

УДК 619:614.31:637

## **ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА REAL-TIME PCR ДЛЯ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ МЯСНОГО СЫРЬЯ В МЕЛКОИЗМЕЛЬЧЕННЫХ ПОЛУФАБРИКАТАХ И ГОТОВЫХ МЯСНЫХ ПРОДУКТАХ**

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»

В настоящее время остро стоит вопрос о необходимости более достоверного определения, как видовой принадлежности блочного мясного сырья, так и состава мясных мелкоизмельченных продуктов, так как из-за фальсификации мясного сырья по видовому составу не только изменяются потребительские свойства готовых изделий, но и возникает опасность для здоровья потребителей [3].

Наибольшее беспокойство у ветеринарных специалистов вызывают возможные подмены в продуктах мясного сырья мясом животных, пораженных прионами или вирусами, создающими большой риск в эпизоотическом и эпидемическом отношениях (губкообразные энцефалопатии, африканская чума свиней, ящур и другие), а также мясом, импорт которого в нашу страну по каким-либо причинам запрещен. Кроме того, фальсификация видовой принадлежности мясного сырья в многокомпонентных мясных продуктах может нанести большой моральный вред той категории потребителей, национальные или религиозные воззрения которых не позволяют употреблять мясо отдельных видов скота и птицы [1].

Известно, что используемые в настоящее время методы органолептического, физико-химического и микробиологического контроля дают возможность определить свежесть и безопасность в инфекционном отношении мясного сырья и готовых мясных изделий. Но с их помощью нельзя установить видовой состав мяса в продуктах, особенно если количество видоизмененной мышечной ткани незначительное по отношению к основному сырью.

Наиболее перспективными для определения видовой принадлежности тканей животного происхождения в составе мясного сырья и продуктов, в том числе подвергшихся термической обработке, является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). По сравнению с традиционными способами видовой детекции, установление видовой принадлежности мяса и сырьевых компонентов мясных продуктов при помощи ПЦР отличается универсальностью, более глубоким уровнем видовой дифференциации, высокой воспроизводимостью и специфичностью [2].

В виду этого **целью** нашей работы являлась видовая идентификация мясного сырья в мелкоизмельченных полуфабрикатах и готовых мясных продуктах методом ПЦР в режиме «реального» времени.

Для достижения указанной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Выделить нуклеиновые кислоты из исследуемых проб мясных продуктов.
2. Поставить ПЦР в режиме «реального» времени.
3. Проанализировать полученные результаты.

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 образцов 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 проб 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 [4,5].

Состав смеси для проведения ПЦР:

- бидистиллированная вода - 5,8 мкл
- 5X буфер для ПЦР - 5 мкл
- MgCl<sub>2</sub> (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 95<sup>0</sup>С - 5 мин
  - денатурация при 95<sup>0</sup>С- 20 сек;
  - отжиг при 60<sup>0</sup>С-20 сек.,
  - элонгация при 72<sup>0</sup>С – 20 сек.
  - денатурация при 95<sup>0</sup>С- 20 сек;
  - отжиг при 60<sup>0</sup>С-20 сек., учет сигнала
  - элонгация при 72<sup>0</sup>С - 20 сек.
- И 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.

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, 3).

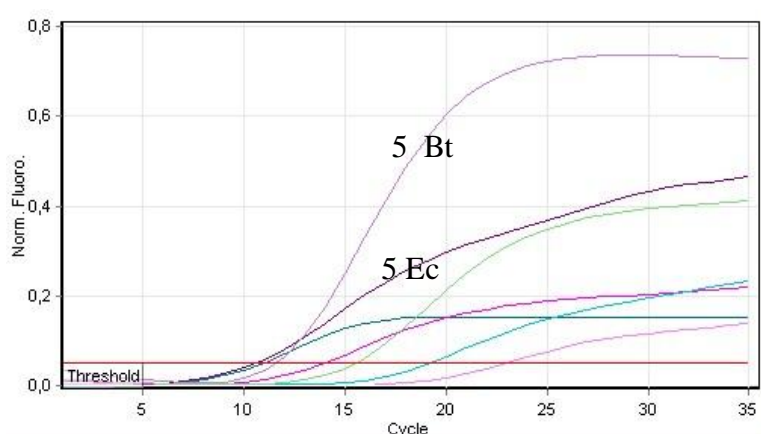


Рис. 1 Кривая флюоресценции пробы №5 с набором праймеров  
Образец №5 дал положительный результат с праймерами на *Bos taurus* (КРС) и *Equus caballus* (лошадь)

