

На правах рукописи

Комарова Ирина Николаевна

**РАЗРАБОТКА ПЦР-ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ВИДОВОЙ
ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ
МЯСНОГО СЫРЬЯ В СОСТАВЕ
МЕЛКОИЗМЕЛЬЧЕННЫХ ПОЛУФАБРИКАТОВ И
ГОТОВЫХ МЯСНЫХ ПРОДУКТОВ**

Специальность 16.00.06. – Ветеринарная санитария, экология,
зоогигиена и ветеринарно-санитарная экспертиза

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Москва 2005

Работа выполнена на кафедре ветеринарно-санитарной экспертизы и кафедре биологии, вирусологии и генной инженерии Московского государственного университета прикладной биотехнологии.

Научный руководитель: кандидат ветеринарных наук,
профессор **Сергин И.Г.**

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук,
профессор **Родин В.И.** (МГУПБ)

кандидат ветеринарных наук,
профессор **Боровков М.Ф.**
(МГАВМиБ им. К.И. Скрябина)

Ведущая организация: ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии (ГНУ ВНИИВСГЭ)

Защита состоится «28» июня 2005 г. в 12⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д.212.149.03 при Московском государственном университете прикладной биотехнологии по адресу: 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 33

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МГУПБ

Автореферат разослан «19» мая 2005 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор ветеринарных наук



Смирнова И.Р.

Р006-4
5599

2140494

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Формирование в России рыночных условий развития экономики, резкое увеличение объема частного производства и свободной торговли продовольственными товарами, в том числе мясным сырьем, полуфабрикатами и готовыми мясными продуктами, предопределяют возможность различной их фальсификации по структуре и видовой принадлежности сырьевых составляющих.

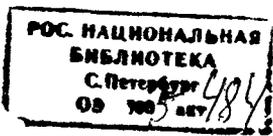
Проблема достоверного определения различных фальсификаций и, прежде всего, видовой идентификация мясного сырья в составе полуфабрикатов и готовых мясных продуктов, а также количественная оценка мясных фальсифицирующих примесей являются особенно актуальными.

Это обусловлено тем, что возможные фальсификации мясного сырья мясом животных, зараженных возбудителями карантинных болезней, в том числе прионами, создают большой риск в эпизоотическом и эпидемическом отношениях. Наиболее опасным является несанкционированное содержание говядины, свинины и курятины в мелкоизмельченном мясном сырье, импортируемом в Россию из стран, неблагополучных по губчатым энцефалопатиям, африканской чуме свиней, гриппу птиц, ящуру и другим заразным болезням. Кроме того, фальсификация видового состава многокомпонентных мясных продуктов может нанести большой моральный вред той категории потребителей, национальные или религиозные воззрения которых не позволяют употреблять мясо отдельных видов скота и птицы.

Используемые в настоящее время органолептические, физико-химические и иммунологические методы контроля недостаточно эффективны при идентификации измельченного мясного сырья в готовых продуктах, особенно если количество мясной фальсифицирующей примеси незначительное по отношению к основному сырью. Более того, указанные методы практически непригодны для исследования мясных смесей от близкородственных животных, а также при выявлении фальсификации мясных продуктов, прошедших термическую обработку свыше 48-57°C.

Наиболее перспективным для определения видовой принадлежности сырья животного происхождения в составе мелкоизмельченных полуфабрикатов, фаршевых мясных продуктов, в том числе подвергшихся термической обработке, является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), основанный на анализе наиболее специфичного и термостабильного материала – ДНК.

В работах отечественных (Светличкин А.М., Обухов И.Л., Комаров А.А. и др.) и зарубежных (Chikuni K., Buntjer J.B., Walker J.A. и др.)



исследователей, посвященных использованию ДНК-методов для видовой идентификации мяса, были показаны чрезвычайно важные достоинства ПЦР – универсальность, высокая чувствительность и специфичность, способность к дифференцированию близкородственных видов животных.

Однако сведений о разработке ПЦР-тест-систем для выявления и количественной оценки в мелкоизмельченных мясных полуфабрикатах и готовых мясных продуктах фальсифицирующих примесей говядины, свинины и курятины в доступной литературе мы не обнаружили. В связи с этим разработка надежных ПЦР-тестов для определения видовой принадлежности мясных составляющих остается актуальной задачей.

Цель и задачи исследований. *Целью* исследований являлась разработка ПЦР-тест-систем для видовой идентификации и количественной оценки измельченного мясного сырья в составе мясных полуфабрикатов и готовых мясных изделий.

В *задачи* исследований входило:

- конструирование видоспецифичных праймеров для идентификации ДНК крупного рогатого скота, свиньи и курицы методом ПЦР и определение наиболее эффективной методики выделения ДНК из мясного сырья и готовых продуктов;
- оптимизация процесса амплификации по температурному и временному профилям реакции;
- изучение специфичности и чувствительности разработанных однолокусных и мультилокусной ПЦР-тест-систем;
- создание контролей ложноположительных и ложноотрицательных результатов разработанных ПЦР-тест-систем;
- разработка внутренних стандартов для количественного определения ДНК крупного рогатого скота, свиньи и курицы методом конкурентной ПЦР;
- калибровка внутренних стандартов и определение точек эквивалентности для количественной оценки ДНК исследуемых видов животных методом конкурентной ПЦР;
- сравнительный анализ эффективности иммунологических и ПЦР методов видовой идентификации мясного сырья при различных условиях его хранения и термической обработки.

Научная новизна. Сконструированы видоспецифичные праймеры для идентификации ДНК крупного рогатого скота, свиней и кур методом ПЦР и разработаны эффективные ПЦР-тест-системы, позволяющие выявлять более 0,1% фальсифицирующих примесей от общей массы исследуемого мелкоизмельченного мясного сырья и многокомпонентных мясных продуктов.

Впервые разработан вариант мультилокусной ПЦР, позволяющей проводить одновременную идентификацию ДНК трех видов животных (говядины, свинины и курятины) в исследуемом материале.

Проведена оценка способов выделения ДНК из проб мясного сырья и готовых мясных изделий и выбрана универсальная методика экстракции ДНК, основанная на использовании гуанидинтиоционата и сорбции ДНК на магнитном сорбенте. Благодаря использованию магнитного сорбента, показана возможность эффективного выделения ДНК, исключая необходимость центрифугирования проб и значительно сокращающая время анализа.

Создан универсальный внутренний контроль ПЦР, позволяющий, с одной стороны, исключить ложноотрицательные результаты, связанные с нарушением работы амплификатора, реакционной смеси или присутствием в пробе ингибиторов ПЦР, а, с другой стороны, проводить учет ложноотрицательных результатов, обусловленных деградацией ДНК исследуемого материала или значительной потерей ДНК при проведении прободготовки.

Сконструированы гетерологичные внутренние стандарты, проведены их калибровка и определение точек эквивалентности для количественной оценки ДНК крупного рогатого скота, свиньи и курицы методом конкурентной ПЦР. Благодаря чему достигнута возможность дифференцирования умышленно произведенного подлога от технической неизбежной контаминации пищевого сырья, возникающей в процессе технологической обработки мяса.

