

На правах рукописи

Рощупкина Луиза Владимировна



**«Совершенствование определения компонентного состава
сырья и продуктов животного и растительного происхождения»**

16.00.06 – ветеринарная санитария, экология, зоогигиена
и ветеринарно-санитарная экспертиза

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

2 9 11.07.2009

Москва - 2009

Работа выполнена в отделе технического регулирования, стандартизации и сертификации Государственного научного учреждения Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии Россельхозакадемии (ГНУ ВНИИВСГЭ РАСХН)

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор Светличкин
Вячеслав Владимирович
(ГНУ ВНИИВСГЭ РАСХН)

Официальные оппоненты:

доктор ветеринарных наук, профессор Долгов Виктор Андреевич
(ГНУ ВНИИВСГЭ РАСХН)

кандидат биологических наук

Хоменец Николай Геннадиевич
(РУДН)

Ведущая организация: Московский государственный университет прикладной биотехнологии

Защита состоится «17» 06 2009 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 006.008.01 при Всероссийском научно-исследовательском институте ветеринарной санитарии, гигиены и экологии (123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, 5).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии Россельхозакадемии.

Автореферат разослан « 15 » 05 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат ветеринарных наук



Н.С. Павлова

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

В соответствии с законом о «Техническом регулировании» производитель и продавец не должны вводить в заблуждение покупателя о составе своей продукции. Продукция должна отвечать всем требованиям технического регламента и соответствующего стандарта. Однако в некоторых случаях недобросовестные производители фальсифицируют продукцию.

В последние годы значительно увеличился ассортимент мясной продукции, в которой используются растительные добавки, при этом в качестве растительных компонентов могут применяться генно-модифицированные источники (ГМИ).

Объемы продукции, которая содержит компоненты животного и растительного происхождения, постоянно увеличиваются.

Продукция, содержащая белок или ДНК генно-модифицированных источников, должна соответствующим образом маркироваться. Сырье и продукция, содержащие компоненты животного и растительного происхождения, отличающиеся от декларированного содержания компонентов в нормативных документах (технических условиях, международных национальных и отраслевых стандартах), являются фальсифицированными.

Подтверждение соответствия сырья и продукции нормативным документам является важным элементом закона «О техническом регулировании» и проводится на разных стадиях оборота продукции: от производства до реализации в торговых точках. Естественно, что хорошо оснащенные аккредитованные Испытательные лаборатории могут осуществлять контроль с помощью высокочувствительных и специфичных методов на стадиях сертификации и регистрации сырья и продукции. Однако практические лаборатории ветеринарно-санитарного контроля нуждаются также и в экспрессных скрининговых методах.

В связи с этим актуальным является разработка и совершенствование методов, позволяющих проводить определение компонентного состава на

основе анализа белка или ДНК при скрининговых или арбитражных исследованиях. Наиболее перспективными в этом направлении являются методы ДНК- и иммунодиагностики (И.Н. Комарова, 2004; А.М. Смирнов и др., 2005; В.В. Светличкин, 2005; С.С. Huang, Т.М. Pan, 2005).

Цель и задачи исследований

Целью исследований являлось совершенствование определения компонентного состава сырья и продуктов животного и растительного происхождения.

В задачи исследований входило:

- разработать методику последовательного разделения белков и ДНК, позволяющую проводить параллельное определение компонентного состава продукции на основе анализа белка или нуклеиновых кислот;
- усовершенствовать методику определения компонентного состава сырья и продукции на основе иммунодиффузии для идентификации животных и растительных компонентов;
- усовершенствовать методику определения растительных и животных компонентов на основе ДНК-зондов;
- усовершенствовать методику определения компонентного состава сырья и продукции на основе амплификации с последующей ДНК-гибридизацией;
- провести сравнительное изучение методов определения компонентного состава сырья, термообработанных и нетермообработанных полуфабрикатов и мясных изделий, содержащих животные и растительные компоненты.

Научная новизна

Предложены усовершенствованные методы идентификации растительных и животных компонентов продукции на основе анализа белка методами иммунодиффузии и на основе ДНК методом гибридизации нуклеиновых кислот со специфическими ДНК-зондами, а также с помощью модифицированной методики на основе амплификации, позволяющей

выявлять животные и растительные компоненты, включая компоненты из генно-модифицированных источников. При этом разработана модификация метода иммунодиффузии с фильтрами, пропитанными отечественными сыворотками, расширяющая спектр определяемых компонентов, включающий растительные белки, оленину, конину, лосятину и позволяющая проводить идентификацию в нетермообработанных полуфабрикатах с чувствительностью 4%.

Усовершенствована методика определения растительных и животных компонентов на основе ДНК-гибридизации на мембранных фильтрах с биотинилированными зондами с чувствительностью 1%.

Усовершенствована методика определения компонентного состава продуктов, состоящих из ингредиентов животного и растительного происхождения, на основе ПЦР, включающая ускоренную пробоподготовку с применением детергента СТАВ (цетилтриметиламмоний бромид) и иммуномагнитосепарации, амплификацию ДНК и детектирование ампликонов по иммуноферментному типу с чувствительностью определения ДНК животного происхождения и ДНК ГМИ растений 0,1%.

