
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ИЗОЭЛЕКТРОФОКУСИРОВАНИЯ ПРИ ИДЕНТИФИКАЦИИ СЫРЬЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

М.С. Астапова

Всероссийский научно-исследовательский институт
ветеринарной санитарии, гигиены и экологии
Московский государственный университет
прикладной биотехнологии
Звенигородское ш., 5, Москва, Россия, 123022

В статье приведены результаты исследований по идентификации видовой принадлежности сырья животного происхождения с использованием метода изоэлектрофокусирования. Данный метод позволяет с высокой точностью идентифицировать видовую принадлежность белков животного происхождения. Экстракты из мышц животных различных видов после электрофоретического разделения имеют различные белковые спектры, на которых присутствуют белковые зоны, общие для различных видов, а также белковые зоны, характерные только для определенных видов животных — видоспецифические белки. По этим белковым зонам (маркерные зоны) можно проводить идентификацию мяса животных различных видов.

Ключевые слова: идентификация, видовая принадлежность, изоэлектрофокусирование, саркоплазматические белки, фракционный состав, маркерные зоны.

Глобализация торговли сырьем и продуктами животного происхождения превратила постоянно возникающие вопросы в области безопасности этой продукции в серьезную международную проблему. Усиление зависимости от импорта сельскохозяйственной продукции создает большую угрозу не только для продовольственной, но и для других аспектов национальной безопасности России. Возрастающие с каждым годом объемы и темпы оборота в торговле животноводческой продукцией создают принципиально новые проблемы в области ветеринарно-санитарной безопасности [2].

За последние годы ассортимент и объемы реализации мяса в России значительно выросли. На рынке мяса, пользующегося стабильным спросом у потребителя, представлены различные его виды, и покупателю иногда трудно выбрать качественный продукт из этого многообразия. Если раньше мясо было менее доступно рядовому потребителю, то теперь его выбор достаточно большой, поэтому у производителей и продавцов возникает соблазн подделать или увеличить объемы своей реализации путем фальсификации продукции различными способами [3].

При дороговизне мяса встречаются случаи подмены (фальсификации) мяса животных одного вида другим, менее ценным, например, говядины — кониной, оленины — бараниной и т.п. Особенно это характерно для фаршевых смесей и других полуфабрикатов. В некоторых случаях разобраться в обмане бывает довольно легко, в других же, наоборот, почти невозможно. Случается, что доброкачественное по внешнему виду покупаемое мясо при кулинарной обработке обладает неприятным запахом и привкусом, что может обуславливать-

ся тем, что продавцы подменяют традиционные виды мяса, предназначенного для реализации, на мясо половозрелых некастрированных особей. Особенностью данной фальсификации является то, что в большинстве случаев охлажденное и замороженное мясо не имеет запаха, который появляется позже, после тепловой обработки [4].

Все продукты, поступающие на потребительский рынок, проходят проверку на безопасность и подтверждение соответствия. Идентификация продуктов является одним из главных элементов подтверждения соответствия. Цель подобной идентификации — определить и подтвердить подлинность конкретного вида и наименования товара, а также соответствие определенным требованиям или информации, указанной в товарно-сопроводительных документах или на этикетках [2].

В развитых странах мира на вооружение специализированных лабораторий, осуществляющих санитарный контроль мясопродуктов, начиная с 80-х годов нашего столетия стали поступать самые разнообразные методы определения видовой принадлежности мяса. В настоящее время разработан ряд приемов и способов для идентификации мяса различных животных. Однако одни из них требуют для своего выполнения дорогостоящей аппаратуры; другие, хотя и не сложны, но не всегда применимы; третьи, наоборот, чрезвычайно трудны по своей технике, требуют больших затрат времени и средств. Применение химических, физико-химических и биохимических методов позволяет получить только часть необходимой информации о качестве мяса и мясопродуктов.