Проведен сравнительный анализ эффективности иммунологических и ПЦР методов видовой идентификации мясного сырья при различных условиях его хранения и термической обработки.

Практическая значимость работы. Разработаны и внедрены в практику ветеринарно-санитарной экспертизы три однолокусные ПЦР-тест-системы “BOV ПЦР-ядро”, “SUS ПЦР-ядро” и “GUL ПЦР-ядро” для видовой идентификации, соответственно, ДНК крупного рогатого скота, свиней и кур.

Сконструирована мультилокусная ПЦР-тест-система “PECUS ПЦР-ядро” для одновременной идентификации ДНК трех видов животных (говядины, свинины и курятины), предназначенная для проведения скринингового анализа измельченного мясного сырья, в том числе импортируемого в Россию из других стран.

Разработан способ количественной оценки мясных фальсифицирующих примесей методом конкурентной ПЦР, позволяющий определять размеры выявляемых фальсификатов и дифференцировать умышленно произведенный подлог от технической неизбежной контаминации пищевого сырья, возникающей в процессе технологической обработки мяса.

Результаты работы были использованы в практических арбитражных исследованиях, связанных с установлением видовой принадлежности проб измельченного мясного сырья и сухих животных кормов.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены на 1-ой Международной научной конференции «Живые системы и биологическая безопасность населения» (М., 2002); на 4-й Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины и ветеринарно-санитарного контроля сельскохозяйственной продукции» (М., 2002); на 3-м Московском Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (М., 2005).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 научных статей, в том числе в журнале «Мясная индустрия» (2004, №2).

Основные положения, выносимые на защиту:

- дизайн видоспецифичных праймеров для ПЦР-идентификации ДНК крупного рогатого скота, свиньи и курицы и сравнительная оценка методов выделения ДНК из мясного сырья и готовых мясных продуктов;
- оптимизация процесса амплификации и определение показателей чувствительности и специфичности однолокусных и мультилокусной ПЦР для определения видовой принадлежности мяса крупного рогатого скота, свиней и кур;
- разработка контролей ложных результатов сконструированных ПЦР-тест-систем,
- создание методического приема для количественного определения ДНК крупного рогатого скота, свиньи и курицы методом конкурентной ПЦР;
- оценка влияния способов технологической обработки мясного сырья на эффективность метода ПЦР и микровариантов реакции преципитации и реакции иммунодиффузии для видовой идентификации сырья животного происхождения.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 182 страницах машинописного текста, состоит из введения, восьми глав обзора литературы, заключения, материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, шести выводов, четырех практических предложений и списка литературы. Диссертация иллюстрирована 15 рисунками и 12 таблицами. Список литературы включает 189 наименований, в том числе 133 иностранных.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы

Исследования по теме диссертации выполнены на кафедре ветеринарно-санитарной экспертизы и кафедре биологии, вирусологии и генной инженерии (МГУПБ). За помощь и материальную поддержку в проведении работы выражаем искреннюю благодарность заведующему кафедрой биологии, вирусологии и генной инженерии, д.б.н., проф. Валихову А.Ф., заведующему лаборатории молекулярных методов анализа, к б.н. Цветкову И.Л.

В качестве объектов исследования использовали образцы мяса крупного рогатого скота, свиней и кур, полученные от туш соответствующих видов животных, прошедших ветсанэкспертизу в полном объеме и имеющих ветеринарное клеймо.

Из образцов охлажденной и замороженной говядины, свинины и курятины были приготовлены мясные фаршевые смеси, содержащие от 0,01 до 100% мяса исследуемых видов животных, и разделены на несколько опытных групп в зависимости от видового состава и способа обработки мясного сырья. Всего было исследовано 178 образцов мясного фарша, мяса механической дообвалки и мелкоизмельченных полуфабрикатов

Экспериментальные исследования проводили в 5-7-кратной повторяемости, полученные данные анализировали и обрабатывали с помощью ПК с определением средней арифметической, стандартного и квадратичного отклонений по выборке.

Методы выделения ДНК. Перед проведением процедуры выделения ДНК отбирали усредненную пробу мясного продукта массой 1г измельчали, гомогенизировали и переносили в чистую пробирку типа «Эппендорф» в количестве 100-150 мкл по объему.

Для сравнительного анализа были выбраны четыре принципиально отличающихся метода выделения ДНК:

- SDS -лизис с фенольной депротеинизацией;
- Щелочной лизис с фенольной депротеинизацией;
- Лизис на основе гуанидинтиоционата с последующей нуклеосорбцией ДНК на силикагеле с использованием коммерческого набора реагентов “SILICA M” («Биоком»);
- Лизис на основе гуанидинтиоционата с последующей нуклеосорбцией ДНК на магнитном силикагеле с использованием коммерческого набора реагентов “Magn S_DNA-uni” («Биоком»)

Процедуру выделения ДНК проводили согласно методикам, описанным Маниатисом Т с соавт (1994), Lenstra J.A. с соавт (2001), и инструкциям, прилагаемым к коммерческим наборам реагентов “SILICA M” и “Magn S_DNA-uni” («Биоком»)

Качество очистки выделенной ДНК устанавливали спектрофотометрически по методике, предложенной Маниатисом Т. с соавт (1994).

Метод полимеразной цепной реакции. Поиск нуклеотидных последовательностей митохондриального гена цитохрома b коровы, свиньи и курицы проводили по международному банку данных “GeneBank” Национального института здоровья США. Оценку вариабельности выбранных последовательностей ДНК и поиск консервативных участков для конструирования вилоспецифичных праймеров осуществляли в режиме on-line с помощью системы ClastalW Multi Sequence Alignment. Изучение консервативных полинуклеотидных последовательностей гена цитохрома b исследуемых видов животных и конструирование праймеров для однолокусных и мультилокусной ПЦР проводили с использованием компьютерной программы “Oligo 6”. Специфичность выбранных праймеров теоретически изучали при помощи компьютерной программы BLASTa on-line.

Сконструированные праймеры были синтезированы фосфоамидитным методом и очищены хроматографически в ЗАО «Синтол» (г.Москва) и НПФ «Литех» (г.Москва). Концентрацию праймеров подбирала отдельно для каждого вида ПЦР

Общий объем реакционной смеси для ПЦР составлял 20 мкл и включал сухую смесь реагентов для ПЦР серии «сухое ядро» («Биоком»), в которую вносили 10 мкл ПЦР-растворителя, 5 мкл смеси соответствующих прямого и обратного праймеров и 5 мкл ДНК-пробы. После полного растворения сухого содержимого в ПЦР-пробирку добавляли 20-25 мкл минерального масла.

