
ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАРАНИНЫ И КОЗЛЯТИНЫ НА ОСНОВЕ АМПЛИФИКАЦИИ ДНК

А.Н. Пермяков

Отдел технического регулирования, стандартизации и сертификации
Всероссийский научно-исследовательский институт
ветеринарной санитарии, гигиены и экологии
Звенигородское шоссе, 15, Москва, Россия, 123022

На основе амплификации с последующей гибридизацией идентифицирована видоспецифичная ДНК баранины и козлятины в продовольственном сырье, готовой пищевой продукции. Чувствительность тест-систем позволяла определять до 0,01% гомологичного продукта в смешанных фаршах. Разработана модифицированная методика, позволяющая оптимизировать пробоподготовку, сократив при этом в 2 раза количество этапов пробоподготовки и исключив использование дорогостоящих препаратов К протеиназы, а для сырых продуктов и хроматографических колонок. Проведены исследования по валидации ПЦР тест-систем SureFood в режиме «реального времени» для идентификации баранины, козлятины и определения фальсифицирующих примесей.

Введение. Вступивший в силу 1 июля 2003 года Федеральный закон «О техническом регулировании» создал основу для проведения государственной реформы технического регулирования. Суть преобразований сводится к тому, чтобы на основе рационального сочетания свободного предпринимательства и государственного регулирования, гармонизации с международной практикой этой деятельности обеспечить безопасность продукции и повышение ее конкурентоспособности.

Реформа предопределяет необходимость гармонизации основных элементов технического регулирования, обеспечивающих безопасность и качество продукции: технических регламентов, стандартов, процедур подтверждения соответствия, аккредитации, контроля и надзора.

Одной из основных целей реформирования системы технического регулирования является повышение эффективности защиты рынка от опасной продукции. Для этого необходимо внедрение стандартов оценки безопасности и качества продуктов, отвечающих международным критериям.

Одним из основных критериев подтверждения соответствия продукции, согласно Федеральному закону «О техническом регулировании», является ее идентификация.

Идентификация продукции способствует исключению из торговли недоброкачественной и фальсифицированной продукции, представляющей серьезную угрозу для здоровья населения.

Идентификация сырья и продуктов животного происхождения является важным элементом в системе Государственного ветеринарного надзора. Актуальное значение при этом имеют такие критерии, как определение видовой принадлежности мяса и рыбы, определение видового состава мясных и рыбных продуктов и определение фальсифицирующих примесей, в частности, определение примесей из генетически модифицированных источников.

Известны различные методы идентификации продуктов животного происхождения; они основаны на электрофоретическом анализе белков, биохимических, гистологических исследованиях.

Наиболее перспективными в плане определения видовой принадлежности мяса и мясопродуктов являются иммунологические методы и методы ДНК-диагностики.

Методы ДНК-диагностики представляют собой весьма чувствительные и специфичные способы идентификации продуктов животного происхождения. Они позволяют проводить анализ термообработанных образцов.

Тест-системы на основе иммунологического анализа просты в исполнении, экспрессны и специфичны.

В своей работе мы использовали тест-системы SureFood на основе амплификации с последующей гибридизацией, а также на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме «реального времени».

Производство этих наборов сертифицировано по международному стандарту ИСО-9001.

Методика. Набор SureFood дает возможность ускоренно и эффективно идентифицировать видоспецифичную ДНК в составе продовольственного сырья, кормов и готовой пищевой продукции посредством полимеразой цепной реакции (ПЦР), ДНК-гибридизации и детектирования гибридных молекул на основе иммуноферментного анализа (ИФА) (рис.).

Реакция амплификации проходит с неспецифическими праймерами, мечеными биотином. Полученные ампликоны со стрептавидином, иммобилизованном на планшетах, гибридизуются со специфическими ДНК-зондами. После реакции с конъюгатом, субстратом и красителем определяют результаты гибридизации по специфическому окрашиванию лунок с гибридными молекулами ПЦР в режиме «реального времени» проводили по разработанной программе, в автоматическом режиме, на амплификаторах с детекцией в режиме реального времени: «АНК-32», «АНК-16» производства ИАнП РАН, МГТУ им. Баумана, ЗАО «Синтол» (Россия) и «Cycler» производства Bio-Rad (США).

В качестве матрицы использовали выделенную и очищенную ДНК из термообработанных и нативных продуктов.

Компоненты ПЦР и флюоресцентную метку использовали на наборе SureFood.