Проведена сравнительная оценка методов, показавшая высокую чувствительность методов на основе ПЦР, а также специфичность, позволяющих проводить анализ в смешанных фаршах, полуфабрикатах и термообработанных мясорастительных колбасах.

Практическая ценность

На основании результатов исследований разработаны «Методические рекомендации по определению состава сырья и продукции, состоящих из мясных и растительных компонентов с помощью реакции ДНК и иммунодиагностики» (утверждены Отделением ветеринарной медицины РАСХН 07.04.2008 г.).

Апробация работы Материалы диссертации доложены и обсуждены на:

- Международной научно-производственной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения профессора Авророва А.А. (Воронеж, 2006 г.);

- Международной научной конференции «Живые системы и биологическая безопасность населения» (Москва, 2007 г.);
- межлабораторном совещании ГНУ ВНИИВСГЭ Россельхозакадемии (2009 г.).

Публикации Результаты исследований отражены в 4 научных статьях, из них 2 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем работы Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических предложений, списка использованной литературы и приложения.

Диссертация изложена на 115 страницах машинописного текста, содержит 9 таблиц и 7 рисунков. Список литературы включает 163 источника отечественных и зарубежных авторов.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы исследований

Работа проводилась в период с 2005 по 2009 гг. Диссертационная работа выполнена на основании плана научно-исследовательских работ ГНУ ВНИИВСГЭ Россельхозакадемии и включает часть темы 08.05.02.03.

В работе использовались сырье и термообработанные и нетермообработанные полуфабрикаты: говядина, свинина, конина, оленина, лосятина, полуфабрикаты мясные рубленые быстрозамороженные (ТУ 9214-003-53124469-2002. Шницель); пельмени быстрозамороженные «Тройные» (ТУ 9214-002-53124469-2002) из говядины, свинины, баранины; пельмени быстрозамороженные «Двойные» (ТУ 9214-002-53124469-2002) из говядины, свинины; фарши для приготовления колбас, состоящие из растительных и животных компонентов; колбаса полукопченая из конины «Конская особенная» высший сорт (ТУ 9213-068-52924334-05); колбаса «Докторская» (ГОСТ Р 52196-2003).

В работе использовались методы иммунопреципитации по Оухтерлони (Ouchterlony O., 1958); методы выделения ДНК по Мармуру (Marmur J., 1959); методы ДНК-гибридизации на мембранных нитроцеллюлозных фильтрах (Denhardt D.T., 1966); методика определения видовой принадлежности мяса с использованием тест-систем ORBIT, PRIME, SOFT, PROFIT (США) (Морозова Е.Н., 2005), а также усовершенствованные методы на основе ДНК- и иммунодиагностики.

Результаты исследований

1. Разработка методики последовательного разделения белков и ДНК, позволяющей проводить параллельное определение компонентного состава продукции на основе анализа белка или нуклеиновых кислот

Нами разработана методика идентификации многокомпонентных смесей, содержащих компоненты растительного и животного происхождения, которая заключается в последовательной экстракции белков для анализа на основе иммунодиффузии.

После экстракции белков проводили выделение ДНК для определения видовой принадлежности компонентов, включая ГМИ, на основе различных методов ДНК-диагностики.

Схема определения компонентного состава представлена на рис. 1. Экстракцию белков проводили элюирующими буферами, выделение ДНК осуществляли с помощью детергента СТАВ и иммуномагнитосепарации с сорбентами «Silica» (SiO_2).

Для пробоподготовки многокомпонентных смесей на основе методов идентификации с помощью ДНК- и иммунодиагностики необходимо одновременно выделить и нативные белки, и очищенную ДНК. Выделение белковых фракций для последующей постановки иммунодиффузии осуществляли путем экстракции различными буферными системами (Трис-буфер и др.).