Режим амплификации однолокусных ПЦР для идентификации ДНК коровы и курицы, а также мультилокусной ПЦР для одновременной идентификации ДНК коровы, свиньи и курицы составил: 94°C – 3 мин (1 цикл), 94°C – 30 сек., 63°C – 30 сек., 72°C – 30 сек. (35 циклов); 72°C – 3 мин. (1 цикл). Режим амплификации однолокусной ПЦР для идентификации ДНК свиньи составил: 94°C – 3 мин. (1 цикл); 94°C – 30 сек., 65°C – 30 сек., 72°C – 30 сек. (35 циклов); 72°C – 3 мин. (1 цикл).

Детекцию продуктов амплификации проводили методом электрофоретического разделения продуктов ПЦР в 1,5%-ном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, с последующей визуализацией в

ультрафиолетовом свете (260 нм) и регистрацией полученных результатов с помощью гель-документирующей видеосистемы “ViTran”.

Конструирование и калибровка внутренних стандартов для конкурентной ПЦР. Выбранные в качестве внутренних стандартов амплификационные ДНК-фрагменты для конкурентной ПЦР с ДНК коровы, свиньи и курицы были лигированы в плазмидный вектор pGem-T Easy (Promega) и клонированы в клетках E.coli (штамм TB1) по стандартным методикам, описанным в инструкции, прилагаемой к коммерческому набору “pGEM-T Easy Vector. System 1” (Promega). Процедуру клонирования и секвенирование полученной плазмидной ДНК проводили в институте молекулярной биологии им. Энгельгардта. Концентрацию плазмидной ДНК с внутренними стандартами определяли спектрофотометрически

Для определения точек эквивалентности, соответствующих содержанию в исследуемой пробе 1, 2 или 20% ДНК анализируемого вида, готовили последовательные разведения растворов, содержащих внутренние стандарты в концентрациях от 1 до 200 фг/мкл. Фиксированные количества внутренних стандартов (от 1 до 4 мкл) амплифицировали совместно с соответствующей ДНК-матрицей, количество которой составляло 1, 2 или 20% от общего объема ДНК-пробы. Условия и температурные режимы конкурентных ПЦР соответствовали таковым для одноokusных видоспецифичных ПЦР.

Определение точки эквивалентности осуществляли визуально и с помощью компьютерной программы для анализа изображений ImageJ, разработанной Национальным Институтом Здравоохранения США (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Все исследования проводили в тройной повторности.

Иммунологические методы. Для сравнительной оценки эффективности иммунологических и ПЦР методов использовали *диагностические антисыворотки*, преципитирующие сывороточные белки крупного рогатого скота, свиньи и курицы, изготовленные Санкт-Петербургским научно-исследовательским институтом вакцин и сывороток (2003 г.).

Для приготовления мясных *преципитирующих антигенов*, согласно прилагаемой инструкции, мясную пробу массой 20 г измельчали, добавляли 100 мл физ. раствора, и экстрагировали 12 ч при 4-6°C, затем центрифугировали 20 мин. при 5 тыс. об/мин., отбирали супернатант и фильтровали его до полной прозрачности. В полученном мясном экстракте определяли содержание белка при помощи капиллярной пробы с азотной кислотой.

Постановку *капиллярной реакции преципитации и реакции*

иммунодиффузии с бумажными дисками проводили согласно методикам, описанным Никитиным В.М. (1982).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Подбор ДНК-мишени и конструирование видоспецифичных праймеров для идентификации ДНК крупного рогатого скота, свиньи и курицы методом ПЦР

Основными критериями при подборе ДНК-сиквенса служили количество его копий в исследуемой пробе ДНК и специфичность по отношению к исследуемому виду биологического объекта. Известно, что наиболее полно указанным требованиям соответствует митохондриальная ДНК (mt-ДНК) животных и птицы. Сравнение уровня межвидового полиморфизма в структурных единицах митохондриального генома показало, что mt-ген цитохрома *b* содержит максимальное количество информации о видовых различиях ДНК млекопитающих и птиц. В связи с этим данный ген был взят за основу для поиска видоспецифичных праймеров, позволяющих в прямом эксперименте дифференцировать ДНК говядины, свинины и курятины.

Для оценки вариабельности и поиска консервативных участков нуклеотидные последовательности гена цитохрома *b* коровы, свиньи и курицы, полученные из международного банка данных "GeneBank", были выровнены друг относительно друга с помощью системы ClustalW Multi Sequence Alignment и проанализировали при помощи компьютерной программы "Oligo 6".

По результатам анализа в качестве прямого праймера выбрали неселективный (общий для анализируемых видов животных) праймер длиной 23 п.н. (названный SIM). В качестве обратных праймеров для mt-ДНК коровы, свиньи и курицы были выбраны видоспецифичные участки гена цитохрома *b*, длиной 26, 24 и 23 п.н., соответственно (названные BOV, SUS и GUL). Следует отметить, что при конструировании видоспецифичных праймеров учитывали тип мисматчей и не допускали к использованию олигонуклеотиды, специфичность которых определялась единичным «слабым» мисматчем.

Оценка специфичности сконструированных праймеров при помощи компьютерной программы BLASTA подтвердила гомологичность выбранных праймеров BOV, SUS и GUL с нуклеотидными последовательностями mt-гена цитохрома *b* коровы, свиньи и курицы, соответственно, и отсутствие значимой гомологичности с нуклеотидными последовательностями других видов животных и птицы.

Сравнительный анализ методов выделения ДНК из мясного сырья и готовых мясных продуктов

Известно, что эффективность выделения и качество очистки ДНК оказывают непосредственное влияние на результаты ПЦР, так как низкая концентрация ДНК-матрицы и присутствие в пробе ингибиторов реакции являются наиболее частой причиной ложноотрицательных результатов ПЦР. В связи с этим в наши задачи входили выбор и оценка способов экстракции ДНК и их апробация на различном материале, включая пробы мясного сырья и готовых мясных изделий.

С этой целью были выбраны четыре принципиально отличающиеся методики выделения ДНК:

- Лизис с использованием ионного детергента (SDS) с фенол-хлороформовой экстракцией и осаждением ДНК этанолом;
- Щелочной лизис с фенол-хлороформовой экстракцией и осаждением ДНК этанолом;
- Лизис на основе гуанидинтиоционата с последующей нуклеосорбцией ДНК на силикагеле с использованием коммерческого набора реагентов "SILICA M" («Биоком»);
- Лизис на основе гуанидинтиоционата с последующей нуклеосорбцией ДНК на магнитном силикагеле с использованием коммерческого набора реагентов "Magn S_DNA-uni" («Биоком»).

Параметрами оценки являлись уровень чувствительности и воспроизводимость результатов ПЦР с использованием того или иного способа экстракции ДНК, а также наличие или отсутствие фоновой амплификации, приводящей к появлению шмеров на электрофореграмме.

