

УДК 619:614.31:637

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ МЯСА МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО» ВРЕМЕНИ

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

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

Разнообразные мясо и мясопродукты - это незаменимая часть рациона человека. Можно обходиться в питании без многого, но качественное мясо и мясопродукты заменить чем-либо достаточно проблематично. Пока ученые не смогли отыскать мясу аналог, который содержал бы такое же количество важных для организма веществ: полноценные белки, липиды, макро- и микроэлементы, витамины, экстрактивные вещества.

Разумеется, на благо идет только употребление качественного мяса, но при сегодняшней его стоимости вообще, а в особенности в столицах и в крупных городах, встречаются случаи фальсификации ценного мяса менее ценным, например, говядины - кониной, оленины - бараниной, свинины - собачьим мясом, кролика - кошкой и т. п. В некоторых случаях разобраться в подлоге бывает довольно легко, в других же, наоборот, почти невозможно. Если, например, исследуется подозрительное мясо в тушах или в больших кусках, то по сравнительно-анатомическим особенностям костей скелета можно, довольно скоро и верно прийти к определенному заключению о принадлежности мяса к тому или другому виду животного. В жизни, однако, в большинстве случаев подмена мяса делается более осторожно и практикуется там, где открытие обмана является делом весьма трудным [1].

В связи с этим, неудивительно, что на методику распознавания фальсификации мяса уже давно было обращено внимание специалистов. К настоящему времени создан целый ряд приемов и способов, предложенных для идентификации мяса и мясных продуктов: органолептические, химические и гистологические методы, которые позволяют осуществлять ветеринарно-санитарный контроль. Однако эти методы имеют существенные ограничения в случае идентификации видовой принадлежности мяса и мясных продуктов близкородственных видов, либо продуктов, не имеющих морфологических критериев идентификации [2].

Перечисленные проблемы могут быть разрешены с использованием современных методов - метод ДНК идентификации (с помощью полимеразной цепной реакции, ПЦР) основан на многократном повторении фрагмента нуклеиновой кислоты (процесс амплификации) изучаемого объекта с помощью специальных праймеров (это олигонуклеотидные цепочки, комплиментарные определенной последовательности фрагмента ДНК или РНК выявляемого материала). Данный метод характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью, а для его проведения требуется незначительное количество исследуемого материала.

В виду этого **целью** нашей работы являлось определение видовой принадлежности мяса различных видов животных методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального» времени.

Для достижения указанной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Выделить нуклеиновые кислоты из исследуемых проб мяса.

2. Поставить ПЦР в режиме «реального» времени.

Для начала работы нами было отобрано 4 пробы мяса различного видового происхождения: крольчатина (1), свинина (2), говядина (3), баранина (4). 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 мяса 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 [3,4].

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.
- } I этап в течение 5 циклов

- денатурация при 95°C- 20 сек;
 - отжиг при 60°C-20 сек., учет сигнала
 - элонгация при 72°C - 20 сек.
- } 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.

Результаты интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флюоресценции с установленной на соответствующем уровне (0,05) пороговой линией (treshhold) значения порогового цикла «Ct».

Образец считали отрицательным, если значение «Ct» по каналу FAM отсутствовало.

Следует отметить, что в ходе работы все анализируемые образцы были разбиты нами на группы для удобства постановки реакции, а праймеры использовались в зависимости от возможной фальсификации.

Результаты исследования образцов мяса с помощью ПЦР в режиме «реального» времени представлены на рисунках (рис. 1, 2).

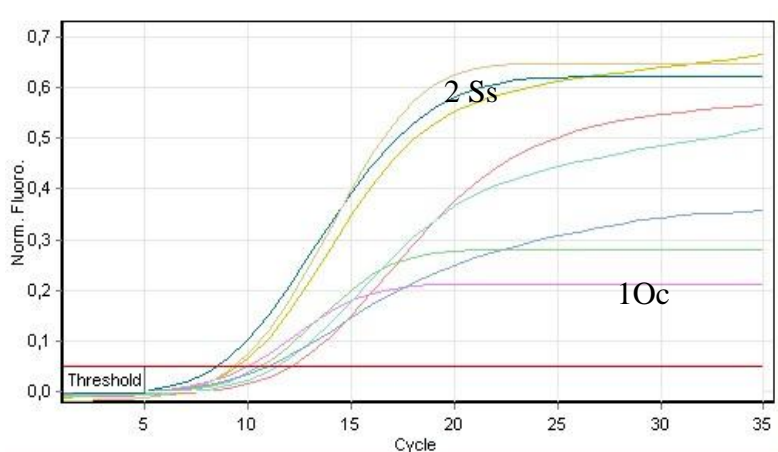


Рис. 1 Кривая флюоресценции проб №1 и №2 с набором праймеров

Проба №1 дала положительный результат с праймерами на *Oryctolagus cuniculus* (кролик). Проба №2 положительно прореагировала с праймерами на *Sus scrofa* (свинья).