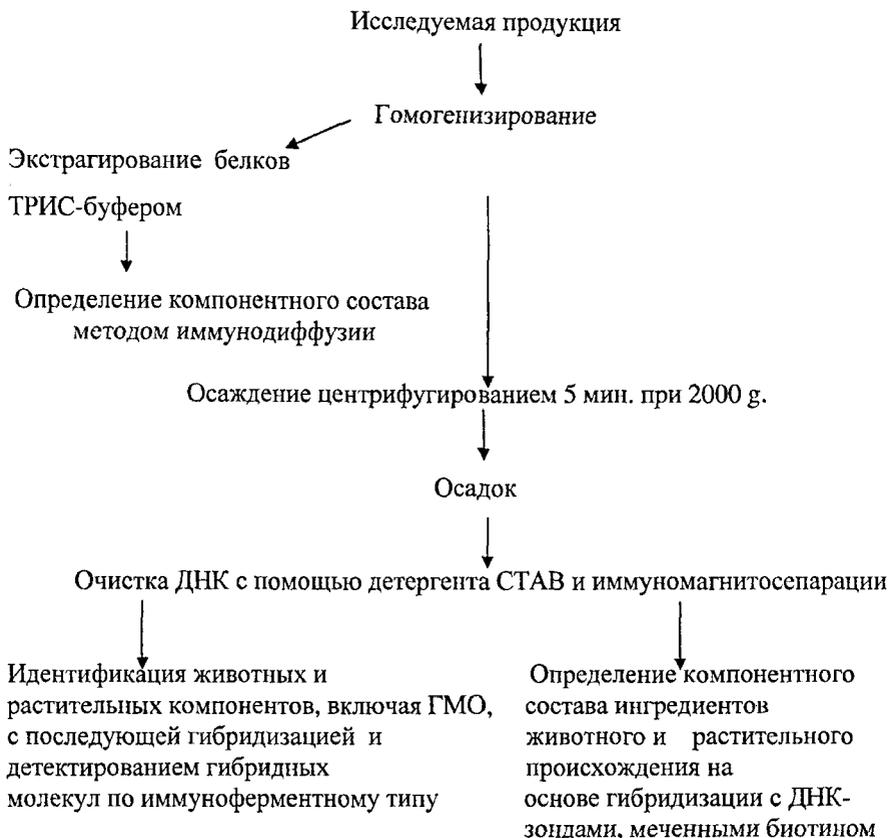


Рис 1. Общая схема определения компонентного состава

В соответствии со схемой пробоподготовки пробу гомогенизировали, из одной части пробы экстрагировали белки ТРИС-буфером для последующей идентификации с помощью иммуноферментного анализа.

Гомогенат осаждали центрифугированием и выделяли ДНК растительных и животных компонентов по методу Мармура, а также с использованием детергента СТАВ и иммуномагнитосепарации.

В таблице 1 представлены результаты очистки ДНК и время анализа различными методами выделения ДНК по сравнению классической методикой Мармура.

Таблица 1

Результаты сравнительных исследований методик выделения ДНК

Выделение ДНК из модельных смешанных образцов животного и растительного происхождения	Видовая принадлежность ДНК	Отношение оптических плотностей	ДНК-СТАВ	ДНК-СТАВ + иммуномагнитосепарация	Модифицированный метод Мармура
Необходимое время для выделения 10 образцов	*животного происхождения		3-4 часа	1-2 часа	8-10 часов
	**растительного происхождения		3-4 часа	1-2 часа	8-10 часов
	*** смешанного происхождения		3-4 часа	1-2 часа	8-10 часов
Степень очистки ДНК о отношению поглощения оптических плотностей	*животного происхождения	A_{260}/A_{280}	$1,8 \pm 0,03$	$1,8 \pm 0,05$	$1,8 \pm 0,06$
	**растительного происхождения	A_{260}/A_{280}	$1,83 \pm 0,03$	$1,79 \pm 0,05$	$1,79 \pm 0,06$
	*** смешанного происхождения	A_{260}/A_{280}	$1,79 \pm 0,02$	$1,80 \pm 0,04$	$1,81 \pm 0,06$
	*животного происхождения	A_{260}/A_{230}	$2,2 \pm 0,04$	$2,2 \pm 0,03$	$2,2 \pm 0,05$
	**растительного происхождения	A_{260}/A_{230}	$2,2 \pm 0,05$	$2,2 \pm 0,05$	$2,2 \pm 0,06$
	*** смешанного происхождения	A_{260}/A_{230}	$2,15 \pm 0,05$	$2,19 \pm 0,05$	$2,2 \pm 0,06$

* Пельмени быстрозамороженные «Тройные» (ТУ 9214-002-53124469-2002)

из говядины, свинины, баранины; говяжье сердце; конина

** соевая мука; *** смешанный фарш из мяса и соевой муки

Как видно из результатов, представленных в таблице 1, соотношение оптических плотностей A_{260}/A_{280} приблизительно равно 1,8, что свидетельствует о достаточно хорошей очистке ДНК от белка. При этом

достаточная очистка происходит как при выделении ДНК с применением детергента СТАВ, так и с использованием СТАВ и иммуномагнитосепарации. Поскольку в случае использования иммуномагнитосепарации не требуется обработки органическими растворителями и осаждения этанолом, время анализа сокращается до 1-2 часов.

Использование классической методики выделения и очистки ДНК по Мармуру с применением органических растворителей значительно увеличивает время анализа, а дополнительное использование сорбента или органических растворителей делает анализ более трудоемким. Неоднократное осаждение и пересаждение ДНК приводит к ее потерям.

Вследствие этого предпочтительнее использование детергента СТАВ и иммуномагнитосепарации.

2. Определение видовой принадлежности мяса с использованием тест-систем ORBIT, PRIME, SOFT, PROFIT (США)

После выделения белковых фракций в соответствие с представленной выше схемой проводили идентификацию компонентов в смешанных фаршах.

Для этого использовались специфические сыворотки к белкам крови соответствующих животных.

Принцип реакции (метод иммунодиффузии по Оухтерлони) основан на диффузии диагностических антител и испытуемого антигена из пропитанных дисков в гель, при этом в случае их взаимодействия образуется полоса преципитации между противоположными дисками.

