyttyrälohi
Kalakuutiot	<i>Theragra chalcogramma</i>	alaskanseiti	105,84	+	15,13	<i>Gadus chalcogrammus = Theragra chalcogramma</i>	Alaskanseiti
Kalakuutiot, toisto 1	<i>Theragra chalcogramma</i>	alaskanseiti	74,36	+	7,90	<i>Gadus chalcogrammus = Theragra chalcogramma</i>	Alaskanseiti
Kalakuutiot, toisto 2	<i>Theragra chalcogramma</i>	alaskanseiti	57,41	+	13,00	-----	-----
Turskafilee	<i>Gadus morhua</i>	turska	75,98	+	23,94	<i>Gadus morhua</i>	Turska
Turskafilee, toisto 1	<i>Gadus morhua</i>	turska	128,22	+	9,35	<i>Gadus morhua</i>	Turska
Turskafilee, toisto 2	<i>Gadus morhua</i>	turska	110,25	+	5,36	<i>Gadus morhua</i>	Turska
Matjessillifilee	<i>Clupea harengus</i>	silli	1,89	+	15,92	-----	-----
Savustettu muikku	<i>Coregonus albula</i>	muikku	79,52	+	23,43	-----	-----
Tonnikalasäilyke	<i>Thunnus tonggol</i>	tonnikala	8,25	-	-----	-----	-----
Tonnikalasäilyke 2	<i>Katsuwonus pelamis</i>	tonnikala	12,88	-	-----	-----	-----
Savusärkisäilyke	<i>Rutilus rutilus</i>	särki	5,87	-	-----	-----	-----
Kala eines	<i>Pollachius virens</i>	seiti	30,17	+	14,52	<i>Theragra chalcogramma = Gadus chalcogrammus</i>	Alaskanseiti
Kala eines, toisto 1	<i>Pollachius virens</i>	seiti	2,53	-----	-----	-----	-----
Kala eines, toisto 2	<i>Pollachius virens</i>	seiti	3,22	-----	-----	-----	-----

3 (3)

Näyte	Tutkittava laji	Lajin nimi	DNA-eristys konsentraatio (ng/μl)	PCR ja geelijaio (+/-)	PCR-tuote puhdistus konsentraa- tio (ng/μl)	sekvensoinnin tulos	nimi suomeksi
Kalapihvi eines	<i>Gadus morhua</i>	turska	38,48	+	13,06	<i>Merluccius productus</i>	Pohjois-Tyy- nenmeren kummeliturska
Kalapihvi eines, toisto 1	<i>Gadus morhua</i>	turska	27,99	+	10,66	<i>Merluccius productus</i>	Pohjois-Tyy- nenmeren kummeliturska
Kalapihvi eines, toisto 2	<i>Gadus morhua</i>	turska	14,03	+	10,27	<i>Merluccius productus</i>	Pohjois-Tyy- nenmeren kummeliturska
Mantelikala	<i>Theragra chal- cogramma</i>	alaskanseiti	202,46	+	15,21	<i>Gadus chalcogram- mus = Theragra chal- cogramma</i>	Alaskanseiti
Kala valmisateria	<i>Macruronus nova- ezelandiae</i>	hoki (=sini- hoki)	68,03	+	10,37	<i>Gadus chalcogram- mus = Theragra chal- cogramma</i>	Alaskanseiti
Leivitetty hietakam- pela	<i>Limanda aspera</i>	hietakam- pela	110,18	+	13,74	<i>Limanda aspera</i>	hietakampela
Sitruunaleikkeet	<i>Argentina silus</i>	kultakuore	42,22	+	10,58	<i>Argentina silus</i>	kultakuore
Lohikeitto	<i>Salmo salar</i>	lohi	66,05	+	15,33	-----	-----