Проблема видовой идентификации успешно решается с помощью современных электрофоретических методов (SDS-электрофорез и изоэлектрофокусирование). Эти методы давно используют в научных исследованиях. Однако для применения их в целях экспертизы пищевых продуктов и внедрения в практику экспертных лабораторий необходима разработка и стандартизация оптимальных условий экстракции белков из нативных и подвергнутых тепловой обработке продуктов, использование определенных видов гелей, разработка условий проведения процесса электрофореза и, в частности, метода изоэлектрофокусирования. Это направление весьма перспективно в практике ветеринарной санитарии и экспертизы и дает возможность наиболее качественного анализа продуктов питания. Решение этой проблемы имеет научное и практическое значение [1; 5].

Цель настоящей работы — разработка методов идентификации нативных образцов мышечной ткани на основе разновидности метода электрофореза — изоэлектрофокусирования (IEF). Метод основан на различиях в изоэлектрических точках белков в градиенте pH. В изоэлектрической точке молекула белка имеет суммарный нулевой заряд. Для электрофоретического разделения белков используют крахмальные, агарозные или полиакриламидные (ПААГ) гели. Заряженная молекула белка движется в направлении своей изоэлектрической точки (ИЭТ), при этом ее суммарный заряд постоянно уменьшается. Достигнув ИЭТ, молекула останавливается и не может сместиться под действием сил диффузии ни в одну, ни в другую сторону от нее, т.к. заряд в этой точке нейтрален. Таким

образом, электрическое поле как бы «разносит» белковую смесь по соответствующим ИЭТ, т.е. фокусирует белки в этих точках, сжимая их в очень узкие зоны [5].

В работе были поставлены следующие задачи:

— разработать оптимальные способы экстракции белков из нативных образцов мышечной ткани для последующего анализа их методом изоэлектрофокусирования;

— разработать методику видовой идентификации по выявлению видоспецифических маркерных белковых зон на электрофоретических спектрах;

— выявить различия фракционного состава белков животных различных видов в зависимости от пола.

В настоящей работе исследованы саркоплазматические белки мышечной ткани животных следующих видов (возраст животных 1 год):

— крупный рогатый скот (бычок, телка);

— мелкий рогатый скот (баран, овца);

— свиньи (боров, свинья).

Было исследовано 15 образцов мышечной ткани. Образцы для исследования отбирали из различных хозяйств Московской области в период с 10 по 25 ноября 2008 г. Образцы были взяты из различных отрубов, полученных при разделке комбинированным способом, предложенным ВНИИМПом (грудореберный, тазобедренный и спинно-поясничный отрубы). Все полученные образцы хранили при одинаковых температурно-влажностных режимах, что позволило исключить влияние условий хранения на достоверность проводимого исследования.

Анализ белкового состава проводили методом изоэлектрофокусирования с использованием автоматизированной системы PhastSistem на различных видах полиакриламидных гелей.

Белки саркоплазмы составляют 35% общего белка мышечной ткани и представляют собой наиболее стабильный компонент белковой системы. Саркоплазматические белки в большинстве своем экстрагируются водой.

Пробоподготовку проводили следующим образом.

Нативные образцы тщательно измельчали и отбирали навески по 1 гр. Экстракцию белков из образцов проводили охлажденной до +4 °С дистиллированной водой объемом 2 мл с последующим измельчением на гомогенизаторе Ultra Turrax при 22 000 мин⁻¹ в течение 1 мин. Полученные гомогенаты центрифугировали при 3000 мин⁻¹ в течение 3 мин. Отбирали 500 мкл супернатанта и центрифугировали при 13 000 мин⁻¹ в течение 10 мин. Центрифугаты использовали для получения растворов различной концентрации. Образцы наносили на гребенку с шестью ячейками по 3,5 мкл. Использование гребенки с большим числом ячеек усложняет количественную обработку результатов.

Для разделения белков использовали готовые гели PhastGelTM, содержащие амфолиты с различным градиентом pH — гели с градиентом pH 3,0—9,0 и с градиентом pH 5,0—8,0. Для большинства видов мяса и рыбы могут быть использованы полиакриламидные гели с широким градиентом pH — 3,0—9,0 — с последующим окрашиванием Кумасси голубым, поэтому все образцы первоначально

разделяли на гелях с градиентом рН 3,0—9,0. Однако для дальнейшей работы предпочтение было отдано гелям с градиентом рН 5,0—8,0, поскольку именно при этих значениях разрешение белков в центральной части геля было наиболее информативным.