Компонентами анализа являются испытуемый материал (сырое мясо, мясопродукты), диски с иммобилизованными антителами к белкам оленины и других животных и диски сравнения с иммобилизованными антигенами. В исследованиях использовали набор реагентов и материалов для идентификации оленины. Данная тест-система может быть использована для исследования только сырого мяса и не предназначена для анализа термообработанных продуктов.

На первом этапе идентификацию мяса проводили с использованием тест-систем ORBIT, PRIME, SOFT, PROFIT. Производство данных тест-систем стандартизовано по международным требованиям системы ИСО 9000.

На оборотной стороне чашки Петри фломастером ставили номер фильтра. При этом использовали преципитирующие диски с антителами на различные виды животных и диски с антигенами. Линия преципитации между дисками с антителами и антигенами указывала на работоспособность дисков. Чашки Петри помещали в термостат при 37°C на 18 -24 часа. Затем чашки извлекали и определяли линии преципитации между дисками.

Линия преципитации между дисками с антителами и антигенами позволяла определять видовую принадлежность исследуемого образца. Для визуализации линии преципитации использовали флуоресцентную лампу.

Результаты анализа представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Идентификация продукции на основе иммунодиффузии
с применением тест-систем серии ORBIT, PRIME, SOFT, PROFIT

№ п/п	Испытуемые образцы	Специфичные антигены для идентификации образцов методом иммунодиффузии				
		сви- нина	говя- дина	бара- нина	кони- на	мясо кур
1	Свинина	+	-	-	-	-
2	Говядина	-	+	-	-	-
3	Баранина	-	-	+	-	-
4	Мясо кур	-	-	-	-	+
5	Колбаса «Докторская»	+	+	-	-	-
6	Колбаса полукопченая из конины «Конская особенная» высший сорт	-	-	-	+	-
7	Говядина 50 %, свинина 50 %	+	+	-	-	-
8	Говядина 80 %, свинина 20 %	+	+	-	-	-
9	Говядина 95 %, свинина 5 %	+	+	-	-	-

Таблицы 2 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7
10	Говядина 96 %, свинина 4 %	+	+	-	-	-
11	Говядина 97 %, свинина 3 %	-	+	-	-	-
12	Говяжье сердце	-	+	-	-	-
13	Свинина 50 %, говядина 50 %	+	+	-	-	-
14	Свинина 80 %, говядина 20 %	+	+	-	-	-
15	Свинина 95 %, говядина 5 %	+	+	-	-	-
16	Свинина 96 %, говядина 4 %	+	+	-	-	-
17	Свинина 97 %, говядина 3 %	+	-	-	-	-
18	Полуфабрикаты мясные рубленые быстрозамороженные «Шницель»	+	-	-	-	-
19	Пельмени быстрозамороженные «Тройные» из говядины, свинины, баранины	+	+	+	-	-
20	Пельмени быстрозамороженные «Двойные» из говядины, свинины	+	+	-	-	-

+ положительная реакция иммунодиффузии

- отрицательная реакция иммунодиффузии

Как видно из данных, представленных в таблице 2, линия преципитации наблюдалась только между гомологичными системами. При этом чувствительность реакции в различных фаршевых смесях составляла 4%. Эти показатели были несколько выше, чем в работах Е.Н. Морозовой (2005) и Д.Г. Узуняна (2006) для свинины и мяса кур, что, вероятно, объясняется методикой подготовки проб. В продукции, состоящей из многокомпонентных смесей, как, например, пельмени быстрозамороженные «Тройные» из говядины, свинины, баранины и пельмени быстрозамороженные «Двойные» из

говядины, свинины наблюдалось две линии преципитации, соответствующие различным видам мяса.

Методика с использованием систем серии ORBIT, PRIME, SOFT, PROFIT была достаточно специфична и позволяла с чувствительностью 4% определять в фаршевых смесях различные виды мяса. Однако эта система ограничивала ассортимент идентифицируемой продукции, поэтому в дальнейшем мы перешли на специфичные сыворотки отечественного производства.

3. Усовершенствование определения компонентного состава с применением отечественных преципитирующих сывороток

Для проведения реакции иммунодиффузии готовый гель расплавляли в колбе на кипящей водяной бане и разливали в чистые обезжиренные чашки Петри с толщиной слоя 2-3 мм.

После застывания геля в нем делали лунки специальным трафаретом-пробойником. При идентификации различных образцов использовали трафарет с шестью лунками, расположенными по кругу. Седьмая лунка находилась в центре. Диаметр лунок составлял 2 - 3 мм, а расстояние между лунками - 6 мм.

Вырезанные фрагменты геля удаляли из лунок с помощью тонкой иглы или маленького пинцета.

В лунки по периферии с помощью дозатора осторожно вносили исследуемые элюированные образцы, а в центральную лунку - преципитирующую диагностическую сыворотку к белкам того или иного вида животного. В последнем случае проводился анализ многокомпонентных смесей.

При заполнении лунок необходимо избегать их переполнения. При каждом новом добавлении образца необходимо менять наконечник дозатора.