Перед выполнением ПЦР рассчитывали количество реакций. Расчет производили по следующей формуле:

$$\text{Количество реакций} = 2 \text{ количества проб} + 4 \text{ контроля ПЦР.}$$

Маркировали необходимое количество пробирок для исследуемых образцов, также 2 пробирки для положительного контрольного образца (контроль эффективности ПЦР) и 2 пробирки для отрицательного контрольного образца (контроль контаминации).

Пример для 10 проб: $2 \times 10 \text{ проб} + 4 \text{ контроля ПЦР} = 22 \text{ реакции.}$

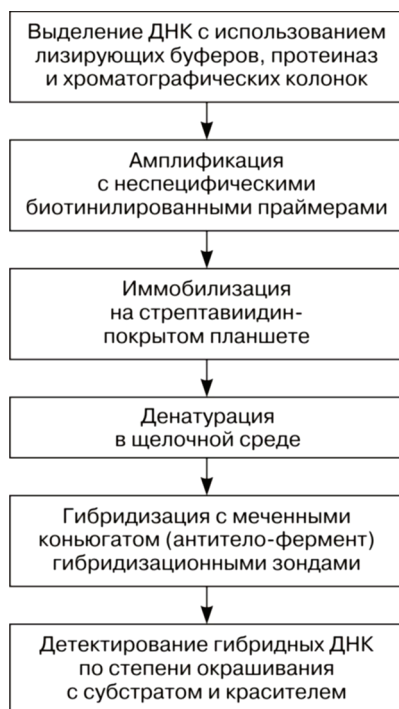


Рис. Схема идентификации козлятины и баранины с использованием тест-наборов SureFood

Из-за потерь реагентов, обычно возникающих при пипетировании, готовили смесь с 1 дополнительной реакцией на каждые 10 реакций и 4 дополнительно на каждые 50 реакций.

Реакцию проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей: смесь дезокси-нуклеотидтрифосфатов (дАТФ, дЦТФ, дГТФ и дТТФ — по 2,5 мМ каждого), 2,5 мкл реакционного буфера В, 3,5 мМ $MgCl_2$, по 1,7 пкМ прямого и обратного праймера, 2,5 ед. Taq-полимеразы и 2 мкл ДНК.

В пробирки вносили 2 мкл деионизированной воды в отрицательный контроль, 2 мкл ДНК исследуемых образцов и 2 мкл ДНК в положительный контроль. Данный порядок используется во избежание перекрестной контаминации. Режим амплификации при анализе представлен в табл. 1.

Таблица 1

Режим амплификации ДНК

Этап	Время	Температура, °С
Начальная денатурация	10 мин	95
Денатурация	20 сек	95
Отжиг/элонгация	50 сек	60
Выдержка	—	4

50 циклов

Результаты. В процессе исследований методом амплификации с последующей ДНК-гибридизацией во всех случаях были получены положительные результаты в гомологичных системах (ДНК-зонды — исследуемые ДНК одного и то-

го же вида животного). Реакция наблюдалась как в смешанных фаршах, так и в термообработанных продуктах. Чувствительность тест-систем позволяла определять до 0,01% гомологичного продукта в смешанных фаршах (табл. 2).

Таблица 2

Результаты идентификации баранины и козлятины

Источник выделения матричной ДНК	Результаты гибридизации со специфическими ДНК-зондами	
	ДНК-зонд на баранину	ДНК-зонд на козлятину
Сырая баранина	+	–
Сырая козлятина	–	+
Сырая свинина	–	–
Мясо кур	–	–
Мышечная ткань собаки	–	–
Вареная баранина	+	–
Вареная козлятина	–	+
Вареная свинина	–	–
Фарш баранина 5%, козлятина 95%	+	+
Фарш баранина 1%, козлятина 99%	+	+
Фарш баранина 0,5%, козлятина 99,5%	+	+
Фарш баранина 0,1%, козлятина 99,9%	+	+
Фарш козлятина 5%, говядина 95%	+	–
Фарш козлятина 1%, говядина 99%	+	–
Фарш козлятина 0,5%, говядина 99,5%	+	–
Фарш козлятина 0,1%, говядина 99,9%	+	–
Фарш козлятина 0,01%, говядина 99,09%	–	–

+ — положительная реакция
 – — отрицательная реакция

Тест-набор серии SureFood позволял с высокой чувствительностью и специфичностью проводить идентификацию баранины и козлятины. Однако методика пробоподготовки включала много этапов с использованием дорогостоящих препаратов протеиназы К и хроматографических колонок для очистки ДНК.

С целью оптимизации способа идентификации баранины и козлятины нами разработана методика на основе ДНК-гибридизации с модифицированной пробоподготовкой.