Метод изоэлектрофокусирования заключается в разделении белков в соответствии с их зарядом и состоит из трех этапов.

Первый — подготовительный — охлаждение гелей до +15 °С, что предотвращает денатурацию белков в ходе анализа. Разделение белков происходит при напряжении 2000 В, мощности 3,5 Вт и температуре 15 °С в течении 75 В/ч (примерно 8 минут идет охлаждение гелей до +15 °С).

На втором этапе анализа происходит опускание каретки прибора PhastSistem на гель. Данный этап характеризуется резким падением напряжения, что позволяет ввести образцы в гель и сконцентрировать их в четко ограниченной зоне при кратковременном уменьшении напряженности электрического поля до 200 В в течение 15 В/ч.

Третий — разделение при напряжении 2000 В, мощности 3,5 Вт и температуре 15 °С.

После разделения образцов проводили окрашивание геля. На приборе PhastSistem окрашивание происходит автоматически в специальной камере. Вначале белки фиксируют в 20%-м растворе трихлоруксусной кислоты (ТХУ) при 20 °С в течении 5 мин. Затем гель промывают раствором (промывной буфер), содержащим 30 мл концентрированной уксусной кислоты, 90 мл 96%-го этилового спирта, 180 мл дистиллированной воды при 20 °С в течении 2 мин. Далее гель окрашивают раствором красителя Кумасси R350, который позволяет окрашивать 5—10 нг белка на дорожке. Окрашивание проводили 0,02%-м раствором Кумасси в течение 10 мин. Вначале готовили 0,2%-й раствор Кумасси: 80 мл дистиллированной воды + 1 таблетка красителя Кумасси R350 + 120 мл 96%-го этилового спирта. Далее из этого раствора готовили 0,02% раствор: 10 мл 0,2% раствора + 90 мл промывного буфера. Затем гель дважды отмывали промывным буфером при 50 °С в течение 10 мин. Для хранения гелей на заключительном этапе их обрабатывали закрепляющим буфером, содержащим 4 г глицерина, 4 мл уксусной кислоты и 92 мл дистиллированной воды.

Результаты исследований. Экстракты из мышц животных различных видов после электрофоретического разделения имеют различные белковые спектры, на которых присутствуют белковые зоны, общие для различных видов, а также белковые зоны, характерные только для определенных видов животных — видоспецифические белки.

Результаты проведенного исследования выявили наличие видоспецифических маркерных белковых зон, характерных для белков животных различных видов. Именно по этим белковым зонам (маркерные зоны) можно проводить идентификацию мяса различных видов животных, что в дальнейшей перспективе может привести к созданию коллекции электрофореграмм фракционного состава белков мышечной ткани различных видов животных (рис. 1, 2).