Чашки Петри с исследуемым материалом закрывали крышкой и помещали в термостат при 37 °С на 24 часа.

Реакцию преципитации оценивали по наличию или отсутствию полосы

преципитации между противоположными лунками.

Наличие полосы преципитации между лункой с вытяжкой из исследуемого материала и лункой с диагностической сывороткой, преципитирующей белки того или иного вида животного или растения, указывала на принадлежность образца к определенному виду. При этом реакция преципитации с другими сыворотками должна быть отрицательной.

Модификация методики заключалась в предварительном нанесении геля в чашки Петри и формировании лунок для испытуемого белка и сыворотки заранее. Чашки Петри закрывали и обертывали черной бумагой. При проведении испытаний анализ осуществляли в соответствии с методикой, изложенной в п. 4.

Предварительная подготовка чашек Петри с гелем позволяла значительно ускорить анализ (в 1,5-2 раза) и упрощала его при проведении испытаний. Кроме того, в периферийные лунки вносили образцы разного разведения для определения чувствительности метода.

Модификация методов иммунодиффузии с использованием лунок также позволяет проводить определение компонентного состава; кроме того, расширяется спектр идентифицируемых видов мяса, в который, помимо указанных видов, входят конина, оленина, лосятина, а также соя.

4. Модифицированная методика определения видовой принадлежности с использованием мембранных фильтров, пропитанных отечественными преципитирующими сыворотками

Для проведения идентификации мембранные фильтры «Владипор №6» предварительно пропитывали отечественными преципитирующими сыворотками к говядине, свинине, мясу птицы, конине, лосятине (Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов).

Кроме того, предварительно готовили чашки с агарозным гелем. Для проведения реакции иммунодиффузии готовый гель расплавляли в колбе на

кипящей водяной бане и разливали в чистые обезжиренные чашки Петри с толщиной слоя 2-3 мм. При разливе геля чашки Петри должны находиться на строго горизонтальной поверхности. Подготовленные чашки оборачивали в темную бумагу. Фильтры с преципитирующими сыворотками могли храниться в течение 6 месяцев.

При определении компонентов различных смесей проводили экстракцию с помощью ТРИС-буфера в течение 1 часа.

После экстракции элюат переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали при 1000-2000g в течение 15-20 минут. В случае образования в верхней фазе жирового слоя его удаляли с помощью фильтровальной бумаги.

Чистый фильтр пропитывали элюатом и помещали в центр чашки Петри. По периферии размещали предварительно подготовленные фильтры с преципитирующими сыворотками. Далее чашки помещали в термостат при 37°C на 20 часов.

Результаты реакции регистрировали по полосе преципитации между фильтром с исследуемым образцом и фильтрами со специфичными преципитирующими сыворотками, что позволяло проводить идентификацию следующих видов мяса: свинины, говядины, баранины, мяса птицы, конины, оленины, лосятины.

Чувствительность методики, так же как и при использовании тест-систем ORBIT, PRIME, SOFT, PROFIT, составляла 4%.

С помощью данной методики удастся определить компонентный состав пельменей, состоящих из говядины, свинины, баранины или из говядины и свинины, а также определить сою в фаршевой смеси для приготовления колбас.

5. Разработка модифицированной методики определения компонентного состава на основе ДНК-зондов

Из исследуемых образцов выделяли ДНК с помощью детергента СТАВ и иммуномагнитосепарации с сорбентом «Silica» (SiO_2), иммобилизовали в

виде точек на мембранные нитроцеллюлозные фильтры и проводили гибридизацию со специфичными ДНК-зондами на животные и растительные компоненты, меченные биотином.

После реакции с конъюгатом и субстратом по степени окрашивания точек с гибридными молекулами определяли наличие растительного или животного компонента.

В качестве контроля использовали ДНК, не имеющую гомологии ни с растительной ДНК, ни с ДНК животных компонентов.

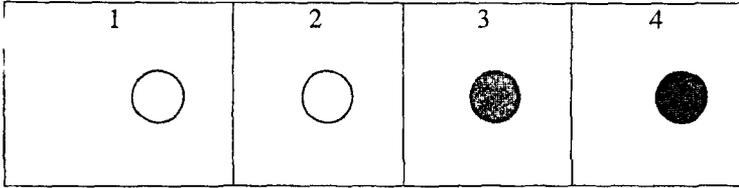
ДНК из различных мясных термообработанных и нетермообработанных полуфабрикатов выделяли иммуномагнитосепарацией, проводили денатурацию кипячением и иммобилизовали денатурированную ДНК 6ХССР (стандартно-солевой раствор) на мембранные нитроцеллюлозные фильтры Миллипор в объеме 0,2 мкм. Точки с иммобилизованными ДНК предварительно подписывали, подсушивали под лампой дневного света, затем помещали во флаконы, добавляли гибридизационный раствор и денатурированные биотинилированные ДНК-зонды. Проводили гибридизацию в течение 4-6 часов при 42°C. Отмывали от неспецифической сорбции в ССР. Добавляли конъюгат (стрептавидинфосфатазу) и краситель.

