

2. Зайчик Б.Ц., Хуршудян С.А. Фальсификация пищевых продуктов в России история и современность // Пищевая промышленность. - 2009. – №8. -С. 22-25.
3. Курзина М.Н. Качество, безопасность, фальсификация мясной продукции // Пищевая промышленность. – 2006. № 4. - С. 75-76.
4. Лисицын А.Б., Веселова П.П. О техническом регулировании безопасности мяса и мясных продуктов // Мясная индустрия. 2004. - №11. -С. 28-30.1.1.
5. Методические рекомендации по определению видовой принадлежности клеточных культур методом полимеразой цепной реакции с детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ): утв. отделением ветеринарной медицины РАСХН 24.11.2008. М. – 19 с. автор: К.В. Кулешов

APPLICATION OF MOLECULAR GENETIC ANALYSIS FOR SPECIES IDENTIFICATION OF MEAT

Suldina E.V., Kolbasova O.L., Merchina S.V.

This work is devoted to species identification of four kinds of meat by the method of molecular-genetic analysis (polymerase chain reaction with electrophoretic detection). In conducting these studies, the authors found that the analyzed samples of the meat are fully consistent naming claimed producers (rabbit meat, pork, beef, lamb).

УДК 619:614.31:637

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ МЯСНОГО СЫРЬЯ В МЕЛКОИЗМЕЛЬЧЕННЫХ ПОЛУФАБРИКАТАХ И ГОТОВЫХ МЯСНЫХ ПРОДУКТАХ МЕТОДОМ ДНК-ДИАГНОСТИКИ

Сульдина Е.В., 5 курс, факультет ветеринарной медицины

Научные руководители: О.Л. Колбасова, к.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник ГНУ ВНИИВВиМ, С.В. Мерчина, к.б.н., доцент кафедры МВЭиВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА»

В условиях формирования в России рыночной экономики, увеличение объема частного производства и свободной торговли продовольственными товарами, в том числе сырьем, полуфабрикатами и готовыми мясными продуктами, обуславливает возможность фальсификации продукции, как по структуре, так и по видовой принадлежности сырьевых составляющих. Так, например, при производстве мясных продуктов могут быть использованы мясо не убойных животных, субпродукты или растительные добавки. Таким образом продукция, благополучная по микробиологическим и приемлемая по органолептическим и химическим показателям, может не соответствовать заявленному составу или иметь низкое качество [1].

В связи с этим актуальным становится вопрос о необходимости идентификации, как мяса, так и сырьевых компонентов мясных продуктов.

Выявление различных фальсификаций с помощью таких иммунологических методов исследования, как РА, РП, РИД и ИФА, не всегда достигает цели, так как эти методы не позволяют надежно выявить наличие подложного мяса, содержащегося в количестве менее 10-20% от общей массы продукта. Более того, указанные методы практически не пригодны для исследования мясного сырья близкородственных видов животных и мясных продуктов, прошедших термическую обработку выше 48-57°C [5].

Достаточно точными и надежными методами исследования мясного сырья, позволяющими провести еще и количественный анализ исследуемых компонентов продукта, оказались некоторые варианты иммуноферментного анализа (ELISA). Однако термическая обработка продуктов при 80°C в течение 30 мин, при 100°C - 20 мин, или 121°C - 10 мин, отрицательно влияет на чувствительность и специфичность данного метода и не позволяет выявлять в образцах примеси отдельных видов мяса в количестве менее 20%. Кроме того, с помощью ELISA оказалось невозможным дифференцировать мясо близкородственных видов животных и птицы, что снижает надежность применения данного метода [3].

Наиболее перспективными для определения видовой принадлежности тканей животного происхождения в составе мясного сырья и продуктов, в том числе подвергшихся термической обработке, являются методы ДНК-диагностики и, в особенности, метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). По сравнению с традиционными способами видовой детекции, установление видовой принадлежности мяса при помощи ПЦР отличается универсальностью, более глубоким уровнем видовой дифференциации, высокой воспроизводимостью и специфичностью [4].

В виду этого **целью** нашей работы являлось определение видовой принадлежности мясного сырья в мелкоизмельченных полуфабрикатах и готовых мясных продуктах методом полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией.

