

Методики контроля качества продукции

УДК 637:637.068:57.088.3

МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ ДНК-ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИДОВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ЖИВОТНОВОДЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ

Е.Н. КОНОВАЛОВА, Е.А. ГЛАДЫРЬ, Н.А. ЗИНОВЬЕВА

На основе мультиплексной ПЦР разработана тест-система, позволяющая одновременно идентифицировать ДНК свиньи (*Sus scrofa*), коровы (*Bos taurus*) и курицы (*Gallus gallus*) в объединенных пробах измельченной мышечной ткани. Показана высокая чувствительность и специфичность определения видового происхождения компонентов, входящих в состав таких смешанных проб, с использованием предложенного метода (эффективность обнаружения видоспецифической ДНК в образцах материала от животных соответствующего вида и в объединенных пробах практически не различалась). Продемонстрирована возможность использования разработанной тест-системы для оценки происхождения различных пищевых продуктов, в том числе прошедших термическую обработку (коровье молоко, творог, отварная говядина, паштет из говяжьей печени, говяжий и куриный бульон, сырья свинины, смесь говяжьего и свиного фарша, запеченная и копченая курица, сыр, колбаса).

Ключевые слова: идентификация видовой принадлежности, митохондриальная ДНК, мультиплексная ПЦР, продукты животного происхождения.

Keywords: species origin identification, mitochondrial DNA, multiplex PCR, meat products.

Ветеринарно-санитарная оценка необходима для обеспечения качества животноводческой продукции и охраны здоровья населения (1, 2). К критериям качества относится, в частности, наличие фальсифицирующих примесей. Наиболее распространенный способ фальсификации продуктов переработки мяса — замена одного вида другим, менее ценным в пищевом отношении. При оценке происхождения животноводческой продукции применяют различные аналитические методы, включая масс-спектрометрию актина, гемоглобина, миоглобина и альбумина для выявления видоспецифических различий, фракционное разделение экстрактов мышечной ткани посредством газовой хроматографии, иммунодиффузию (3, 4) и др. Однако перечисленные приемы имеют ограничения при идентификации продуктов переработки, когда происходит разрушение структуры тканей и/или деградация белков. В отличие от белков ДНК более устойчива, и ее информативность как критерия видоспецифичности не изменяется под воздействием температурных или механических факторов. Вследствие этого для определения видового происхождения и сырьевого состава продукции был предложен метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) как наиболее чувствительный и специфичный (5-8). В то же время актуальными остаются задачи оптимизации методов и тест-систем применительно к различным образцам сырья и продуктов.

В филогенетических и арбитражных исследованиях широкое применение находит использование консервативных участков гена цитохрома b (*cyt b*) в качестве матрицы при ПЦР, однако существующие тест-системы основаны главным образом на симплексном анализе материала, полученного от особей одного вида (9). Относительно недавно появились данные зарубежных исследователей, описывающих возможность использования мультиплексной ПЦР для идентификации материала от нескольких видов лабораторных животных одновременно (10). В перспективе применение подобного подхода может существенно снизить затраты реагентов и времени анализа, что уменьшит его себестоимость.

Наша цель заключалась в разработке мультиплексной тест-системы

для одновременной идентификации ДНК крупного рогатого скота, свиньи и курицы в животноводческой продукции и продуктах ее переработки.