Результаты реакции определяли визуально по наличию окрашенных гибридных молекул. В качестве ДНК-зонда на говядину брали участок ДНК, кодирующий бычий колпастатин, используемый ранее в работах Макарова М.М. (2002):

-5'-TCCCTGCGTTGAGTTACCTGTC BOS-U1;

-5'-GCCCTGCCAATTTTCACGATG BOS-L2

Как видно из рисунка 2, окрашенные гибридные молекулы наблюдались только при гибридизации сои с соей или говядины с говядиной. Таким образом, удавалось проводить определение компонентного состава колбасы и фаршевых смесей, состоящих из растительных и животных ингредиентов.



- 1- отрицательный контроль (ДНК конины + ДНК-зонд на говядину)
 2- отрицательный контроль (ДНК свинины + ДНК-зонд на говядину)
 3- положительный контроль (ДНК сои + ДНК-зонд на сою)
 4- положительный контроль (ДНК говядины + ДНК-зонд на говядину)

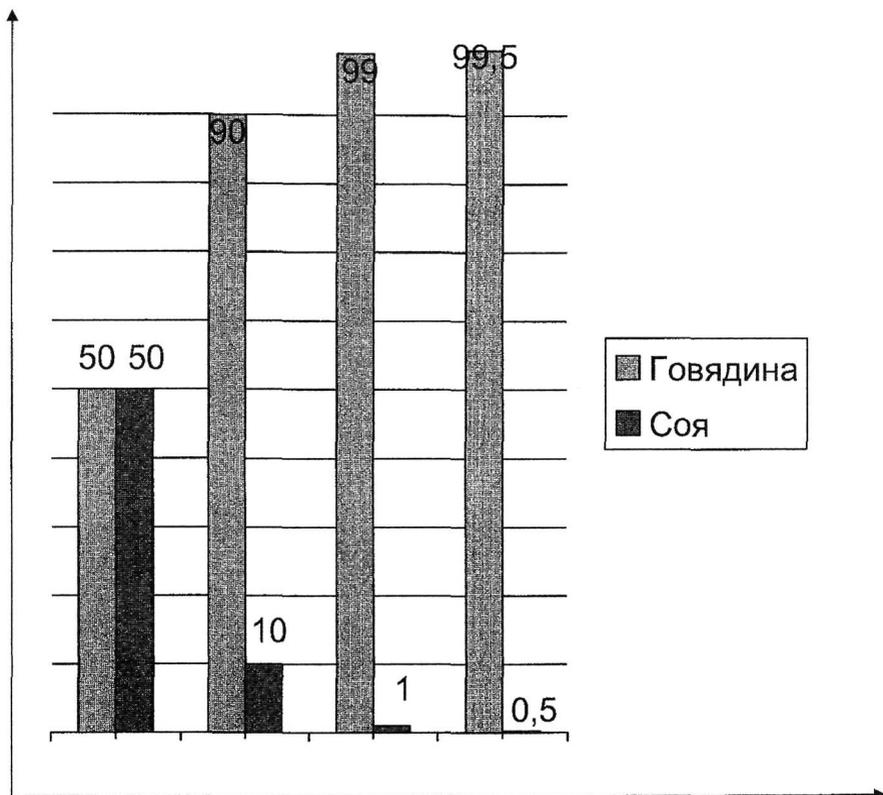
Рис. 2. Результаты гибридизации ДНК-зондов на говядину и сою с иммобилизованными на фильтрах исследуемыми ДНК

Проведенные исследования показали возможность использования данного подхода для определения растительных и животных компонентов в смешанных продуктах (в колбасах вареных и в фаршевой смеси для приготовления вареных колбас).

Таким образом, разработанная модифицированная методика позволяла осуществлять одновременное определение животных и растительных ДНК.

В отличие от предложенных ранее методов на основе ДНК-гибридизации, использование детергента СТАВ и иммуномагнитосепарации с сорбентом «Silica» (SiO_2) давало возможность одновременно выделять из смешанных продуктов и растительную, и животную ДНК и проводить их идентификацию. При этом за счет ускоренного выделения ДНК значительно уменьшается время проведения анализа, по сравнению с классическими методами выделения ДНК по Мармару или только с детергентом СТАВ.

Чувствительность методики составляет 1% исследуемого ингредиента в смешанной системе. Результаты по определению чувствительности методики представлены на рисунке 3.



Результаты гибридизации

1. По оси ординат - концентрация
2. По оси абсцисс - степень окрашивания гибридных молекул

Рис. 3. Гистограмма количественного определения сои в смеси говядина-соя.

6. Разработка модифицированной методики определения компонентного состава сырья и продукции на основе амплификации с последующей гибридизацией

Как было показано ранее (Морозова Е.Н., 2005; Узунян Д.Г., 2006), идентификацию мяса можно осуществлять с помощью тест-системы SureFood на основе амплификации с последующей ДНК-гибридизацией с иммобилизованными на плашках ДНК-зондами.

Нами разработана модифицированная методика, которая заключалась в предварительном разделении белка и ДНК, выделении ДНК в соответствии с представленной схемой, амплификации с неспецифическими гексонуклеотидными праймерами и последующей гибридизации с ДНК-зондами и регистрации конечного результата по иммуноферментному типу.