Наши исследования показали, что, исходя из выбранных критериев оценки, наиболее эффективным оказался метод выделения ДНК с использованием готового набора реагентов "Magn S_DNA-uni". Чувствительность ПЦР с использованием ДНК, выделенной при помощи методики магнитной сорбции, составляла 72 пг ДНК исследуемого вида животного, что позволяло выявлять в исследуемой пробе 0,1% и более мясных примесей от массы основного мясного сырья. При этом удавалось избежать ингибирующего действия гемоглобина, солей металлов и других компонентов, присутствующих в сложносоставных мясных продуктах. Более того, методика сорбции ДНК на магнитном силикагеле оказалась менее трудоемкой, по сравнению с методом фенольной депротеинизации, и занимала не более 1,5 часов. Причем, благодаря использованию магнитного нуклеосорбента нам удалось полностью исключить необходимость центрифугирования проб, тем самым значительно упростив процедуру

выделения ДНК для дальнейшего использования в ПЦР.

Оптимизация процесса амплификации и определение показателей чувствительности и специфичности однолокусных и мультилокусной ПЦР для видовой идентификации мяса крупного рогатого скота, свиней и кур

Принимая во внимание, что эффективность диагностических ПЦР-тестов зависит от оптимально подобранных условий амплификации, нами была проведена работа по оптимизации основных параметров ПЦР, включая состав реакционной смеси, температурный и временной профили реакции.

Экспериментально была установлена оптимальная концентрация прямого (SIM) и обратных (BOV, SUS, GUL) праймеров. В наших исследованиях оптимальная концентрация всех «затравок» в однолокусных ПЦР с общим объемом реакционной смеси 20 мкл составила 10 пмоль. В мультилокусной ПЦР оптимум амплификации был достигнут путем использования праймеров в соотношении: SIM·BOV·SUS·GUL=6·4·1·4 (где 1=5 пмоль праймера/20 мкл ПЦР-смеси).

При оптимизации количества ДНК-пробы учитывался тот факт, что содержание ее в реакционной смеси не должно превышать 1 мкг. Отработанная нами методика подготовки проб, включавшая этап сорбции ДНК на магнитный силикагель с диаметром частиц не более 1 мкм, позволяла вносить в реакционную ПЦР-смесь пробу ДНК, концентрация которой не превышала предел оптимума.

Для сокращения материальных затрат и времени проведения анализа, а также с целью предотвращения ложноположительных результатов ПЦР нами было предложено использовать готовый коммерческий набор реагентов для амплификации серии «ПЦР ядро» («Биоком»). Применение указанного набора, включающего специальную марку Taq-ДНК-полимеразы, активные центры которой блокированы антителами, позволило реализовать усовершенствованную методику «горячего старта» с целью исключения неспецифической амплификации и увеличения чувствительности ПЦР.

Известно, что протекание ПЦР регулируется изменением температуры рабочей смеси. Учитывая, что время, за которое Taq-полимераза при нагревании до 95°C теряет до 50% своей активности, составляет 40 мин., для поддержания работы системы на протяжении всей ПЦР нами был подобран режим этапа денатурации, составивший 94°C – 30 сек. В дополнение к этому для наиболее полного плавления ДНК перед началом циклической программы амплификации проводили пролонгированный этап денатурации при 94°C в течение 3 мин.

В большинстве случаев проведение амплификации специфических локусов без образования побочных ПЦР-продуктов осуществляют за счет оптимально подобранных условий отжига. Корректировку температуры отжига сконструированных праймеров проводили экспериментально, исходя из предварительно произведенных расчетов по формулам, предложенным Маниатисом Т. с соавт.:

$$T_a = T_m - (5-10^\circ\text{C}) \text{ и } T_m = 22 + 1,46([2 \times (G + C)] + (A + T)), \text{ где}$$

T_a – температура отжига праймера; T_m – температура плавления ДНК; А, Т, С, G – количество соответствующих азотистых оснований в праймере.

Наиболее эффективная температура отжига в однолокусных ПЦР для идентификации ДНК коровы и курицы, а также в мультилокусной ПЦР для одновременной идентификации ДНК говядины, свинины и курятины составила 63°C ; а в однолокусной ПЦР для идентификации ДНК свиньи – 65°C .

Температурный режим этапа элонгации, составивший 72°C в течение 30 сек., был подобран эмпирически с учетом того, что оптимум активности Таq-ДНК-полимеразы достигается при 72°C , а скорость «работы» фермента может составлять 60 нуклеотидов/мин. Помимо этого, для наиболее полного синтеза ампликонов, образующихся в ходе последнего цикла ПЦР, был проведен заключительный пролонгированный этап синтеза в течение 3 мин.

Исходя из факта, что кинетика ПЦР имеет экспоненциальный характер только на начальном этапе (20-25 циклов), после чего начинается выход на плато, было эмпирически подобрано 35 циклов амплификации.

На следующем этапе работы для подтверждения теоретических расчетов нами была проведена экспериментальная оценка специфичности сконструированных праймеров к ДНК исследуемых видов животных. Для этого проводили амплификацию с различными количествами гетерологичной ДНК (от 2,4 пг до $2,4 \times 10^8$ пг), включая ДНК овцы, лошади, индейки и лосося.

Результаты, полученные в ходе исследования, показали, что амплификация с гетерологичными ДНК-матрицами давала отрицательные результаты как однолокусных, так и мультилокусной ПЦР. При этом перекрестные реакции видоспецифичных праймеров BOS, SUS и GUL с гетерологичными матрицами ДНК свинины/курятины, говядины/курятины и говядины/свинины, соответственно, отсутствовали.

Электрофоретический анализ продуктов амплификации показал, что минимальное количество ДНК-матрицы крупного рогатого скота, свиньи или курицы, которое можно идентифицировать при помощи разработанных однолокусных или мультилокусной ПЦР, составляет 72 пг (рис 1). Причем фоновая нагрузка гетерологичной ДНК не влияла на показатели чувствительности сконструированных ПЦР-тестов.

Полученные результаты исследований позволили нам перейти к определению чувствительности и специфичности ПЦР-систем при тестировании мясных проб. С этой целью использовали смоделированные образцы мелкоизмельченного мясного сырья и готовых мясных изделий с содержанием тканей исследуемых видов животных от 0,01 до 50% от общей массы продукта.

Проведенные анализы подтвердили высокие показатели чувствительности и специфичности разработанных систем амплификации. При помощи однолокусных тест-систем “BOV ПЦР-ядро”, “SUS ПЦР-ядро” и “GUL ПЦР-ядро” в исследуемых мясных образцах удавалось обнаружить ткани крупного рогатого скота, свиней и кур, соответственно, содержащиеся в количестве от 0,1% и более. Продукты неспецифической амплификации при этом выявлены не были. Аналогичные показатели были получены при идентификации мясных проб с помощью мультилокусной тест-системы “PECUS ПЦР-ядро”.

Помимо этого мы подтвердили, что тип ткани анализируемого вида животного не оказывает никакого влияния на достоверность результатов ПЦР. В частности, эффективность амплификации фрагментов ДНК, выделенной из мышечной и жировой тканей, паренхиматозных органов, крови, молока и яиц, была практически идентичной.