| No. | Colour      | Name  | Ct    |
|-----|-------------|-------|-------|
| 1   | Red         | K-    | NEG   |
| 2   | Yellow      | 5 Ss  | NEG   |
| 3   | Pink        | 5 Ic  | 22,98 |
| 4   | Purple      | 5 Bt  | 11,57 |
| 5   | Blue        | 5 Oa  | NEG   |
| 6   | Dark Purple | 5 Ec  | 10,56 |
| 7   | Teal        | K+ Oa | 10,90 |
| 8   | Magenta     | K+ Ec | 13,92 |
| 9   | Cyan        | K+ Bt | 19,21 |
| 10  | Light Green | K+ Ss | 15,51 |

| No | Colour       | Name | Ct    |
|----|--------------|------|-------|
| 1  | Red          | K -  | NEG   |
| 2  | Yellow       | 6 Ic | 15,44 |
| 3  | Blue         | 6 Ss | NEG   |
| 4  | Green        | 6 Bt | 10,31 |
| 5  | Purple       | 6 Oa | NEG   |
| 6  | Pink         | 6 Ec | NEG   |
| 7  | Olive        | 6 Cf | NEG   |
| 8  | Light Blue   | 7 Ic | 17,29 |
| 9  | Dark Red     | 7 Ss | 10,52 |
| 10 | Light Purple | 7 Bt | NEG   |
| 11 | Light Purple | 7 Oa | NEG   |
| 12 | Pink         | 7 Ec | NEG   |
| 13 | Teal         | 7 Cf | NEG   |
| 14 | Light Red    | K+Ec | 7,80  |
| 15 | Magenta      | K+Bt | 12,09 |
| 16 | Cyan         | K+Ss | 13,47 |
| 17 | Light Green  | K+Cf | 11,86 |
| 18 | Blue         | K+Oa | 13,48 |

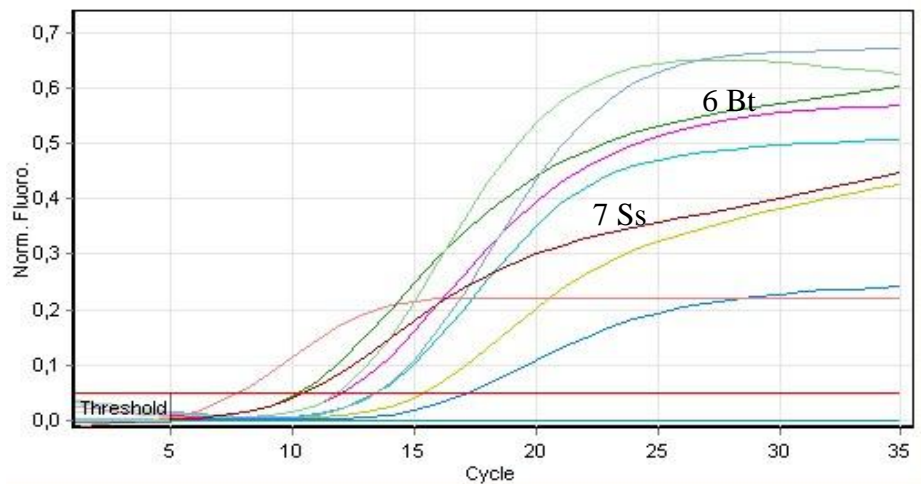


Рис. 2 Кривая флюоресценции пробы №6 и №7 с набором праймеров

Проба №6 дала положительный результат с праймерами на *Bos taurus* (КРС).