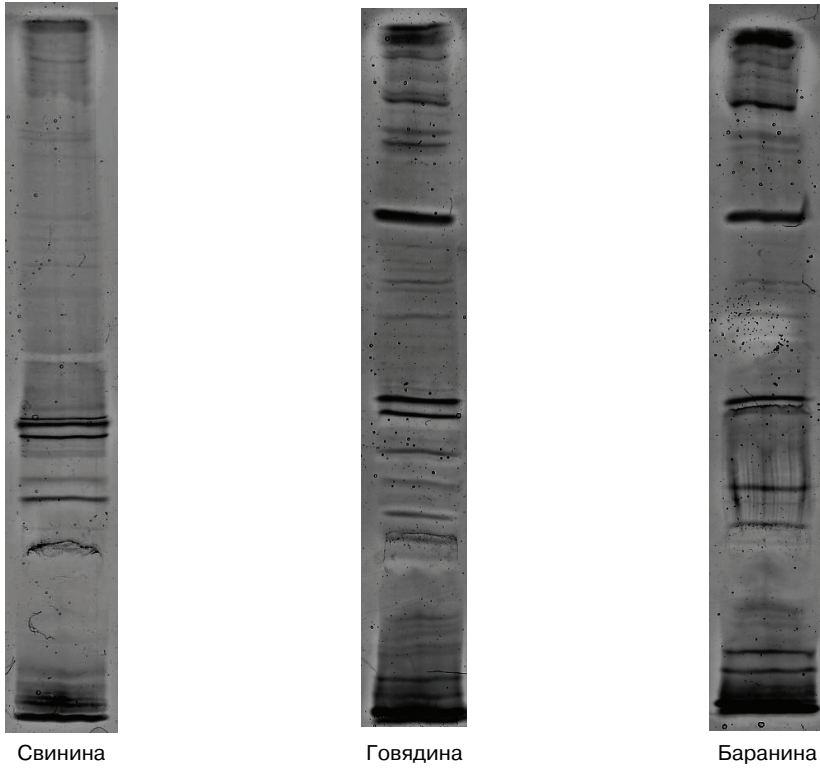


Рис. 1. Электрофореграммы фракционного состава саркоплазматических белков мышечной ткани животных различных видов на гелях с градиентом pH 5,0—8,0

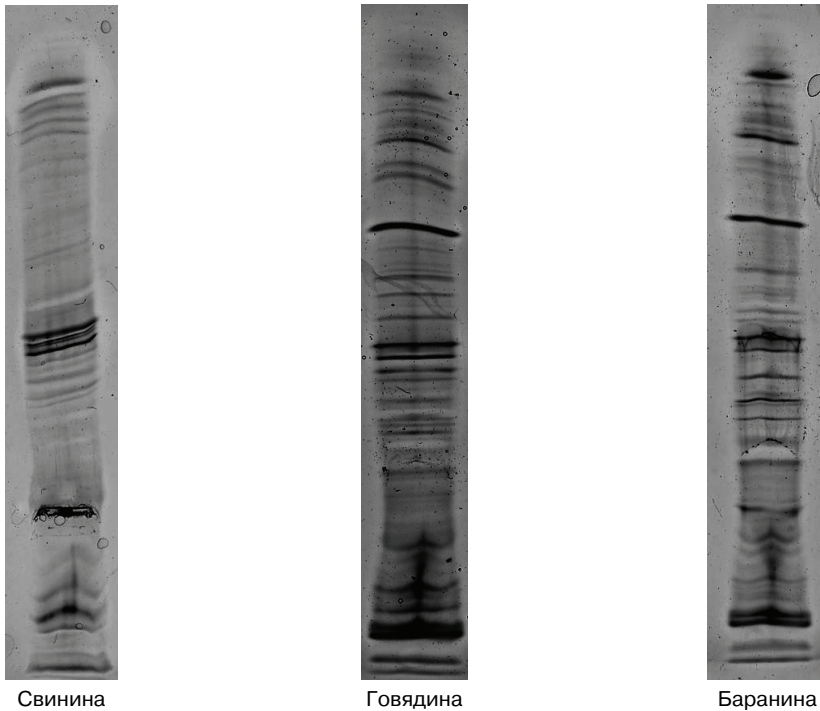


Рис. 2. Электрофореграммы фракционного состава саркоплазматических белков мышечной ткани животных различных видов на гелях с градиентом pH 3,0—9,0

Нами также установлено различие в видоспецифических зонах в минорных фракциях саркоплазматических белков мышечной ткани в зависимости от пола животного. Однако основные фракции, расположенные в центральной части геля, оказались характерными для обоих полов (рис. 3).