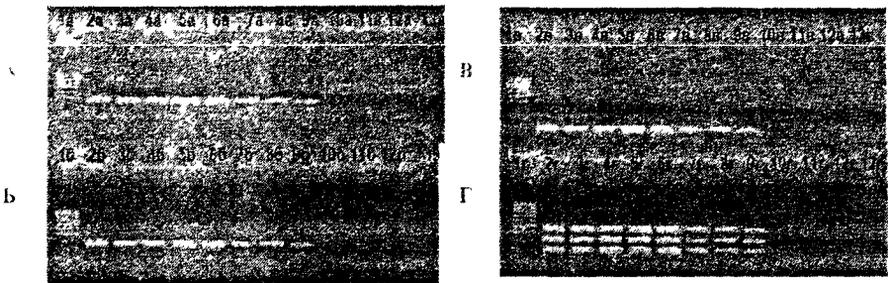


Рис. 1. Определение чувствительности однолокусных и мультилокусной ПЦР

А, Б, В - ПЦР с применением однолокусных тест-систем “BOV ПЦР-ядро”, “GUL ПЦР-ядро” и “SUS ПЦР-ядро”, соответственно, Г - ПЦР с применением мультилокусной тест-системы “PECUS ПЦР-ядро”.

1а, 1б, 1в, 1г - маркер длины фрагментов ДНК (GeneRuler™ 100 bp, США); 2а - 12а. ДНК крупного рогатого скота, 2б - 12б. ДНК курицы; 2в - 12в. ДНК свиньи, 2г - 12г. эквимольная смесь ДНК крупного рогатого скота, свиньи и курицы (2 - $2,4 \times 10^6$ пг, 3 - $2,4 \times 10^5$ пг, 4 - $2,4 \times 10^4$ пг; 5 - $2,4 \times 10^3$ пг, 6 - $2,4 \times 10^2$ пг, 7 - 144 пг; 8 - 96 пг, 9 - 72 пг; 10 - 48 пг, 11 - 24 пг; 12 - 2,4 пг), 13а, 13б, 13в, 13г - отрицательный контроль (буфер ТЕ).

Конструирование контролей работы однолокусных и мультилокусной ПЦР-тест-систем

Для более достоверной интерпретации результатов ПЦР в разработанные тест-системы был включен положительный контроль, который служил маркером длины специфических ПЦР-продуктов, а также выполнял роль индикатора работы реакционной ПЦР-смеси и амплификатора.

В качестве положительного контроля для однолокусных тест-систем “BOV ПЦР-ядро” “SUS ПЦР-ядро” и “GUL ПЦР-ядро” использовали, соответственно, ДНК крупного рогатого скота, свиньи и курицы, полученные методом фенольной депротеинизации. Положительным контролем для мультилокусной тест-системы “PECUS ПЦР-ядро” служила эквимолярная смесь ДНК всех трех анализируемых видов животных.

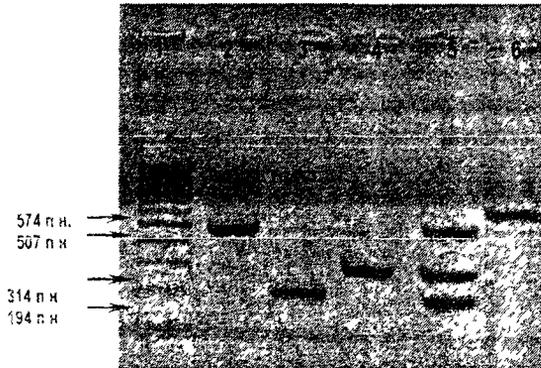


Рис. 2. ПЦР-продукты положительных контролей и универсального внутреннего контроля однолокусных и мультилокусной ПЦР-тест-систем

1 - маркер длин фрагментов ДНК (*GeneRulerTM*, США); 2 - положительный контроль амплификации видоспецифичного фрагмента ДНК коровы; 3 - положительный контроль амплификации видоспецифичного фрагмента ДНК свиньи, 4 - положительный контроль амплификации видоспецифичного фрагмента ДНК курицы, 5 - положительный контроль коампликации видоспецифичных фрагментов ДНК коровы, свиньи и курицы; 6 - универсальный внутренний контроль

Для определения соответствия продуктов амплификации положительных контролей специфическим фрагментам ДНК заданных размеров параллельно с контрольными пробами проводили электрофорез маркера длин фрагментов

ДНК (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, “Fermentas”, США) Проведенные нами исследования показали, что при амплификации фрагментов ДНК сконструированных положительных контролей образовывались только специфические ПЦР-продукты заданной длины (507, 194 и 314 п.н., соответственно, для ДНК крупного рогатого скота, свиньи и курицы) (рис. 2).

Во избежание ингибирования реакции особое внимание уделялось определению рабочих концентраций положительных контролей. Экспериментально было установлено, что оптимальная концентрация ДНК-матриц всех положительных контролей составляет 100 нг на реакционную ПЦР-смесь.

Дальнейшее технологическое усовершенствование разработанных ПЦР-тест-систем заключалось в разработке способа контроля ложноотрицательных результатов ПЦР, учет которых невозможно осуществить при помощи стандартного положительного контроля. Причинами возникновения таких ошибок являются загрязнение ДНК-пробы примесями, ингибирующими ПЦР, потери ДНК при экстракции, а также нарушения правил отбора, хранения и транспортировки проб, в результате которых возможно полное разрушение ДНК. Для предотвращения ложноотрицательных результатов, имеющих подобное происхождение, нами был сконструирован универсальный внутренний контроль, матрицей для которого являлся фрагмент mt-гена цитохрома b анализируемых видов животных. Праймеры, фланкирующие фрагмент внутреннего контроля (названные SIM и REV), не обладали видовой специфичностью, позволяя, тем самым, амплифицировать ДНК-матрицу независимо от видового происхождения анализируемой пробы.

Подбор последовательности внутреннего контроля был произведен нами таким образом, чтобы в ее состав входили фрагменты ДНК, соответствующие продуктам амплификации видоспецифичных ПЦР. Кроме того, подбор праймера REV был проведен так, чтобы температура отжига последнего была максимально приближена по значению к температуре отжига видоспецифичных праймеров (63°C). Жесткое соблюдение этого требования позволило проводить амплификацию фрагмента универсального внутреннего контроля одновременно с определением видовой принадлежности анализируемой ДНК-матрицы, то есть за один акт работы амплификатора.

Присутствие на электрофореграмме продуктов ПЦР универсального внутреннего контроля в виде ярко окрашенной полосы, соответствующей по размеру 574 п.н. (рис. 2), свидетельствовало об успешном выделении ДНК животного происхождения из исследуемого материала в количестве, достаточном для детекции с помощью разработанных ПЦР-тест-систем, а также об отсутствии в пробе ДНК большого количества белков, полисахаридов и других веществ, затрудняющих протекание ПЦР.

С целью предотвращения появления спорадических и систематических ложноположительных результатов ПЦР в разработанные тест-системы мы также включили отрицательный контроль, представлявший собой стандартную «сухую» пробирку для ПЦР в которую последовательно вносили ПЦР-растворитель, праймеры и вместо ДНК-матрицы – ТЕ буфер. В случае контаминации реагентов в электрофоретической дорожке, соответствующей отрицательному контролю, присутствовали характерные светящиеся полосы. Результаты проведенной ПЦР при этом считались недостоверными и подвергались перепроверке с использованием новых реагентов.