No.	Colo ur	Name	Ct
1	■	1 Ss	NEG
2	■	1 Ic	9,46
3	■	1 Fc	NEG
4	■	1 Oc	9,92
5	■	1 Cf	NEG
6	■	2 Ss	8,42
7	■	2 Ic	12,03
8	■	2 Fc	NEG
9	■	2 Oc	NEG
10	■	2 Cf	NEG
11	■	K+ Ss	9,31
12	■	K+ Oc	10,56
13	■	K+ Fc	11,35
14	■	K+ Cf	10,94
15	■	K -	NEG

No.	Color	Name	Ct
1	Red	3 Ic	12,68
2	Yellow	3 Ss	NEG
3	Gold	3 Bt	10,93
4	Pink	3 Oa	NEG
5	Green	3 Ec	NEG
6	Blue	4 Ic	16,68
7	Purple	4 Ss	NEG
8	Light Blue	4 Bt	NEG
9	Light Green	4 Oa	12,39
10	Magenta	4 Ec	NEG
11	Light Green	K+Bt	12,00
12	Purple	K+Ss	12,15
13	Teal	K+Oa	14,59
14	Red	K+Ec	11,45
15	Red	K -	NEG

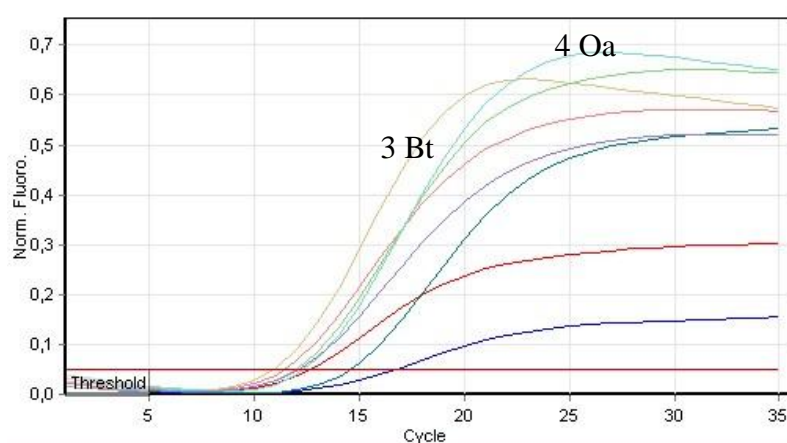


Рис. 2 Кривая флюоресценции проб №3 и №4 с набором праймеров

Проба №3 дала положительный результат с праймерами на *Bos taurus* (КРС).

Проба №4 положительно прореагировала с праймерами на *Ovis aries* (овца).

В ходе данной работы нам удалось выделить нуклеиновые кислоты из исследуемых образцов мяса: крольчатина, свинина, говядина, баранина. Методом Real time PCR мы провели идентификацию анализируемых проб, и установить видовую принадлежность мяса.

Таким образом, в результате исследований нами была установлена видовая принадлежность 4 проб мяса - эти образцы полностью соответствуют наименованию, заявленному товаропроизводителем (мясо кролика, свинина, говядина, баранина).

Библиографический список

1. Гельгор В.И. Идентификация продуктов питания: проблем не стало меньше. // Пищевая промышленность. — 2009. №5. - С. 41-43.
2. Комарова И.Н., Серегин И.Г., Валихов А.Ф. Полимеразная цепная реакция современный метод выявления фальсификаций мясного сырья и продуктов // Мясная индустрия. — 2004. — №2. - С. 37-41.
3. Кулешов, К. В. Видовая идентификация клеточных культур: разработка новых подходов основанных на полимеразной цепной реакции с детекцией продукта в реальном времени (ПЦР-РВ) / К. В. Кулешов // Ветеринарная патология. – 2008. – Том. 26, № 3. – С. 40-45.
4. 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

DETERMINATION OF SPECIFIC SUPPLIES MEAT BY REAL TIME PCR

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

The work is devoted to species identification of four kinds of meat by the method of DNA diagnostics Real Time PCR. In conducting these studies, the authors found that the analyzed samples of the meat are fully consistent naming claimed producers (rabbit meat, pork, beef and lamb).

УДК 641.512.2

ОСОБЕННОСТИ НЕМЕЦКОЙ КУХНИ

Садртдинова Г.Р., Мустякимова А.К., Шапирова З.К.,

4 курс, экономический факультет

Научные руководители: к.б.н., доцент Феоктистова Н. А.,

д.б.н., профессор Васильев Д.А. ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА»

Единая Германия – это огромное лоскутное одеяло, состоящее из федеральных земель. Каждая имеет свое правительство, гимн, флаг, национальный костюм, диалект (порой совсем непохожий на классический немецкий язык) и, конечно, свои кулинарные особенности. Только благодаря немецкому консерватизму национальная кухня дошла до наших дней, отчасти сохранив традиции времен Средневековья.

Мясо - это основное блюдо Германии, каждый немец в среднем употребляет за год около 84 килограмм мяса. Что и говорить, мясо в Германии любят и умеют готовить. Действительно, в Германии существует более 1500 видов различных сосисок.

Немецкая кухня - кухня, которая отличается тем, что пользуется всеми технологиями кулинарного искусства. Эта кухня известна своей оригинальностью и, самое главное, вкусом.

На сегодняшний день Германия – родина очень многих звездных поваров и это еще один момент, который хочется отметить. В этом отношении с ней может сравниться, пожалуй, только Франция. Очень важно подчеркнуть, что базисом региональной кухни является изначальное качество продуктов. На эту тему существует уникальное высказывание: «Плохой повар из хорошего продукта сможет приготовить хорошее блюдо, но хороший повар из плохого продукта качественное блюдо не приготовит». В этом контексте следует отметить одну из важнейших отличительных черт, достоинств немецкой кухни – высокое качество изначальных продуктов, поскольку в Германии до сих пор сохраняются и пользуются заслуженной репутацией мелкие крестьянские хозяйства. Общеизвестный факт: настоящие качественные сыр, молоко, мясо могут быть произведены только в небольшом частном хозяйстве. Идеальный вариант – мясо от счастливой коровы, которую ты знал лично.

Положительно и то, что крестьяне имеют возможность продавать свою продукцию без посредников. Для этого существуют небольшие рынки. Каждый потенциальный покупатель знает, что самые лучшие яйца продает, например, господин Мюллер, а мясо лучше купить, например, у господина Майера.