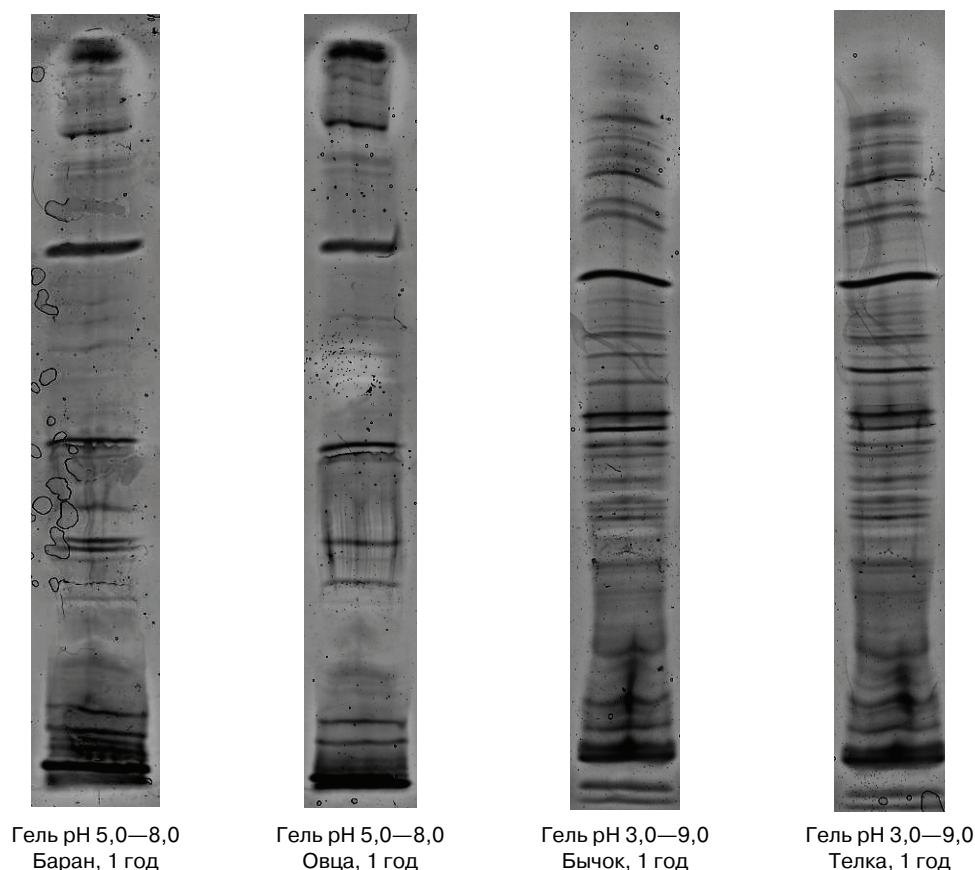


Рис.3. Электрофореграммы фракционного состава саркоплазматических белков мышечной ткани животных различных видов в зависимости от пола на гелях с градиентом рН 3,0—9,0 и 5,0—8,0

Полученные электрофореграммы были подвергнуты денситометрии с использованием лазерного сканирующего денситометра Epson Perfection 3200. Данный метод позволяет путем наложения спектров стандартных и исследуемых образцов мышечной ткани получить более информативный результат по выявлению различий во фракционном составе саркоплазматических белков мышечной ткани в зависимости от вида животного (рис. 4, 5).

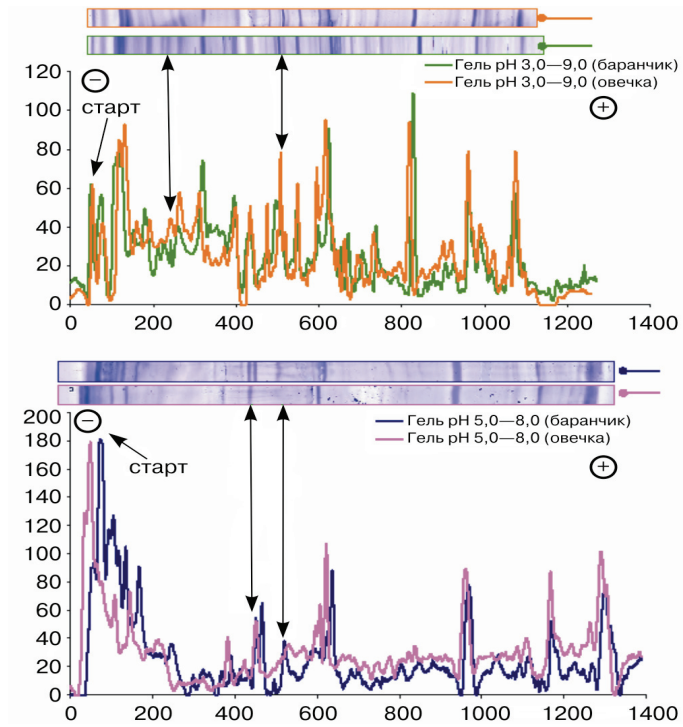


Рис. 4. Денситограмма фракционного состава белков баранины в зависимости от пола животного по оси X — концентрация, мг/мл; по оси Y — оптическая плотность, ед. плотности