Для достижения указанной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Выделить нуклеиновые кислоты из исследуемых проб мясных продуктов.
2. Провести полимеразную цепную реакцию анализируемых образцов.
3. Провести электрофоретический анализ полученных ПЦР-продуктов.

Для начала работы нами было отобрано 5 видов мясных продуктов: колбаса «Сервелатная» (5), ветчина «Из отборной говядины» (6), сосиски «Молочные» традиционные (7), фарш «Халяль» (8), фарш «Свинина/Говядина» (9). В качестве контрольных образцов использовали кровь животных, находящихся в секторе подготовки подопытных животных ГНУ ВНИИВВиМ.

Из анализируемых проб готовили 10% суспензию. Для этого в керамической ступке с помощью пестика гомогенизировали 5 г пробы и 45 мл питательной среды. Однородности суспензии добивались добавлением стерильного песка.

Для выделения ДНК из образцов мясопродуктов была использована методика лизиса на основе гуанидинтиоционата с последующей нуклеосорбцией ДНК на силикагеле.

При постановке ПЦР, в качестве диагностических мишеней, нами были использованы: для идентификации крупного рогатого скота и овцы область гена *cytb*, для идентификации свиньи, кролика, собаки, кошки, и лошади область гена *COI*. К данным участкам генов митохондриальной ДНК уже имелись подобранные видоспецифические праймеры и зонды. В качестве внутреннего контроля исследуемого образца служил консервативный участок 18S рибосомальной ДНК, который высокогомологичен среди эукариот.

Для проведения ПЦР использовали программируемый термоциклер RotorGene 6000 (Corbett Research, Австралия). Постановку полимеразной цепной реакции проводили в микропробирках емкостью 0,2 мл [2].

Состав смеси для проведения ПЦР:

- бидистиллированная вода - 5,8 мкл
- 5X буфер для ПЦР - 5 мкл
- MgCl₂ (25 мМ) - 1 мкл
- dNTP (25 мМ) - 0,5 мкл
- Taq ДНК-полимераза - 0,2 мкл
- смесь праймеров и зонда (10 пкМ праймеров, 5 пкМ зонда) - 2,5 мкл
- ДНК - матрица - 10 мкл

Пробирки с готовой ПЦР-смесью встряхивали на смесителе, все капли со стенок осаждали центрифугированием в течение 5-10 сек.

Переносили пробы в амплификатор и проводили ПЦР при следующих температурных режимах:

- активация TaqF-полимеразы при 95⁰С - 5 мин
 - денатурация при 95⁰С- 20 сек;
 - отжиг при 60⁰С-20 сек.,
 - элонгация при 72⁰С – 20 сек.
 - денатурация при 95⁰С- 20 сек;
 - отжиг при 60⁰С-20 сек., учет сигнала
 - элонгация при 72⁰С - 20 сек.
- } I этап в течение 5 циклов
- } II этап - 35 циклов

Параллельно с исследуемыми образцами ставили отрицательный контрольный образец (с деионизованной водой). Смесь для контрольного образца готовили по той же прописи, что и для анализируемых образцов.

Учет результатов осуществляли отдельно по каждому из каналов, в соответствии с инструкцией к прибору.

Анализ ПЦР-продуктов реакции осуществляли при помощи электрофореза. Электрофоретическую оценку проводили в 2%-ном агарозном геле, для приготовления которого смешивали 2 г. агарозы и 100 мл ТАЕ-буфера. Смесь помещали в микроволновую печь и доводили до кипения. Далее, в слегка охлажденную смесь добавляли 10 мкл 0,001 % бромистого этидия и тщательно перемешивали. Гель разливали в форму и устанавливали гребенки. В образовавшиеся в застывшем геле лунки вносили по 10 мкл ПЦР продуктов и 7

мкл маркера молекулярной массы. Электрофорез проводили используя Трис-ацетатный буфер при напряжении 8 В/см длины геля в течение 40 минут.

Результаты электрофореза учитывали на трансиллюминаторе в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм. Амплифицированные фрагменты ДНК выявлялись в виде светящихся оранжевых полос в треках с исследуемыми образцами относительно фрагмента в пробе положительного контроля. Размеры исследуемых фрагментов ДНК вычисляли с помощью маркера молекулярной массы («Fermentas», Латвия). Сохранение полученных результатов проводили с помощью гель-документирующей системы «Biorad GelDoc XR» (Рис.1,2,3).