Разработку модифицированной методики идентификации проводили на модельной системе из смешанного фарша из говядины и сои на основе ПЦР и ДНК-гибридизации.

Для выделения ДНК использовали СТАВ-буфер, состоящий из 3%- СТАВ, 1.4М-NaCL, 100мМ TrisHCL до pH 7.8-8.0 и 30мМ EDTA.

Общая схема модифицированной методики представлена на рисунке 4.

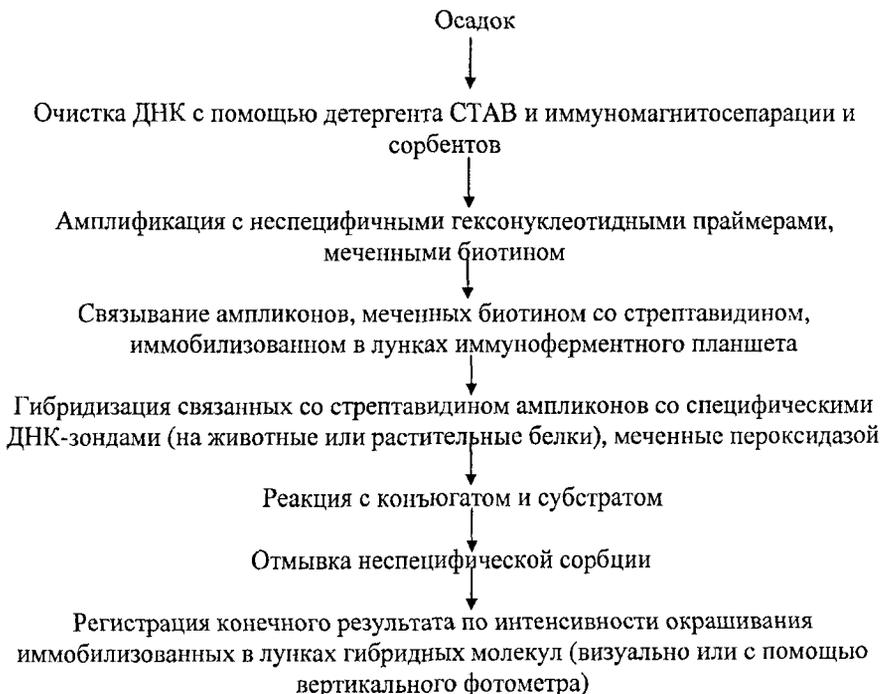


Рис. 4. Схема определения ингредиентного состава на основе амплификации с последующей ДНК гибридизацией и регистрацией конечного результата по иммуноферментному типу

Результаты исследований показали, что методика на основе тест-системы SureFood и наша модифицированная методика позволяли проводить идентификацию мяса. Кроме того, в модифицированной нами методике мы использовали ДНК сои, что давало возможность проводить определение как животных, так и растительных компонентов.

При определении чувствительности методов на основе амплификации с последующей гибридизацией показано, что чувствительность методов составляет 0,1%, причем идентификацию можно проводить в смесях, содержащих как растительные, так и животные компоненты.

При обнаружении растительных компонентов определяли принадлежность их к ГМО. С этой целью проводили амплификацию с праймерами на 35S-промотор и NOS-терминатор. Остальные этапы идентификации осуществляли аналогично методике, представленной выше.

Результаты исследований показали возможность определения генно-модифицированных компонентов в смешанных продуктах.

Чувствительность методики, как и в случае определения не генно-модифицированных компонентов на основе амплификации с последующей гибридизацией, составляла 0,1%. Данная методика позволяет с высокой чувствительностью и специфичностью определять компонентный состав нетермообработанной и термообработанной продукции животного и растительного происхождения, включая ГМО.

В отличие от методики с электрофоретической детекцией ампликонов данный метод, на наш взгляд, является более удобным и дает возможность автоматизации, как на стадиях пробоподготовки (магнитная сепарация), так и на стадии регистрации конечного результата с применением автоматических фотометров.

7. Сравнительное изучение методов определения компонентного состава сырья, термообработанных и нетермообработанных полуфабрикатов

Представленные методы определения компонентного состава были использованы при исследовании сырья и различных видов продукции. При

этом было проанализировано по 5 образцов однородного вида продукции согласно нормативной документации (говядина, свинина, конина, оленина, лосятина, полуфабрикаты мясные рубленые быстрозамороженные; пельмени быстрозамороженные «Тройные» из говядины, свинины, баранины; пельмени быстрозамороженные «Двойные» из говядины, свинины; фарши для приготовления колбас, состоящие из растительных и животных компонентов; колбаса полукопченая из конины «Конская особенная» высший сорт; колбаса «Докторская»).

Как показали проведенные исследования, методы иммунодиффузии однозначно позволяли проводить определение компонентного состава в нетермообработанной продукции (фаршевые смеси, полуфабрикаты мясные рубленые быстрозамороженные; пельмени быстрозамороженные «Тройные» из говядины, свинины, баранины; пельмени быстрозамороженные «Двойные» из говядины, свинины).