Проба №7 положительно прореагировала с праймерами на *Sus scrofa* (свинья).

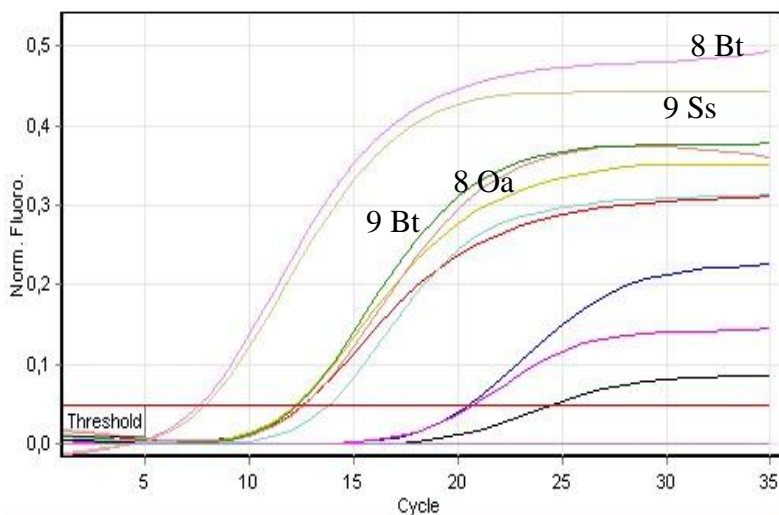


Рис. 3 Кривая флюоресценции пробы №8 и №9 с набором праймеров.

Проба №8 дала положительный результат с праймерами на *Bos taurus* (КРС) и *Ovis aries* (овца).

Проба №9 положительно прореагировала с праймерами на *Bos taurus* (КРС) и *Sus scrofa* (свинья).

| No. | Colour       | Name | Ct    |
|-----|--------------|------|-------|
| 1   | Red          | K+Bt | 12,60 |
| 2   | Yellow       | K+Ec | 12,19 |
| 3   | Blue         | K+Oa | 20,55 |
| 4   | Light Blue   | K+Ss | 13,80 |
| 5   | Purple       | K -  | NEG   |
| 6   | Magenta      | 8 Ic | 20,75 |
| 7   | Blue         | 8 Ss | NEG   |
| 8   | Pink         | 8 Bt | 7,60  |
| 9   | Teal         | 8 Ec | NEG   |
| 10  | Light Red    | 8 Oa | 12,67 |
| 11  | Black        | 9 Ic | 24,51 |
| 12  | Yellow       | 9 Ss | 7,88  |
| 13  | Green        | 9 Bt | 12,32 |
| 14  | Cyan         | 9 Ec | NEG   |
| 15  | Light Purple | 9 Oa | NEG   |

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 Real time PCR мы провели видовую идентификацию анализируемых образцов, установив состав сырьевых компонентов мясных продуктов.

Сравнив, полученный нами состав 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 производителем в составе продукта. Таким образом, в результате проведенных исследований нами был выявлен один случай ассортиментной фальсификации.

### **Библиографический список**

1. Езерская Е.Я. Анализ видовой принадлежности мяса и мясопродуктов // Ветеринария. -2001. 6. – С. 45-51.
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. Курзина М.Н. Качество, безопасность, фальсификация мясной продукции // Пищевая промышленность. – 2006. № 4. - С. 75-76.
4. 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.
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 REAL-TIME PCR FOR IDENTIFICATION OF SPECIES IN THE FINELY GROUND RAW MEAT, PRECOOKED AND FINISHED FOOD PRODUCTS**

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 polymerase chain reaction in the «real» time. In conducting these studies, the authors found that all the analyzed samples, and minced meat products comply with the manufacturer's labeling, except for the sausage «Servelatnaya» which is included in the horse, not stated in the product. Thus, in studies conducted by us revealed a case of an assortment of tampering.