В ходе данной работы нам удалось выделить нуклеиновые кислоты из 5 видов различных мясных продуктов: колбаса «Сервелатная», ветчина «Из отборной говядины», сосиски «Молочные» традиционные, фарш «Халяль», фарш «Свинина/Говядина». Методом ДНК-диагностики (ПЦР) провели видовую детекцию анализируемых образцов, а с помощью электрофоретического анализа полученных ПЦР-продуктов, установили состав сырьевых компонентов мясных продуктов.

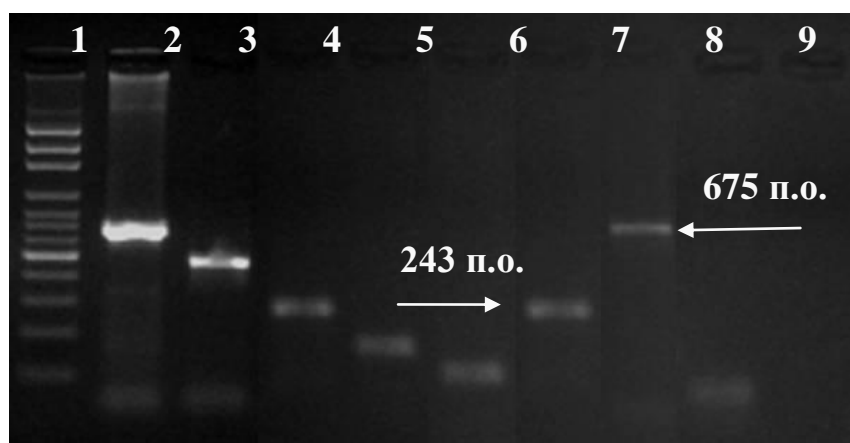


Рис.1 Электрофореграмма ПЦР-продуктов пробы №5
Треки: 1- маркер молекулярной массы (до 3000 п.н.); 2 - K+Bt(675п.о.); 3 - K+Ss(460 п.о.); 4 - K+Ec(243 п.о.); 5 - K+Oa(169 п.о.); 6 - 5 Ic(143 п.о.); 7 - 5 Ec (243 п.о.); 8 - 5 Bt (675 п.о.); 9 - 5 Ss; 10 - 5 Oa.

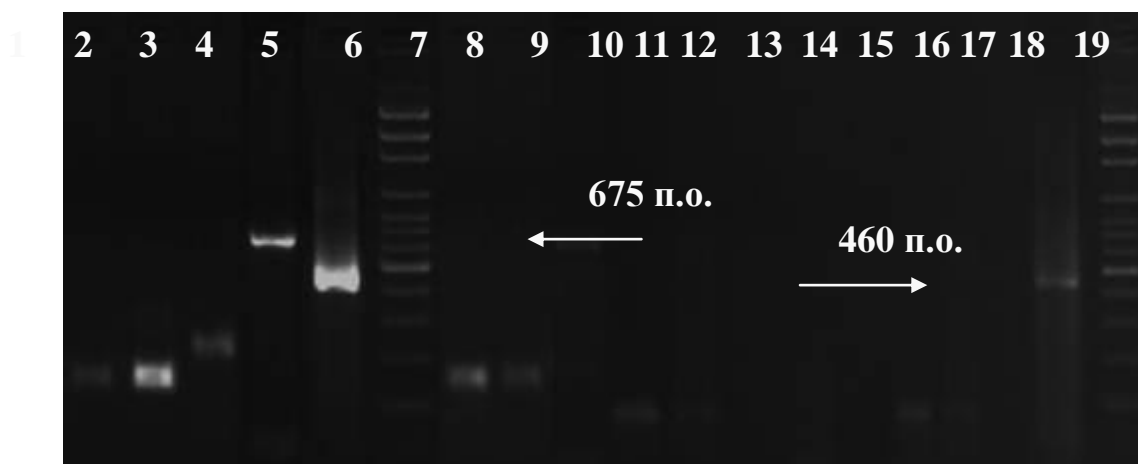


Рис.2 Электрофореграмма ПЦР-продуктов проб №6 и №7

Треки: 1 - K+Cf; 2- K+Oa; 3 - K+Ec; 4 - K+Bt; 5 - K+ Ss; 6 - маркер молекулярной массы (до 3000 п.н.); 7 - 6 Ic; 8 - 7 Ic; 9 - 6 Bt; 10 - 6 Oa; 11 - 6 Ec; 12 - 6 Cf; 13 - 6 Ss; 14 - 7 Bt; 15 - 7 Oa; 16 - 7 Ec; 17 - 6 Cf; 18 - 7 Ss; 19 - маркер молекулярной массы (до 3000 п.н.).