Метод иммунодиффузии не давал возможности проводить определение компонентного состава в термообработанной продукции (колбасы).

Различные модификации ПЦР и ДНК-гибридизации позволяли проводить идентификацию животных и растительных компонентов в термообработанной продукции (колбаса «Докторская»; колбаса полукопченая из конины «Конская особенная» высший сорт).

Проведенные исследования сырья и продукции показали возможность эффективного применения разработанных методов определения компонентного состава ингредиентов животного и растительного происхождения. Причем для скрининговой видовой идентификации нетермообработанной мясной продукции достаточно специфичными и чувствительными показали себя методы иммунодиффузии и амплификация.

Методы на основе иммунодиффузии и ДНК-гибридизации не требуют специального оборудования и могут быть использованы в скрининговых анализах в различных ветеринарно-санитарных лабораториях.

Методы амплификации позволяют быстрее проводить анализ как термообработанной, так и нетермообработанной продукции, определять растительные и животные компоненты, включая ГМИ, однако при этом необходим термоциклер и система для электрофореза или гибридизации.

Характеристики методов дифференциального определения ингредиентов растительного и животного происхождения представлены в таблице 3.

Таблица 3

Характеристики методов дифференциального определения ингредиентов растительного и животного происхождения

Определяемые ингредиенты	Критерии анализа	Модифицированные методики		
		Иммунодиффузия	ДНК-гибридизация	Амплификация с последующей ДНК-гибридизацией
Животные и растительные компоненты	Время анализа	20 часов	18 часов	16 часов
	Чувствительность	4%	1%	0,1%
	Специфичность	Нетермообработанная продукция	Дифференциация термообработанных мясных и растительных ингредиентов	Дифференциация термообработанных мясных и растительных ингредиентов, включая ГМО

ВЫВОДЫ

1. Предложены усовершенствованные методы определения компонентного состава продукции на основе анализа белка методами иммунодиффузии и ДНК методами гибридизации нуклеиновых кислот со специфическими ДНК-зондами и амплификации с последующей ДНК-гибридизацией, позволяющие выявлять животные и растительные компоненты, включая компоненты из генно-модифицированных источников.

2. Усовершенствована методика идентификации мяса на основе иммунодиффузии с использованием мембранных дисков, позволяющая дифференцировать ингредиенты в смешанных продуктах животного и растительного происхождения с чувствительностью 4%, сокращать время анализа в 1,5 раза и расширять спектр идентифицируемых видов (конина, оленина, лосятина).

3. Модифицирована методика определения растительных и животных компонентов, включая термообработанную продукцию, с чувствительностью 1% на основе ускоренного выделения ДНК с применением детергента СТАВ и иммуномагнитосепарации, ДНК-гибридизации на мембранных фильтрах с использованием биотинилированных ДНК-зондов и последующей детекции гибридных молекул по степени окрашивания после реакции с конъюгатом и субстратом.

4. Усовершенствована методика определения компонентного состава продуктов из растительных и животных ингредиентов, включая ГМИ, на основе ускоренного выделения ДНК с применением детергента СТАВ и иммуномагнитосепарации, амплификации ДНК с гексонуклеотидными праймерами, ДНК-гибридизации со специфичными ДНК-зондами и регистрацией конечного результата по иммуноферментному типу. Чувствительность методики 0,1%. Методика упрощает анализ по сравнению с методом электрофоретического детектирования, позволяет проводить идентификацию термообработанной продукции и сократить время анализа в 1,5 раза.

5. Разработанные методики могут быть использованы для скрининговых и количественных тестов при идентификации продукции и выявлении недекларированных компонентов растительного или животного происхождения.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ДЛЯ ПРАКТИКИ

На основании результатов исследований разработаны «Методические рекомендации по определению состава сырья и продукции, состоящих из мясных и растительных компонентов с помощью реакции ДНК и иммунодиагностики» (утверждены Отделением ветеринарной медицины РАСХН 07.04.2008 г.).

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Рошупкина Л.В. /Определение ГМИ при помощи метода амплификации с последующей гибридизацией // Сборник трудов ГНУ ВНИИВСГЭ «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии», Москва, 2006, том.118. - С. 223-228.
2. Рошупкина Л.В. /Идентификация продукции и определение фальсифицирующих примесей // Материалы международной научно-производственной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения профессора Авророва А.А., Воронеж, 2006. - С. 1090-1091.
3. Рошупкина Л.В. /Определение компонентного состава смешанных фаршей // Материалы VI международной научной конференции студентов и молодых ученых, МГУПБ «Живые системы и биологическая безопасность», Москва, 2007. - С. 282-283.
4. Рошупкина Л.В., Смирнов А.М., Писарева В.М., Каверин А.В., Морозова Е.Н., Светличкин В.В. /Методы определения генетически модифицированных организмов // Ветеринария, №2, 2008. - С. 57-59.

ГНУ ВНИИВСГЭ Россельхозакадемии г. Москва, Звенигородское шоссе, 5
Заказ 319/9. Тираж 100 экз.