Для выделения ДНК использовали буфер, состоящий из 3% СТАВ, 1,4 М NaCl, 100 мМ TrisHCl до pH 8,0 и 20 мМ EDTA. СТАВ в более низких концентрациях применялся ранее для идентификации говядины.

1 г мяса или мясной продукции гомогенизировали с 10 мл нагретого до 65 °С СТАВ-буфера. Гомогенат инкубировали при температуре 65 °С в течение 20 мин. Остатки разрушенных тканей осаждали центрифугированием в течение 2 мин при 500 g. К супернатату добавляли равный объем хлороформа и встряхивали в течение 10 мин. Центрифугировали 5 мин при 500 g. Отбирали верхнюю водную фазу. К полученному объему раствора ДНК добавляли двойной объем охлажденного до 0 °С изопропанола и осаждали ДНК центрифугированием при 5000 g

в течение 10 мин, осадок ДНК подсушивали и растворяли в дистиллированной воде.

При анализе термообработанных продуктов проводили экстракцию ДНК с помощью СТАВ-буфера, однократную депротеинизацию изопропанолом и дальнейшую очистку ДНК, амплификацию, гибридизацию и детектирование гибридных молекул с компонентами набора SureFood.

Как показали исследования, выход ДНК по модифицированной методике был на уровне или несколько превышал количество ДНК, получаемое при использовании тест-системы SureFood. При этом соотношения оптических плотностей E 260/280 и E 260/230 равнялось соответственно 1,8 и 2, что свидетельствовало о достаточной очистке ДНК от белка и полисахаридов.

Результаты исследований показали возможность идентификации баранины и козлятины по модифицированной методике.

В процессе этого этапа исследований проведены испытания тест-систем Sure Food для идентификации баранины, козлятины, говядины, свинины на основе ПЦР в режиме реального времени.

Для подтверждения специфичности подобранных праймеров полученные продукты амплификации электрофоретически разделяли в 2% агарозном геле. В геле отсутствовали продукты неспецифичной амплификации и димеры праймеров. Полученные полосы ампликона были яркими и четкими. Все это свидетельствует об оптимально подобранных условиях амплификации и составе ПЦР смеси.

Перекрестных реакций между продуктами не наблюдалось.

Таким образом, на основании проведенных исследований усовершенствованы методики идентификации мяса и мясопродуктов и определения фальсифицирующих примесей.

Заключение. Методы на основе амплификации с последующей гибридизацией давали возможность проводить видовую дифференциацию баранины и козлятины в сырых и термообработанных продуктах. Разработанная модифицированная методика позволяет оптимизировать пробоподготовку при идентификации, сократив при этом в 2 раза количество этапов пробоподготовки и исключив использование дорогостоящих препаратов К протеиназы, а для сырых продуктов — и хроматографических колонок.

Методика на основе ПЦР позволяет проводить анализ в течение более короткого времени и идентифицировать баранину и козлятину, определяя при этом возможные фальсифицирующие примеси.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Светличкин В.В., Писарева В.М., Кононенко А.Б., Галкин А.В., Морозова Е.Н., Тихомирова Т.А., Маргиева С.А., Соколова Ю.Н. Видовая принадлежность мяса на основе ДНК-диагностики // Практик. — 2004. — № 3—4. — С. 30—33.
- [2] Светличкин В.В., Писарева В.М., Кононенко А.Б., Кузькин Б.П., Галкин А.В., Морозова Е.Н., Тихомирова Т.А., Маргиева С.А., Узунян Д.Г. Определение видовой принадлежности мяса и мясопродуктов на основе иммунодиффузии // Практик. — 2004. — № 7—8. — С. 28—31.

IDENTIFICATION MUTTON AND GOATMEATS ON THE BASIS OF THE AMPLIFICATION DNA

A.N. Permyakov

Department of the technical regulation, standardization and certification
All-Russian research institute of veterinary sanitation, hygiene and ecology
Zvenigorodskoe hwy, 15, Moscow, Russia, 123022

On the basis of the amplification followed by hybridization the specified DNA of mutton and goatmeats was identified in raw food stuffs as well as in ready meals. Sensitive test-systems have allowed to determine up to 0,01% of similar product in mixed minced meats. A new modified method was worked out which allows to optimize the pre-testing period and to reduce the amount of steps twice and costs as neither K protein nor chromatographic columns have been used for raw products. To identify mutton and goatmeats and to determine false additives the investigation of PCR test-systems Sure Food valuation was carried out in «real-time».