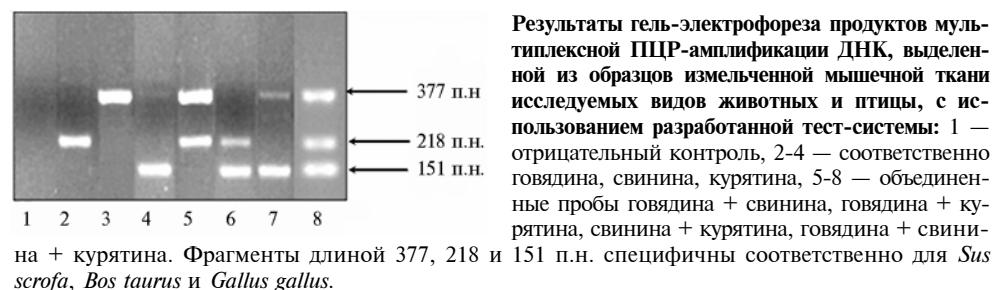
Описание методики. Чувствительность и специфичность разработанной тест-системы определяли с использованием образцов измельченной мышечной ткани разного состава (говядина, свинина, курятину, говядина + свинина, говядина + курятину, говядина + свинина + курятину). Для оценки универсальности предложенной тест-системы анализировали набор продуктов, приобретенных в городской торговой сети: коровье молоко, творог из коровьего молока, отварную говядину, паштет из говяжьей печени, говяжий и куриный бульон, сырную свинину, смесь говяжьего и свиного фарша, мясо курицы (запеченной, копченой), сыр, колбасу. Выделение ДНК из проб проводили с помощью набора реагентов Diatom™ DNA Prep100 (ООО «Лаборатория Изоген», Россия) согласно принятому протоколу производителя. Подбор олигонуклеотидных праймеров для амплификации ДНК трех видов животных (крупный рогатый скот, свинья и куры) подбирали с использованием Интернет-ресурса www.ncbi.nih.gov. Постановку ПЦР проводили в соответствии с методическими рекомендациями (11). Разделение продуктов амплификации осуществляли в 2 % агарозном геле в буфере TBE с добавлением бромистого димидия (3,8-диамино-5-метил-6-фенилфенантридиний) в конечной концентрации 1 мкг/мл.

Последовательности праймеров, выбранных для амплификации фрагмента гена *cyt b* видов *Bos taurus* (крупный рогатый скот), *Sus scrofa* (свинья) и *Gallus gallus* (курица) в составе разработанных тест-систем, приведены в таблице 1.

1. Краткая характеристика праймеров, использованных для ПЦР-амплификации фрагмента гена цитохрома b коровы, свиньи и курицы

Вид животного	Праймер	Нуклеотидная последовательность 5'→3'	Длина фрагмента, п.н.
<i>Bos taurus</i>	Bos_1	ATTCCTCCACGAAACAGGCTCC	218
	Bos_2	TATCACTGGGTTTGATGTGAGG	
<i>Sus scrofa</i>	Sus_1	ATTATCAACAACGCATTGACC	377
	Sus_2	TATTGTCCTCAGGGCAGGACG	
<i>Gallus gallus</i>	Gal_1	ATAGCCACCGCCTTGTGGGC	151
	Gal_2	TTGGTTGTCGACTGAAAATCCC	

Проведенные нами исследования позволили определить оптимальный состав реакционной смеси: конечный объем — 10 мкл в ПЦР-буфере, содержащем 16,6 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 67,0 мМ Трис-ХCl (рН = 8,8), 1,5 мМ MgCl₂ и 0,01 % Твин 20, с добавлением 200 мкМ каждого из четырех дНТФ, по 2 пкмоль праймеров Bos_1, Bos_2, по 9 пкмоль праймеров Sus_1, Sus_2, по 1,5 пкмоль праймеров Gal_1, Gal_2, 1 Ед. Таq-полимеразы («Диалат Лтд.», г. Москва). После начальной денатурации при 94 °С в течение 3 мин выполняли 35 циклов амплификации в следующем температурно-временном режиме: 94 °С — 45 с, 70 °С — 30 с, 72 °С — 40 с. По завершении осуществляли дополнительную элонгацию при 72 °С в течение 4 мин.



При анализе образцов мышечной ткани исследуемых видов животных и птицы были идентифицированы специфические фрагменты, соот-

ветствующие видовому составу продукта (рис.).

Предложенная тест-система оказалась пригодна для анализа продуктов, лишенных морфологических и анатомических видовых особенностей (измельченное сырье), а также прошедших термическую обработку (табл. 2).