Таким образом, разработанные нами однолокусные и мультилокусная ПЦР-тест-системы для видовой идентификации тканей крупного рогатого скота, свиней и кур включают последовательные этапы экстракции ДНК из исследуемых мясных проб, постановку универсального внутреннего контроля для оценки качества выделенной ДНК и проведение видоспецифичной ПЦР, включая постановку положительного и отрицательного контролей (рис. 3).

Помимо сконструированных нами видоспецифичных праймеров, положительных, отрицательных и универсального внутреннего контролей, в комплектацию разработанных ПЦР-тест-систем включены готовые наборы реагентов, выпускаемые отечественным производителем (табл. 1)



Рис. 3. Схема ПЦР-анализа видовой идентификации тканей животного происхождения

Таблица 1

ПЦР-тест-системы для видовой идентификации сырья и продукции животного происхождения

| № | Название ПЦР-тест-системы | Предназначение | Состав |
|---|---------------------------|--|---|
| 1 | “BOV-ПЦР ядро” | Идентификация ДНК крупного рогатого скота | 1. Набор реагентов для выделения ДНК “Magn S_DNA-uni” 2. Набор реагентов для ПЦР серии «ПЦР ядро» 3. Смесь праймеров, видоспецифичных к ДНК коровы 4. Смесь праймеров для универсального внутреннего контроля 5. Положительный контроль 6. Набор реагентов для проведения электрофореза |
| 2 | “SUS-ПЦР ядро” | Идентификация ДНК свиньи | 1. Набор реагентов для выделения ДНК “Magn S_DNA-uni” 2. Набор реагентов для ПЦР серии «ПЦР ядро» 3. Смесь праймеров, видоспецифичных к ДНК свиньи 4. Смесь праймеров для универсального внутреннего контроля 5. Положительный контроль 6. Набор реагентов для проведения электрофореза |
| 3 | “GUL-ПЦР ядро” | Идентификация ДНК курицы | 1. Набор реагентов для выделения ДНК “Magn S_DNA-uni” 2. Набор реагентов для ПЦР серии «ПЦР ядро» 3. Смесь праймеров, видоспецифичных к ДНК курицы 4. Смесь праймеров для универсального внутреннего контроля 5. Положительный контроль 6. Набор реагентов для проведения электрофореза |
| 4 | “PECUS-ПЦР ядро” | Идентификация ДНК крупного рогатого скота, свиньи и курицы | 1. Набор реагентов для выделения ДНК “Magn S_DNA-uni” 2. Набор реагентов для ПЦР серии «ПЦР ядро» 3. Смесь праймеров, видоспецифичных к ДНК коровы, свиньи и курицы 4. Смесь праймеров для универсального внутреннего контроля 5. Положительный контроль 6. Набор реагентов для проведения электрофореза |

Разработка методики количественного определения ДНК крупного рогатого скота, свиньи и курицы методом конкурентной ПЦР

Для установления процентного соотношения мясных фальсифицирующих примесей к основному мясному сырью и дифференцирования умышленно произведенного подлога от технически неизбежной когтаминации пищевого сырья, возникающей в процессе технологической обработки мяса, нами была разработана методика количественного анализа, реализующая принцип

конкурентной ПЦР, основанной на коампликации выявляемой ДНК и специально сконструированного внутреннего стандарта.

В ходе решения данной задачи нами были сконструированы гетерологичные внутренние стандарты, которые представляли собой последовательности ДНК, по своему составу отличающиеся от нуклеотидной последовательности ДНК-мишеней, за исключением сайтов праймирования (рис. 4) Такая конструкция позволяла, с одной стороны, амплифицировать внутренний стандарт и ДНК-матрицу с равной эффективностью, а, с другой стороны, избежать образования гетеродуплексов, имеющих место при использовании гомологичного конкурента. Размер нуклеотидной последовательности внутренних стандартов подбирали так, чтобы он отличался от размера ПЦР-продукта соответствующей ДНК-матрицы на 50-100 п. н. и, таким образом, продукты коампликации могли быть легко отдифференцированы друг от друга при проведении электрофореза.

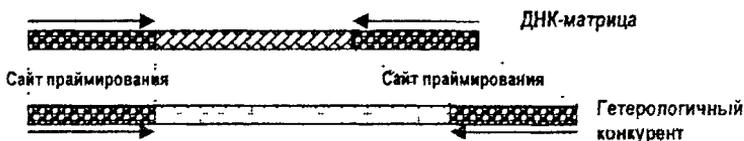


Рис.4. Схема конструкции гетерологичного внутреннего стандарта

При определении размеров выявляемых фальсификатов и дифференцирования их от неизбежной контаминации мясного сырья тканями гетерологичных видов сначала устанавливали концентрации внутренних стандартов, коамплификация которых с 1, 2 и 20% соответствующей ДНК-матрицы приводила к наработке равных количеств ПЦР-продуктов.

Результаты исследований показали, что точка эквивалентности для 1, 2 и 20% ДНК коровы достигается при наличии в реакционной ПЦР-смеси 15, 37 и 450 фг конкурента, соответственно. Количество специфического внутреннего стандарта, эквивалентное 1, 2 и 20% ДНК свиньи, составило 9, 31 и 470 фг, соответственно. Эквимоллярные полосы продуктов коампликации специфического конкурента с 1, 2 и 20% куриной ДНК-матрицы были получены при наличии в реакционной смеси, соответственно, 20, 50 и 670 фг внутреннего стандарта.

В дальнейшем полученные результаты были подтверждены с помощью серии контрольных конкурентных ПЦР со смесями ДНК, содержащими от 0,1 до 100% исследуемых ДНК-матриц.

Таким образом, использование разработанной нами методики

конкурентной ПЦР позволяет осуществлять количественную оценку ДНК анализируемого вида животного. Однако следует учитывать, что прямой перерасчет полученных титров в абсолютное количество мясного сырья того или иного вида невозможен по причине значительных различий в содержании ДНК в разнообразных органах и тканях. Поэтому для достижения достоверных результатов количественной оценки требуется адаптация разработанной нами методики к различным объектам исследования и, в первую очередь, определение коэффициентов перерасчета результатов оценки содержания ДНК в исследуемом материале на количество того или иного вида мясного сырья.

Оценка эффективности иммунологических и ПЦР методов видовой идентификации при различных способах хранения и технологической обработки мясного сырья.

С целью изучения влияния процессов технологической обработки мясного сырья и режимов его хранения на показатели чувствительности и специфичности биологических методов видовой идентификации мяса нами был проведен сравнительный анализ результатов ПЦР с данными реакции преципитации и реакции иммунодиффузии, полученными в ходе исследования свежего и несвежего мясного сырья, а также мясных термообработанных продуктов.

Для этого из образцов охлажденной говядины, свинины и курятины готовили мясные фаршевые смеси, содержащие от 0,1 до 100% мясных примесей исследуемых видов животных, и обрабатывали их различными способами, включая замораживание, размораживание и нагревание до 100-120°C.