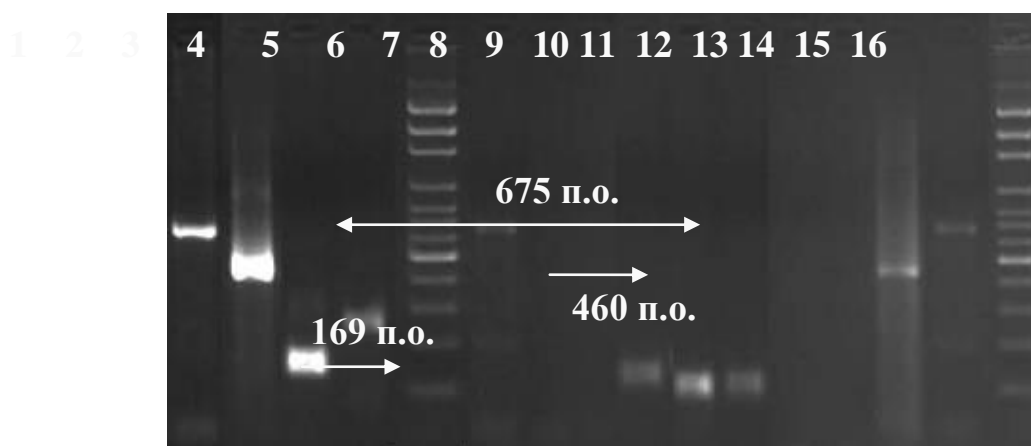


Рис.3 Электрофореграмма ПЦР-продуктов проб №8 и №

Треки: 1 – K+ Bt; 2 – K+ Ss; 3 - K+ Oa; 4 – K+ Ec; 5 - маркер молекулярной массы (до 3000 п.н.); 6 – 8 Bt; 7 – 8 Ss; 8 – 8 Ec; 9 – 8 Oa; 10 – 8 Ic ; 11 – 9 Ic; 12 – 9 Ec; 13 – 9 Oa; 14 – 9 Ss; 15 – 9 Bt; 16 - маркер молекулярной массы (до 3000 п.н.).

Сравнив, полученный нами состав сырьевых компонентов мясопродуктов и состав, указанный производителем на этикетке установили, что все образцы фарша и колбасных изделий соответствуют маркировке изготовителя, за исключением колбасы «Сервелатная» в состав которой включена конина, не заявленная в составе продукта. Таким образом, при проведенных исследованиях нами был выявлен один случай ассортиментной фальсификации.

Библиографический список

1. Курзина М.Н. Качество, безопасность, фальсификация мясной продукции // Пищевая промышленность. – 2006. № 4. - С. 75-76.
2. Методические рекомендации по определению видовой принадлежности клеточных культур методом полимеразой цепной реакции с детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ): утв. отделением ветеринарной медицины РАСХН 24.11.2008. М. – 19 с. автор: К.В. Кулешов
3. Самуйленко А.Я.Кузнецов Д.П.Кузнецова С.В. Иммуноферментный анализ в ветеринарной медицине // Ветеринария сельскохозяйственных животных. 2005. - №9. - С. 22-24.
4. Cooper M.G. Species identification of meat product by standard methods / Ed/ by Patt.- 1985? V.6,p.135-141.
5. Hvass A. Species differentiation in minced meat products by immunodiffusion // In R. L. S. Patterson (ed.), Biochemical Identification of Meat Species. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, NY. 1985. - P. 53-64.i

DETERMINATION OF THE SPECIES OF MEAT RAW MATERIAL IN FINELY DIVIDED PROCESS AND FINISHED MEAT PRODUCTS BY DNA DIAGNOSTICS

Suldina E.V., Kolbasova O.L., Merchina S.V.

This work is devoted to the definition of species belonging to the finely ground raw meat semi-finished and finished meat products by DNA-diagnostics (polymerase chain reaction with electrophoretic detection).