2. Выявление видоспецифических фрагментов ДНК с помощью мультиплексной ПЦР-амплификации в пробах различных пищевых продуктов

Вид продукта	377 п.н. (<i>Sus scrofa</i>)	218 п.н. (<i>Bos taurus</i>)	151 п.н. (<i>Gallus gallus</i>)
Молоко	-	+	-
Творог	-	+	-
Говядина отварная	-	+	-
Паштет печеночный говяжий	-	+	-
Запеканка	-	+	-
Суп на говяжьем бульоне	-	+	-
Свинина натуральная	+	-	-
Фарш (свинина + говядина)	+	+	-
Курица запеченная	-	-	+
Курица копченая	-	-	+

П р и м е ч а н и е. «+» и «-» — соответственно наличие и отсутствие фрагмента.

Таким образом, предложенная нами тест-система позволяет одновременно детектировать ДНК трех видов животных — *Sus scrofa*, *Bos taurus* и *Gallus gallus*. С помощью этого метода можно определять видовое происхождение как натуральных, так и переработанных продуктов с существенным сокращением затрат времени и реагентов. Все это делает описанную тест-систему полезным инструментом для идентификации животного сырья, а также выявления фальсификации пищевых продуктов и, возможно, кормов.

Л И Т Е Р А Т У Р А

- Б у р к и н А.А., К о н о н е н к о Г.П., Б у р к и н М.А. Методы санитарного контроля животноводческой продукции. Сообщение I. Иммуноферментный анализ тетраклинов. С.-х. биол., 2010, 4: 110-117.
- К о н о н е н к о Г.П., Б у р к и н А.А. Методы санитарного контроля животноводческой продукции. Сообщение II. Иммуноферментный анализ бацитрата. С.-х. биол., 2010, 6: 88-93.
- P o n c e - A l c u i c i r a E., T a y l o r A. Extraction and ESI-CID-Ms/Ms analysis of myoglobins from different meat species. Food Sci. Techn. Tod., 2000, 69, 1: 81-86.
- Ч е р н я е в а М.Н. Анализ видовой принадлежности мяса и мясопродуктов. Ветеринария, 2001, 6: 47-50.
- R o g e r s N.L., C o l e S.A., L a n H.C., C r o s s a A., D e m e r a t h E.W. New saliva DNA collection method compared to buccal cell collection techniques for epidemiological studies. Am. J. Hum. Biol., 2007, 19: 319-326.
- S m i t h L.M., B u r g o u n e L.A. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA(R) databasing paper. BMC Ecol., 2004, 4: 4-14.
- W o l f C., R e n t s c h J., H u b n e r P. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. J. Agric. Food Chem., 1999, 47: 1350-1355.
- N s u b u g a A.M., R o b b i n s M.M., R o e d e r A.D. e.a. Factors affecting the amount of genomic DNA extracted from ape faeces and the identification of an improved sample storage method. Mol. Ecol., 2004, 13: 2089-2094.
- P a r s o n W., P e g o r a g o K., N i e d e r s t ä t t e r H., F ö g e r M., S t e i n l e c h n e r M. Species identification by means of the cytochrome b gene. Int. J. Legal Med., 114(1-2): 23-28.
- O n o K., S a t o h M., Y o s h i d a T., O z a w a Y., K o n a g a A., T a k e u c h i M., M i z u s a w a H., S a w a d a H. Species identification of animal cells by nested PCR targeted to mitochondrial DNA. In Vitro Cell. Dev. Biol.—Animal, 2007, 43: 168-175.
- З и н о в'е в а Н.А., П о п о в А.Н., Э р н с т Л.К., М а р з а н о в Н.С., Б о ч к а р е в В.В., С т р е к о з о в Н.И., Б р е м Г. Методические рекомендации по использованию метода полимеразной цепной реакции в животноводстве. Дубровицы, 1998.