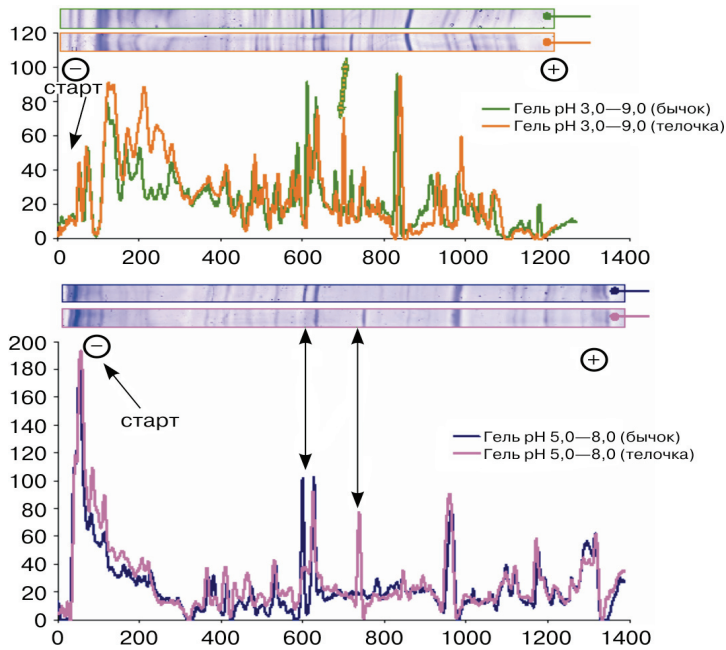


Рис. 5. Денситограмма фракционного состава белков говядины в зависимости от пола животного по оси X — концентрация, мг/мл; по оси Y — оптическая плотность, ед. плотности

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что метод изоэлектрофокусирования позволяет с высокой точностью идентифицировать видовую принадлежность белков животного происхождения и может быть успешно использован для видовой идентификации мяса, а в сочетании с методом SDS-электрофореза позволит расширить возможности ветеринарных и сертификационных лабораторий в определении видовой принадлежности поступающих на исследование как нативных образцов, так и продуктов, подвергнутых тепловой обработке.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Горожанина Е.С.* Разработка метода идентификации сырья и продуктов животного и растительного происхождения на основе SDS-электрофореза: Автореф. дисс. ... канд. ветеринарных наук. — М., 2007.
- [2] *Данкверт С.А.* Ветеринарный надзор и обеспечение продовольственной и пищевой безопасности России // *Ветеринария*. — 2008. — № 6. — С. 3—8.
- [3] *Леонова Т.Н., Юмашева Н.А.* Рынок мяса и мясопродуктов России // *Научно технический и производственный журнал «Все о мясе»*. — 2007. — № 2. — С. 3—9.
- [4] *Чернуха И.М.* Российский рынок мяса и мясных продуктов // *Новое мясное дело*. — 2007. — № 2. — С. 48—50.
- [5] *Yman I.M.* Meat and fish species identification by isoelectric focusing // *Food laboratory news*. — 1990. — V. 6. — № 2. — P. 28—31.

USING OF METHOD OF ISOELECTRIC FOCUSING FOR IDENTIFICATION OF RAW MATERIAL OF ANIMAL ORIGIN

M.S. Astapova

All-russian research institute of veterinary, sanitation, hygiene and ecology
Zvenigorodskoye highway, 5, Moscow, Russia, 123022

The results of researches on detecting a specific belonging the raw material of animal origin using of the method of isoelectric focusing are presented in the paper. This method allows with high exactness to identify specific belonging of albumens of animal origin. Extracts from the muscles of animal different species after an electrophoretic division have different albuminous spectrums which albuminous areas, general for different species, and also albuminous areas, characteristic only for the certain species of animals — typespecific albumens, are present on. Exactly on these albuminous areas (marker areas) it is possible to detect a specific belonging of meat of different species of animals.

Key words: identification, specific belonging, isoelectric focusing, sarcoplasmatic albumens, marker areas, fractious composition.