Проведенные исследования показали, что показатели ПЦР практически не изменялись при исследовании замороженных или термообработанных мясных проб, по сравнению с иммунологическими тестами. Многократное замораживание и размораживание мясных проб приводило к понижению уровня чувствительности ПЦР только с 0,1 до 1%, в то время как реакция преципитации в капиллярах и реакция иммунодиффузии с бумажными дисками давали положительный результат при наличии 20-25% видоспецифичных белков.

Гнилостные процессы, возникавшие в результате длительного хранения (14 дней) мясных проб при комнатной температуре, приводили к полной утрате антигенных свойств мышечными белками и, как следствие, к невозможности определения видовой принадлежности мясного сырья иммунологическими методами.

Электрофоретический анализ ДНК, выделенной из мясных проб, длительно хранившихся при комнатной температуре, показал на сильное повреждение полимерных молекул нуклеиновых кислот, которое проявлялось в повышенном содержании низкомолекулярных фрагментов ДНК (рис. 5). Однако благодаря принципу направленной амплификации специфических нуклеотидных последовательностей, с помощью разработанных ПЦР-тест-систем даже в условиях гнилостной порчи мясного сырья нам удавалось обнаружить мясную примесь того или иного вида животного в количестве от 1 до 10% от общей массы пробы

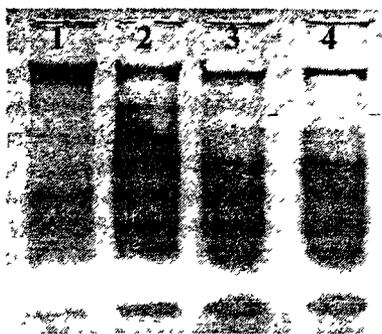


Рис. 5. Электрофоретический анализ ДНК, выделенной из мясных проб, подвергавшихся различным способам технологической обработки
 1 – ДНК животных, выделенная из проб охлажденного мясного сырья (контрольная группа), 2 – ДНК животных, выделенная из мясных проб, подвергавшихся процедуре многократного замораживания/размораживания, 3 – ДНК животных, выделенная из мясных проб с признаками порчи; 4 – ДНК животных, выделенная из мясных проб, прошедших жесткую термическую обработку (2 ч при 120°С)

Результаты исследований, направленных на изучение эффективности биологических методов видовой идентификации мясного сырья при различных режимах его термической обработки, показали, что благодаря большей термостабильности ДНК чувствительность ПЦР-тестов изменяется значительно слабее при анализе термообработанных мясных проб, по сравнению с таковой иммунологических реакций (РИ, РИД)

В частности, длительная обработка (120 мин.) мясного сырья при 100°С не препятствовала выявлению с помощью ПЦР фальсифицирующих примесей в количестве от 0,1 до 1% от общей массы мясного сырья. С помощью ПЦР

нам удавалось выявлять до 2-5% тканей исследуемых видов животных в мясных образцах, подвергавшихся автоклавированию при 120°C, 2 атм. в течение 0,5-1 часа.

В тоже время в иммунологических реакциях было отмечено понижение антигенной активности видоспецифичных белков на 5-10% при нагревании мясных смесей до 55- 65°C. Нагревание мяса до 72°C приводило к резкому снижению чувствительности реакции преципитации в капиллярах и реакции иммунодиффузии с бумажными дисками. При этом нам удавалось выявить примеси говядины и курятины в количестве не менее 50% от общей массы образца, а примеси свинины – не менее 25-30%.

Прогревание фаршевых смесей до 80°C приводило практически к полной утрате белками мяса своих антигенных свойств.

Таким образом, полученные результаты исследования показали, что при идентификации свежего и несвежего мясного сырья, а также сырья, прошедшего термическую обработку, разработанные ПЦР-тест-системы по чувствительности и специфичности значительно превосходят иммунологические методы.

ВЫВОДЫ

1 Наиболее оптимальным молекулярно-генетическим маркером для видовой идентификации ДНК крупного рогатого скота, свиней и кур на основании анализа уровня межвидового полиморфизма нуклеотидных последовательностей ДНК сельскохозяйственных животных и птицы является митохондриальный ген цитохрома b.

2. Наименее трудоемким методом выделения ДНК из мясного сырья и готовых продуктов, обеспечивающим высокое качество очистки нуклеиновых кислот и исключаящим необходимость измерения концентрации выделенной ДНК, является метод аффинной сорбции ДНК на магнитном силикагеле в присутствии солей гуанидина.

3 Однолокусные тест-системы “BOV ПЦР-ядро”, “SUS ПЦР-ядро” и “GUL ПЦР-ядро” для идентификации тканей крупного рогатого скота, свиней и кур, соответственно, а также мультилокусная тест-система “PECUS ПЦР-ядро» для одновременной идентификации тканей трех видов животных обладают 100% специфичностью и имеют предел чувствительности, соответствующий 0,1% тканей анализируемого вида животного в исследуемом материале

4. Сконструированы положительные, отрицательные, а также универсальный внутренний контроли, позволяющие оценить качество выделенной ДНК и получить информацию о работе всей амплификационной

системы с целью предотвращения получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов ПЦР.

5. Разработана методика количественного определения ДНК животного происхождения, основанная на принципе конкурентной ПЦР, позволяющая оценить размеры выявляемых фальсификатов и дифференцировать умышленно произведенный подлог от технической неизбежной контаминации мясного сырья тканями гетерологичных видов

6. Экспериментально подтверждены более высокие специфичность и чувствительность ПЦР-методов идентификации мясного сырья при различных способах его хранения и технологической обработки, по сравнению с иммунологическими методами.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Для практического применения в ветеринарных и научных испытательных лабораториях с целью выявления фальсифицирующих примесей говядины, свинины и курятины в составе мясного сырья и готовых мясных изделий наиболее целесообразно использовать ПЦР-тест-системы “BOV ПЦР-ядро”, “SUS ПЦР-ядро” и “GUL ПЦР-ядро”, соответственно.

2. При проведении скринингового анализа большого количества мясных проб рекомендуется использовать мультилокусную ПЦР-тест-систему “PECUS ПЦР-ядро», что позволит одновременно выявлять наличие в измельченном мясном сырье фальсифицирующих примесей говядины, свинины и курятины.

3. Для количественного определения ДНК различных видов животных нами предлагается методика, реализующая принцип конкурентной ПЦР, основанной на коампликации исследуемой ДНК-матрицы с количественно охарактеризованным внутренним стандартом

4. При арбитражном исследовании фальсификатов целесообразно использовать ПЦР-тест-системы, с помощью которых можно в течение 2 рабочих дней надежно определить видовое происхождение мясных составляющих мелкоизмельченного сырья или готовых продуктов из него

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Комарова И Н, Кайдаков С В, Серегин И Г. Качественное питание в системе здорового образа жизни. // Мат. 1-й меж. науч. конф. «Живые системы и биологическая безопасность населения». - М.: МГУПБ, 2002. - С. 17-19.