ГНУ Всероссийский НИИ животноводства
Россельхозакадемии,
142132 Московская обл., Подольский р-н, пос. Дубровицы,
e-mail: konoval-elena@yandex.ru

Поступила в редакцию
3 октября 2011 года

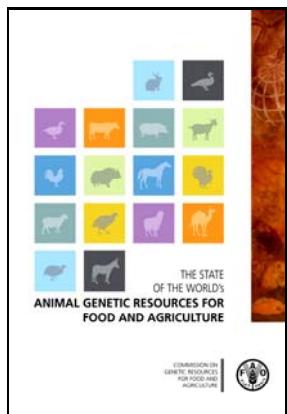
MULTIPLEX DNA IDENTIFICATION OF SPECIES ORIGIN OF MEAT PRODUCTS

E.N. Konovalova, E.A. Gladyr', N.A. Zinovieva

Summary

The test-system based on multiplex PCR applied for simultaneous identification of pig (*Sus scrofa*), cow (*Bos taurus*) and chicken (*Gallus gallus*) DNA in milled muscle tissue samples was developed. The high sensitivity and specificity of species origin determination of components in structure of mixed samples using developed method was shown (the detection efficiency of species specific DNA in animal samples of the relevant species and in mixed samples was similar). The application of developed test-system for origin identification of different food products including heat treated products (cow milk, cottage cheese, boiled beef, beef liver paste, beef and chicken bouillon, raw pork, beef and pork minced meat mixture, baked and bloated chicken, cheese and sausage) was shown.

Вниманию читателей! Вышла в свет книга:



Состояние всемирных генетических ресурсов животных в сфере продовольствия и сельского хозяйства. Пер. с англ. ФАО, 2010; М.: ВИЖ РАСХН, 2010, 512 с. [FAO, 2007. The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture /Barbara Rischkowsky & Dafydd Pilling (eds.), Rome].

Издано Продовольственной и сельскохозяйственной организацией Объединенных Наций (ФАО) и Всероссийским НИИ животноводства Россельхозакадемии. Настоящее издание представляет собой первую попытку глобальной оценки состояния и тенденций, происходящих с генетическими ресурсами животных, а также организации структурной и технологической базы управления этими ресурсами. Это обеспечивает основу для возобновления действий, гарантирующих реализацию намеченных шагов по улучшению управления генетическими ресурсами, объявленных на Мировом форуме по выработке планов действий в области продовольствия (World Food Summit Plan of Action). Оно также является определенным достижением в работе Комиссии по генетическим ресурсам для продовольствия и сельского хозяйства. Книга включает разделы «Состояние сельскохозяйственного биоразнообразия в секторе животноводства» (происхождение и формирование разнообразия домашних животных, статус генетических ресурсов животных, потоки генетических ресурсов животных, значение и использование генетических ресурсов животных, генетические ресурсы животных и их резистентность к заболеваниям, угрозы существующему генетическому разнообразию животных), «Направления в секторе животноводства» (движущие силы изменений в животноводстве, реакции животноводческого сектора, значение изменений в секторе животноводства для генетического разнообразия), «Возможности управления генетическими ресурсами животных» (организации и заинтересованные стороны, структурированные селекционные программы, программы сохранения, репродуктивные и молекулярные биотехнологии, законодательство и нормативно-правовое регулирование), «Современное состояние управления генетическими ресурсами животных» (основные понятия, методы описания, молекулярные маркеры — инструмент исследования генетического разнообразия, методы генетического улучшения для поддержания устойчивого использования генетических ресурсов животных, методы экономической оценки, методы сохранения, приоритеты исследований), «Необходимость и задачи управления генетическими ресурсами животных» (сведения о генетическом разнообразии животных: концепции, методы и технологии, возможности управления генетическими ресурсами животных, основные проблемы развития животноводства и управления генетическими ресурсами животных, принятие всеобщей ответственности).

Новые книги

Климов А.Ф., Акаевский А.И.
Анатомия домашних животных. 8-е изд. М.:
изд-во «Лань», 2011, 1040 с.

Учебник выдержал несколько переизданий и длительное время оставался единственным руководством для ветеринарных высших учебных заведений. Посмертные издания учебника были подготовлены соавтором А.Ф. Климова профессором А. И. Ака-

евским. Разделы «Система органов крово- и лимфообращения», главы «Нервная система» и «Система органов чувств» написаны профессором А.И. Акаевским. Настоящее репринтное издание этого учебного пособия свидетельствует о том, что книга до сих пор не утратила своей актуальности и является фундаментальной работой в области анатомии домашних животных.