2. Комарова И Н Арбитражное определение фальсификаций мясных продуктов. // Мат. 4-ой меж. науч.-практ. конф «Актуальные проблемы

ветеринарной медицины и ветеринарно-санитарного контроля сельскохозяйственной продукции». - М.: МГУПБ, 2002, т.2. – С. 75-76.

3. *Серегин И.Г., Комарова И.Н., Валихов А.Ф.* Применение ДНК-методов для идентификации пищевых продуктов // Мат. 2-й межд науч конф. «Живые системы и биологическая безопасность населения». - М.: МГУПБ, 2003. - С. 57-58.

4. *Комарова И.Н., Серегин И.Г., Валихов А.Ф.* Полимеразная цепная реакция – современный метод выявления фальсификаций мясного сырья и продуктов // *Мясная индустрия*, № 2. - М., 2004. - С. 37-41.

5. *Комарова И.Н.* Разработка тест-систем, основанных на методе полимеразной цепной реакции, для видовой идентификации сырья и продуктов животного происхождения // Мат. 12-го межд. конгресса по проблемам ветеринарной медицины мелких домашних животных. – М., 2004. – С. 112.

6. *Серегин И.Г., Комарова И.Н., Кожухова К.Н.* Сравнительный анализ иммунологических методов идентификации мясного сырья и полуфабрикатов // Сбор науч. тр. «Повышение энергоэффективности техники и технологий в перерабатывающих отраслях АПК». - М., 2004 – С 243-246.

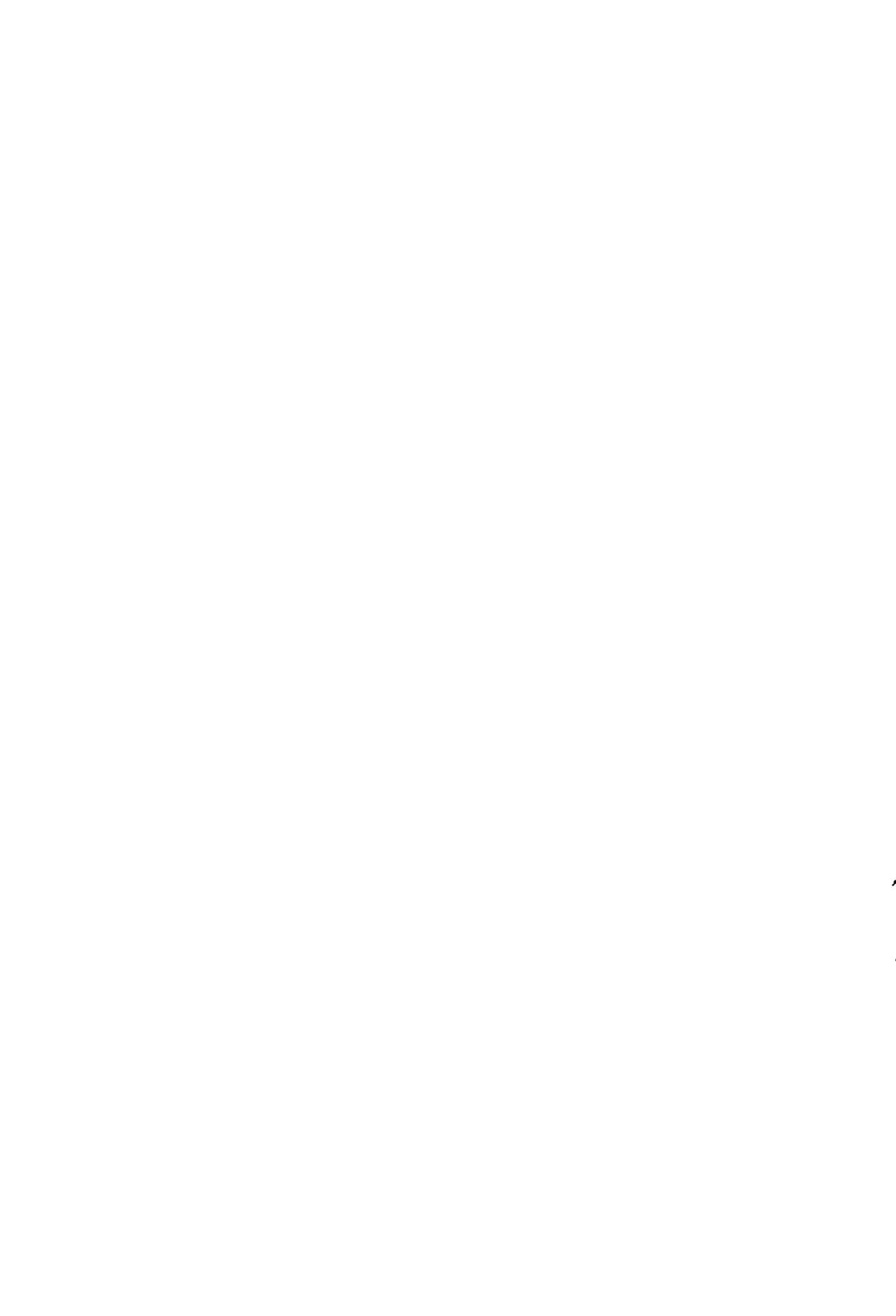
7. *Серегин И.Г., Комарова И.Н., Валихов А.Ф.* Разработка ПЦР-теста для выявления фальсификации видового состава мелкоизмельченного мясного сырья // Мат. межд. науч.-практ конф. «Состояние и проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии в животноводстве». - Чебоксары, 2004. - С. 367-370.

8. *Комарова И.Н., Серегин И.Г., Цветков И.Л.* Определение видовой принадлежности тканей животного происхождения с использованием коммерческих наборов для ПЦР // Мат. III Моск. межд. конгр. «Биотехнология. состояние и перспективы развития». М.: ЗАО «Экспобиохим-технологии», 2005, ч.2. – С. 116.

9. *Комарова И.Н.* Количественная оценка содержания компонентов животного происхождения в составе мясного сырья и готовой продукции с использованием метода конкурентной ПЦР // Мат. III Моск. межд. конгр. «Биотехнология: состояние и перспективы развития». М.: ЗАО «Экспобиохим-технологии», 2005, ч.2. – С. 116-118.

10. *Рогов И.А., Валихов А.Ф., Серегин И.Г., Комарова И.Н., Кроха Н.Г.* Количественная оценка содержания компонентов животного происхождения в составе мясного сырья и готовой продукции с использованием метода конкурентной ПЦР // Мат. III Моск. межд. конгр. «Биотехнология: состояние и перспективы развития». М.: ЗАО «Экспобиохим-технологии», 2005, ч.2. – С 146-147

Подписано в печать 14 05 2005 Формат 60x84 1/16 Печать лазерная
Тираж 100 экз. Заказ 5/68.
ПБОЮЛ «Мигрофанов Р В ». Гел. 743-62-29
109316 г. Москва, ул. Талалихина, 33



№ 12084

РНБ Русский фонд.1

2006-4
5599